



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**ÚJSZERŰ MODELL KIDOLGOZÁSA A MADÁR
ŐSIVARSEJTEK REINTEGRÁCIÓJÁRA UNIVERZÁLIS
STERIL RECIPIENS ELŐÁLLÍTÁSÁVAL**

Molnár Mariann
Gödöllő
2024

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
tudományos főmunkatárs
Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ,
Haszonállat-génmegőrzési Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása
Prof. Dr. Mézes Miklós

.....
A témavezető jóváhagyása
Dr. Várkonyi Eszter

TARTALOMJEGYZÉK

1. JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2. BEVEZETÉS	7
3. CÉLKITŰZÉSEK	8
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
4.1. A génmegőrzés jelentősége és lehetőségei	9
4.2. A génmegőrzés szempontjából fontos madár szaporodásbiológiai sajátosságok....	10
4.2.1. Nőivar	11
4.2.2. Hímivar	12
4.2.3. Termékenyülés.....	13
4.2.4. Mesterséges termékenyítés	15
4.3. Mindkét ivar megőrzése embrionális sejtek segítségével	16
4.3.1. Blasztodermális sejtek (BC) felhasználása	17
4.3.2. Az ősvarsejtek (cPGC, gPGC) felhasználása	18
4.3.3. Az ősvarsejtek fenntartása sejtenyészetben.....	19
4.3.4. Az ősvarsejtek hosszútávú tárolása mélyhűtéssel	21
4.3.5. Kiméra előállítás	22
4.3.6. A recipiens embrió saját ivarsejt-fejlődési erélyének csökkentése vagy gátlása különböző módszerekkel	26
4.4. Fajhibridek	28
4.4.1. Fajhibridek előfordulása a természetben	29
4.4.2. Fajhibridek mesterséges előállítása	30
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	31
5.1. A keresztezésben résztvevő fajok/fajták leírása.....	31
5.1.1. Sárga magyar tyúk (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	31
5.1.2. Magyar parlagi gyöngytyúk (<i>Numida meleagris</i>).....	32
5.2. Kísérleti állatok, állatkísérleti engedély	34
5.3. A kísérleti állomány tartástechnológiája	34
5.4. A hibridelőállítás menete.....	35
5.4.1. Mesterséges termékenyítés	35
5.4.2. Tojásgyűjtés.....	35
5.4.3. Alkalmazott keltetési technológia.....	36
5.5. Előzetes vizsgálatok a gyöngytyúk-házityúk hibridek donor eredetű ősvarsejtek befogadására való alkalmasságára	36

5.5.1. A fejlődés során elhalt embriók fenotípusos vizsgálata	36
5.5.2. Direkt kromoszóma preparátumok készítése elhalt embriókból	37
5.5.3. Az embrionális ivarszervek vizsgálata immunhisztokémiával	38
5.5.4. A kikelt hibridek tartástechnológiája	38
5.5.5. A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálata	39
5.5.6. Az ivarszervek fejlődésének vizsgálata a nevelés során.....	41
5.5.7. A termékenyítőképesség <i>in vitro</i> vizsgálatai	42
5.6. GFP-t tartalmazó ősvarsejtek injektálása 3 napos hibrid embriókba.....	43
5.6.1. Az injektáláshoz használt ősvarsejtek eredete és fenntartása	43
5.6.2. Ősvarsejtek injektálása 3 napos hibrid embriókba	43
5.6.3. A fejlődés során elhalt injektált embriók fenotípusos vizsgálata	44
5.6.4. Az injektált sejtek jelenlétének vizsgálata az embrionális ivarszervekben	44
5.6.5. Az ivarérett egyedek ivarszerveinek vizsgálata.....	45
5.7. Statisztikai analízis	47
6. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE	48
6.1. A hibridelőállítás eredményei	48
6.1.1. A keresztezési kísérlet eredményeképpen nyert tojások termékenysége és a tapasztalt korai embrionális rendellenességek fenotípus szerinti csoportosítása	48
6.2. A hibridek donor eredetű ősvarsejtek befogadására való alkalmasságára irányuló előzetes vizsgálatok eredményei	50
6.2.1. Az elhalt embriók kromoszóma vizsgálatának eredményei	50
6.2.2. Az ivarszervek embrionális fejlődése során végzett vizsgálatok eredményei	52
6.2.3. A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálatának eredménye.....	54
6.2.4. A felnevelt hibridek fenotípusának leírása	55
6.2.5. Az ivarszervek fejlettségének vizsgálati eredményei a 16. és a 30. élethét között .56	
6.2.6. A termékenyítőképesség <i>in vitro</i> vizsgálatainak eredményei.....	59
6.3. GFP-t tartalmazó ősvarsejtek 3 napos embriókba történő injektálásának eredményei.....	60
6.3.1. A fejlődés során elhalt injektált embriók fenotípusos vizsgálatának eredménye	60
6.3.2. Az injektált sejtek embrionális ivarszervben való jelenlétének vizsgálati eredményei.....	62
6.3.3. Ivarérett egyedek ivarszerveinek vizsgálati eredményei	63
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	68
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	71

9. ÖSSZEFOGLALÁS.....	72
10. SUMMARY.....	74
11. MELLÉKLETEK.....	76
M1 – Irodalomjegyzék	76
M2 – Táblázatok és ábrák jegyzéke	89
M3 – Összefoglaló táblázat az elvégzett vizsgálatokról	91
12. FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK.....	93
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96

1. JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BC (Blastodermal Cell) - blasztoderma sejt

BSA (Bovine Serum Albumin) - szarvasmarha szérum albumin

BWE (Blastoderm Without Embryo) - embrió nélküli blasztoderma

cPGC (circulating Primordial Germ Cell) - a vérkeringésben cirkuláló ősvarsejt

CVH (Chicken VASA Homologue, DEAD-box helicase 4) - házityúk VASA homológ

D5 - a fejlődés 5. napján elhalt embrió

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - Dulbecco módosított Eagle tápoldata

DMSO (Dimethyl Sulfoxide) - dimetil-szulfoxid

D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) - Dulbecco foszfát puffer oldata

EpiSC (Epiblast Stem Cell) - epiblaszt eredetű őssejt

ESC (Embryonic Stem Cell) - embrionális eredetű őssejt

FBS (Fetal Bovine Serum) - magzati szarvasmarha savó

FCS (Fetal Calf Serum) - borjú savó

GFP (Green Fluorescent Protein) - zölden fluoreszkáló fehérje

gPGC/GGC (gonadal Primordial Germ Cell/Gonadal Germ Cell) - gonádból származó ősvarsejt

ICM (Inner Cell Mass) - belső embriócsomó

IUCN (International Union for Conservation of Nature) - Természetvédelmi Világszövetség

LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) - leukémia gátló faktor

MGE – Magyar Kisállatnemesítők Génmegőrző Egyesülete

NBGK-HGI - Nemzeti Biodiverzitás- és génmegőrzési Központ-Haszonállat-génmegőrzési Intézet

OSC (Oogonial Stem Cell) - oogoniális őssejt/petesejt prekursor sejt

PCR (Polymerase Chain Reaction) - polimeráz-láncreakció

PD (Positive Development) - pozitív fejlődés

PBS (Phosphate Buffered Saline) - foszfát puffer oldat

PBST (PBS+0.5% Tween) - foszfát puffer oldat 0,5% Tween-nel kiegészítve

SSC (Spermatogonial Stem Cell) - spermatogoniális őssejt

SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1) - stádium-specifikus embrionális antigén-1

TALEN (transcription activator-like effector nucleases) - transzkripció aktivátor-szerű effektor-nukleáz

TC (Testicular Cell) - heréből származó sejt

2. BEVEZETÉS

Mára nem csak a természettudományos kutatások világában, de a közéletben is egyre több szó esik a génmegőrzésről és annak jelentőségéről. Az intenzív emberi tevékenységek és azok hatásai az élővilágra, annak diverzitására egyre sürgetőbb feladattá teszik a csökkenő egyedszámú, kihalással fenyegetett növény- és állatfajok védelmét és megmentését, a biodiverzitás megőrzését és fenntartását. 2023-ban a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) több, mint 44 000 fajt, ezek közül közel 1400 madárfajt tartott számon veszélyeztetettként [súlyosan veszélyeztetett (CR), veszélyeztetett (EN) vagy sebezhető (VU) kategóriába sorolt fajok] a kihalással fenyegetett fajok vörös listáján (IUCN Red List), azonban a biológiai sokféleség megóvása nem csak vadon élő fajok esetében fontos feladat.

Az agrobiodiverzitás is világszerte drasztikus csökkenést mutat az intenzív gazdálkodási rendszerek és azok körülményeihez jól alkalmazkodó haszonállatfajták elterjedése miatt. A kulturális, esztétikai, oktatási, valamint jelentős genetikai és tudományos értékeket is képviselő, a hazai természetföldrajzi körülmények között kialakult, a helyi adottságokhoz kiválóan alkalmazkodott, betegségekkel és környezeti hatásokkal szemben ellenállóbb őshonos fajok/fajták egyre kisebb szerepet kapnak a termelésben, így fenntartásukhoz és megőrzésükhöz nélkülözhetetlenek a génbankok, illetve az azokhoz kapcsolódó kutatási tevékenységek. Annak ellenére, hogy termelési mutatóik elmaradnak az intenzív fajtákétól, ezen őshonos fajok/fajták általában kettős hasznosításúak, háztáji, tanyasi tartási körülmények között akár gazdaságosan termelnek és olyan, mára ritka allélokkal rendelkeznek, amelyek például bizonyos fertőző betegségekkel szembeni ellenálló képességért vagy a környezeti változásokhoz történő hatékony adaptációért felelősek és hiányoznak a kommersz vonalakból. (Szalay és Koppány 2017)

A génmegőrzési munka fontos célja ezen értékes allélok megőrzése, valamint a hagyományos fajok/fajták visszaintegrálása a gazdálkodási gyakorlatba, ezzel is növelve a megőrzés biztonságát és a genetikai anyag változatosságát, hozzájárulva a különböző természeti és gazdasági kihívások (klímaváltozás, élelmezés- és élelmiszerbiztonsági kérdések) hosszútávú kezelésének lehetőségeihez is.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatban ismertetett kísérleti munka célja a baromfi génmegőrzéshez, azon belül is a különös kihívást jelentő nőivar megőrzéséhez is kapcsolódva egy interspecifikus recipiens létrehozása, amely sterilitása révén alkalmas lehet más fajtától származó embrionális sejtek befogadására, így optimális esetben kizárólag a megőrizni kívánt fajta genetikai anyagát örökítheti tovább.

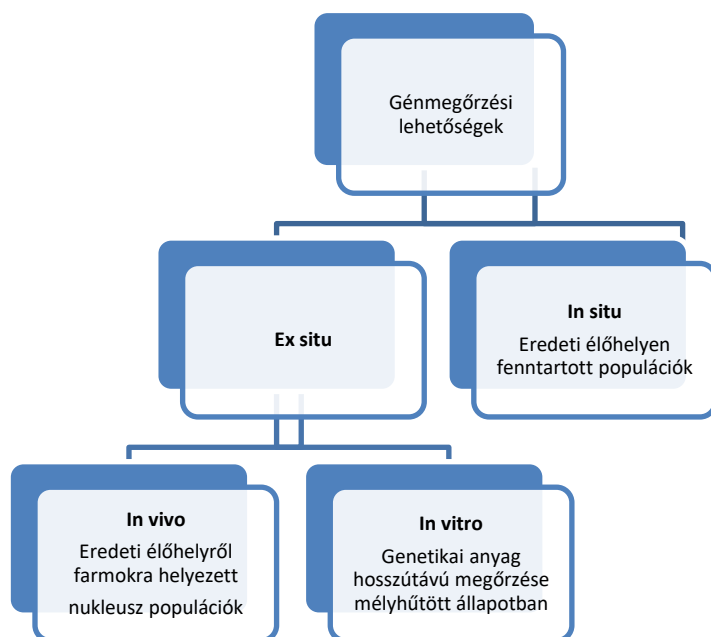
A kísérletsorozat főbb célkitűzései:

- gyöngytyúk és házityúk fajhibridek előállítása gyöngytyúk tojó x házityúk kakas és gyöngytyúk kakas x házityúk tojó keresztezésével
- a létrehozott hibridek sterilitásának és a donor ősvarsejtek befogadására való alkalmasságának vizsgálata
- a hibridek alkalmasságának tesztelése GFP-vel jelölt ősvarsejtek injektálásával
- az injektált donor eredetű ősvarsejtek jelenlétének vizsgálata ivarszerveik szövettani, illetve immunhisztokémiai vizsgálatával embrionális korban és ivarérett egyedek esetében

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A génmegőrzés jelentősége és lehetőségei

A génmegőrzési munka célja a köztenyésztésből kiszorult és veszélyeztetett fajták vagy populációk fenntartása, valamint a rájuk jellemző, genetikailag meghatározott tulajdonságok megőrzése. Haszonállatok esetében a biológiai változatosság megóvása különösen fontos feladat, mivel az intenzív gazdálkodási rendszerek és azok körülményeihez jól alkalmazkodó fajták elterjedésével az őshonos fajaink és fajtáink - a számos előnyös és értékes tulajdonságuk ellenére (Szalay és Kovácsné Gaál 2008, Padhi 2016) - egyre kisebb szerepet kapnak a mindennapi gazdálkodásban, így fenntartásuk nem valósulna meg génmegőrzési munka nélkül. A génmegőrzés történhet a populációk eredeti, természetes élőhelyén való fenntartásával (*in situ*), mint például magyar szürke szarvasmarha állomány fenntartása a Hortobágyon, valamint természetes élőhelyükről kiragadva (*ex situ*) (1.ábra). Ez utóbbi jelentheti az élő nukleusz populációk fenntartását (*ex situ in vivo*), mint például az NBGK-HGI-ben, illetve nemzeti parkokban fenntartott állományokat vagy a genetikai anyag mélyhűtött, hosszú távú megőrzését (*ex situ in vitro*), például szövetek, korai embrionális sejtek, sperma, DNS minták formájában vagy akár nukleotid szekvencia adatok segítségével (*in silico*). Mindezek mellett megemlíthető a génmegőrzési munka valamennyi típusát és szintjét átszövő, írásos vagy képes anyag formájában, nyomtatásban megjelent archív anyagok feldolgozását jelentő *in libro* tevékenység is (Szalay és Koppány 2017).



1. ábra: A genetikai anyag megőrzésének lehetséges módjai. (Barna et al. 2016)

Az élő populációk megőrzése (*in vivo*) a magas fenntartási költség, a hely-és munkaerőigény, valamint a számos környezeti kockázat (ragadozók, betegségek, természeti katasztrófák) miatt csak részben adhat megoldást, ezért fontos az értékes genetikai anyag minél teljesebb körű és minél biztonságosabb *ex situ in vitro* megőrzése is. Valamint a különböző stratégiák (*ex situ*, *in situ*) kombinálása hatékonyabbá teheti a genetikai diverzitás növelését, például az asszisztált reprodukció során a kis számban fogságban tartott egyedek szaporítása a vadon élő egyedektől gyűjtött minták felhasználásával vagy a mélyhűtve megőrzött génbanki minták használata vadon élő, alacsony egyedszámú fajok esetében (Fujihara & Inoue-Murayama 2024).

A genetikai információ mélyhűtéssel való tárolása és a genetikai diverzitás DNS-szintű vizsgálata fajtaazonosítási, tenyésztési, génmegőrzési, valamint kutatási célokat is szolgál. Egy biztonságosan megőrzött fajta az *in vivo* állományok és az *in vitro* génbankokban megőrzött örökítő- és szaporítóanyag segítségével felszaporítható és abból termelő állomány hozható létre. A génbanki megőrzés emlősök esetében jóval kidolgozottabb, számos faj esetében rutinszerűen alkalmazható technikák állnak rendelkezésre, melyek csak részben vagy egyáltalán nem adaptálhatók madár fajokra, tekintve azok jelentősen eltérő szaporodásbiológiai tulajdonságait. A mélyhűtési módszerek fajspecifikussága miatt fajokra vagy akár fajtákra specializált, megbízhatóan alkalmazható hűtési paramétereket megadó protokollok kidolgozása szükséges. Emellett a tojás nagy mérete, magas fehérje- és lipid tartalma miatt nem alkalmas mélyhűtésre, így a nőivar és általa a teljes genetikai anyag megőrzése irányuló génmegőrzési kutatások jelenleg elsősorban embrionális őssejtek, illetve naposkori ivarszervszövetek kinyerésére, biztonságos tárolására és felhasználási lehetőségeire fókuszálnak (Liptói *et al.* 2013, Patakiné Várkonyi *et al.* 2016), bővítve az ehhez kapcsolódó populációgenetikai, szaporodásbiológiai és molekuláris biológiai ismereteket, ezáltal hosszú távon is hozzájárulva a biodiverzitás fenntartásához.

4.2. A génmegőrzés szempontjából fontos madár szaporodásbiológiai sajátosságok

A madarak számos, az emlősökétől eltérő szaporodásbiológiai sajátossággal rendelkeznek, amik nagyban meghatározzák a velük kapcsolatos génmegőrzési módszerek és kutatások irányát, illetve lehetőségeit.

Talán a legnyilvánvalóbb szaporodásbiológiai eltérés a tojással való szaporodás, ami miatt az emlősök esetében alkalmazható technikák, mint például a petesejtek, embriók mélyhűtése, a szomatikus sejtmag vagy embrió átültetése, valamint az *in vitro* fertilizáció madarak esetében a gyakorlatban nem, csak kísérleti körülmények között, kutatási célokra alkalmazhatók, így a génmegőrzési célok eléréséhez alternatív módszerek kidolgozása szükséges.

Szintén jelentős eltérés az emlősök és madarak között, hogy utóbbiak esetében a nőivar a heterogametikus (ZW), a hímivar pedig a homogametikus (ZZ). Ez a tulajdonság további kihívást jelent a génmegőrzés során, ugyanis a hímivar megőrzése a mára már több baromfifaj, illetve fajta esetében biztonságosan és hatékonyan alkalmazható ondómélyhűtési technológiával – a nőivarban jelen levő W kromoszóma és mitokondriális DNS hiányában - önmagában nem biztosítja a teljes genetikai anyag megőrzését, azonban jól alkalmazható például egygénes tulajdonságok megőrzéséhez.

A madarak ivardeterminációja is alapvető eltéréseket mutat az emlősökhöz képest, azonban pontos mechanizmusa jelenleg sem ismert részletesen. Míg emlősök esetében az „Y” kromoszómán található egy már azonosított, transzkripciós faktort produkáló, korán expresszázó, rövid ideig aktív gén, ami biztosítja a heterozigóta ivar determinációját, illetve differenciálódását, madarak esetében ehhez hasonló gén jelenleg nem ismert. Emellett több eredmény utal arra, hogy az emlősök „X” kromoszóma-inaktivációjának megfelelő mechanizmus (hím madarakban az egyik „Z” kromoszómához kötött gének expressziójának gátlása) madarak esetében nem bizonyított és/vagy a heterozigóta nőstényekben nem jelentkezik a dóziskompenzáció, azaz a „Z” gének expressziójának megduplázódása (Mank & Ellegren 2009).

Továbbá az is feltételezhető, hogy a halakhoz, hüllőkhöz és kételtűekhez hasonlóan, madarakban is már a gonádok korai szövetfejlődési folyamatai során fontos szerepet játszanak a szexuálissteroidok, míg emlősök esetében ezek szintézise csak később indul meg és az ivarszervek már differenciált fejlődése során hímeiben főként tesztoszteron, nőstényekben pedig ösztrogének szintetizálódnak. (Lun *et al.* 1998, Wolf 1999, Villalpando *et al.* 2000).

Az embrionális fejlődés kezdete során a genetikailag hím, illetve nőstény embriók gonád kezdeményei morfológiailag még nem elkülöníthetők, majd a későbbiekben a here és a petefészkek szövettanilag is jellemezhető differenciálódásának kezdete a vizsgált madárfajokban azonos embrionális fejlődési stádiumra (HH28-30) esik. Ez házityúk esetében például az 5,5-6,5. (Romanoff 1960), fűrjben az 5., kacsában a 7. keltetési nap körül következik be. Emlősök esetében a már említett, a heterozigóta ivar differenciálódását biztosító gén felelős a here korábbi kialakulásáért (Péczy 2013).

4.2.1. Nőivar

Jelentős, kizárólag a nőivarra jellemző különbségek is felfedezhetők az ivarszervek fejlődésében. Az emlősökkel ellentétben [néhány kivételtől eltekintve, mint a kivi (Kinsky 1971), egyes sólyom- és héjafélék, keselyűk, sasok (Jacob & Bakst 2007)] madarak esetében a

gonádfejlődés erősen aszimmetrikus, mivel a kezdeti szakaszban kialakuló két petefészek kezdemény közül a jobb oldali csak a keltetés 10-12. napjáig növekszik, aztán később fokozatosan, néhány sejtréteg vastagságú lemezzé fejlődik vissza, így a madarakra jellemző, kifejllett petefészek páratlan, a bal oldalon elhelyezkedő szerv.

Eltérés tapasztalható a különböző állatfajok spermiumtároló képességét illetően is. Annak ellenére, hogy denevéreknél előfordul akár 6 hónap tárolási idő is (Racey 1979), emlősök esetében a spermiumok viszonylag rövid ideig, általában csak néhány napig tárolódnak. A madarakra viszont általánosan jellemző a nőtények petevezetőjének spermiumtároló funkciója, a hüllők pedig, mint például a teknősök, kígyók és alligátorok, akár évekig is tárolhatják az ivarsejteket (Birkhead & Møller 1993, Holt 2011), megőrizve azok termékenyítő képességét is, ami lehetőséget ad utódok létrehozására szaporodási időszakon kívül is, újabb párzás nélkül.

A madarak petevezetőjében a méh és a hüvely közötti szűkület (*utero-vaginalis junctio*) hosszanti irányú redőzöttséget mutat, itt találhatók azok a csöves, mirigyszerű képletek, az úgynevezett tubulusok, amik az elsődleges spermiumtároló funkciót látják el. Számuk, illetve méretük fajoként eltérő, pulykában például 30 000, míg házityúkban kb. 5 000 ilyen képlet található, ez szorosan összefügg a fertilis periódussal, azaz több tároló tubulus hosszabb periódust eredményez (Birkhead & Møller 1992). A termékenyítés (ami lehet természetes párzás vagy mesterséges megtermékenyítés) során a hüvelybe kerülő mintegy 10-50 vagy akár több százmillió spermium nagy része a kloákán keresztül kiürül és csupán 1-2 %-uk raktározódik a tubulusokban a vaginában zajló – eddig nem minden részletében ismert – szigorú szelekciós mechanizmusok révén (Bakst *et al.* 1994), a spermiumok termékenyítő képességét is megőrizve és optimalizálva. Másodlagos spermiumtároló tubulusok találhatók a petevezető infundibuláris szakaszában (Wishart & Horrocks 2000), azonban nem bizonyított, hogy a spermiumok mindkét raktározó szervrészbe bekerülnek-e, de feltehetőleg az *infundibulum* tubulusai is elsősorban szelekciós funkciót látnak el, raktározó szerepük kevésbé jelentős (Bakst 2002).

4.2.2. Hímivar

Hímek esetében az ivarszervek elhelyezkedése, illetve felépítése is jelentős eltérést mutat az emlősök és a madarak összehasonlításakor. A madarak heréi a hasüregben, a vesék alatt helyezkednek el, ebből adódóan testhőmérsékleten (38-40°C) funkcionálnak. Felépítésüket tekintve a here állománya nem tagozódik lebenyekre, intersticiális kötőszövetből és kanyarulatot csatornácskákból áll, ez utóbbiak folytonos, egymást összekötő csőhálózatot alkotnak és nem vakon végződnek, ahogy az emlősök esetében.

A spermiumok morfológiáját tekintve a madarak között nagy változatosság fedezhető fel, de általánosságban véve hasonlóságot mutat a hüllőkével, azaz a nyaki rész kevésbé kifejezett, mint az emlősök esetében, valamint a fej és a közepdarab kapcsolata kevésbé összetett (Péczy 2013).

További különbségként megemlíthető, hogy madarak esetében a mellékherének kisebb szerepe van a spermiumok tárolásában és maturációjában is, mind a tárolási időt (emlősök esetében a spermiumok 1-2 hétig tartózkodnak a mellékherében, japán fürj esetében például csak 2 órát) (Clulow & Jones 1982), mind pedig a raktározott mennyiséget tekintve (az érett spermiumok csupán 10%-a raktározódik itt), ugyanis madaraknál az ondósejtek elsődleges tárolóhelye az ondóvezető, ahol a heréből kikerülő spermiumok mintegy 90%-a raktározódik. Az érett ivarsejtek viszonylag rövid ideig tárolódnak itt, például japán fürjben csupán 1-2 napig, míg patkányban például 9 nap az optimális tárolási idő.

Hím madarak esetében a kloáka bizonyos részei funkcionálnak párzószerként. A kizárólag struccféléknél, tinamuféléknél, lúdalakúaknál és tyúkalakúaknál előforduló valódi párzószer (*phallus*) is a hüllők számos fajára jellemző képlettel igen hasonló felépítésű. Megkülönböztethető a valódi *phallus* kiölthető - pl. víziszárnyasokra jellemző – típusa (*phallus protrudens*), ami általában tömlőszerű, változó mértékben spirálisan balra csavarodó képlet, valamint nem kiölthető (*phallus non protrudens*) - pl. házityúkra, énekesmadarakra jellemző - típusa.

Annak ellenére, hogy egyes szakirodalmi adatok szerint a madár spermiumoknak nincs szüksége több órás vagy napos érési folyamatra (Olsen & Neher 1948), valószínűsíthetően a megtermékenyítés előfeltételeként madarak esetében is elengedhetetlen, az emlősökétől eltérő és gyorsabb, nem teljesen tisztázott folyamat a kapacitáció, valamint az acrosoma reakció.

A madarak spermatogenezise során 10, az emlősöké során pedig 14 stádium különíthető el (Aire 2011) és a folyamat hossza is rövidebb a madarak esetében (például japán fürjnél egy ciklus tartama 2,7 nap, emlősöknél kb. 11 nap). A spermiogenezis folyamata is hasonló eltérést mutat: kakasok esetében 12 nap, kérődzőknél 49 nap (Wolfné Táskai 2000).

4.2.3. Termékenyülés

A madarak szaporodási ciklusa általában évente ismétlődő, szezonálisan jelentkező folyamat, amit receptor-rendszereken és hormonális vezérlő mechanizmusokon keresztül több faktor (mint például a hőmérséklet, csapadékeloszlás, táplálékhiány) is szabályoz (Dawson *et al.* 2001). Alkalmazkodik a kedvező időjárási és éghajlati viszonyokat jelző napi fénytartam változásokhoz, aminek növekedése fokozza a legtöbb életműködést, de azok közül leginkább a reprodukcióra

gyakorolt hatása (foto-gonado-stimuláció) jelentős. Ez nagyban befolyásolja például a párkeresés, a fészeképítés, a tojások rakásának és költésének kezdetét, vonuló madarak esetében a tavaszi és őszi vonulások idejét. A szaporodási ciklus kezdetét jelentő optimális fényviszony fajonként, sőt egy fajhoz tartozó, de földrajzilag elkülönült populációkat tekintve is eltérő.

Az éves ciklus során egy bizonyos idő elteltével a fényviszonyok stimuláló hatását felváltja a fény által nem stimulálható, a gonádműködésre gátló hatású állapot (fotorefraktoritás), mely azok atrofiájához vezet, ez például énekesmadarak esetében egybe esik az éneklés megszűnésével. A fény stimuláló hatásához hasonlóan, a fotorefraktoritás kialakulásában is számos, nem fotikus hatás is szerepet játszik (Moore I.T. *et al.* 2006; Dawson & Sharp 2007; Small *et al.* 2008) és alapvetően két típusa különíthető el. A korábban vizsgált énekesmadarak zömére jellemző, hogy a gonádok regressziója már a leghosszabb nappal, a nyári napforduló előtt bekövetkezik és a mesterségesen megnövelt megvilágítás nem eredményezi a gonádok újbóli aktivitását (abszolút fotorefrakteritás). (Hahn *et al.* 2009) A másik esetben (relatív fotorefrakteritás), például a házityúkra is jellemző módon, ha a megvilágítás hossza csökken, bekövetkezik a gonádok regressziója, azonban a fénytartam növelésével visszaállítható a szaporodó képesség (Robinson & Follett 1982; Wada 1993). A baromfi fajok szaporodási időszakában számos tojásrakási periódus van, ez házityúknál 9 tojás lerakását jelenti, ezek között 1-2 napos szünetekkel, a tojóhibridekben pedig gyakorlatilag folyamatos tojástermelést lehetett kialakítani az erre irányuló szelekcióval és az ehhez megfelelő takarmány és fényviszonyok biztosításával.

A nőtények spermiumtárolási képességéből adódóan madarak esetében nem szükséges a kopuláció és ovuláció szinkronizálása. Madaraknál akár 10-40 nap is eltelhet a párzás és a gaméták egyesülése között (fertilis periódus), míg emlősöknél viszonylag rövid idő (24-72 óra) elteltével következik be a megtermékenyülés, melynek helyszíne madaraknál az *infundibulum* területe, ide jutnak fel a petevezetőn keresztül a tubulusokból szakaszosan ürülő, mozgási képességüket visszanyerő, így az emlősöktől eltérően reverzibilis immobilizációra képes spermiumok (Barna 1998).

A termékenyülés során számos állat, így például az emlősök, tüskésbőrűek és valódi csontoshalak esetében egy spermium hatol be a petesejtbe és a két sejtmag egyesülése hozza létre a diploid utódgenomot (monospermia), összetett mechanizmusok által gátolva a két vagy több hímivarsejt bejutását, ami általánosságban véve letális az utódra nézve. A gerincesek körében azonban a monospermianál elterjedtebb a polispermia, mely számos hal, hüllő és kétéltű mellett a madarakra is jellemző termékenyülési mechanizmus. Ennek során számos spermium hatol át a petesejt membránján, például házityúk esetében általában 20-60 darab hímivarsejt található a citoplazmában, azonban ezek közül csak egy spermium vesz részt a zigóta

létrehozásában, ennek ellenére a nem termékenyítő spermiumok jelenléte jelentős szerepet játszik a termékenyülés sikerességében, bár ennek oka és pontos mechanizmusa jelenleg tisztázatlan. (Mizushima 2017)

4.2.4. Mesterséges termékenyítés

A mesterséges termékenyítésnek jelentős szerepe van mind a gazdasági haszonállatok tenyésztésében, mind pedig a ritka vagy veszélyeztetett madárfajok esetében a megőrzési programok során. Első sikeres alkalmazása madarak esetében mintegy száz évre tekint vissza (Ivanov 1913), mára pedig az iparszerű baromfitartás szerves részét képezi, valamint számos egyéb madárfaj (például vízimadarak, futómadarak, ragadozók, darufélék, verébalakúak, papagájok) esetében is hatékonyan adaptálták (Gee 1995).

Az eljárás számos előnyének egyike, hogy alkalmazásával meghatározhatók a szülőpárok, azaz mi dönthetünk arról, hogy melyik párosítás lenne a legjobb termelési/genetikai szempontból. Ez azért előnyös, mert néhány házasított madárfaj (pl. a házilúd) természetszerű tartásban egy életre szívesen választ magának párt, és attól nem tér el, amíg a párja életben van. A minél nagyobb produktivitást elváró ipari termelés során alapvetően nem cél, sőt hátrányt is jelenthet egy adott nőtény és hím kizárólagos párba állása, valamint a gazdasági szempontok mellett genetikai okok is indokolják az asszisztált reprodukciót.

Az asszisztált reprodukció, így a mesterséges termékenyítési eljárás megfelelő alkalmazása során a nemi úton terjedő betegségek egyik állatról a másikra való átvitelének lehetősége csökkenthető.

A mesterséges termékenyítés megkezdése előtt a tojók több hetes, akár hónapos elkülönítésére is szükség van annak érdekében, hogy a korábban tárolt spermiumok kiürüljenek és a mesterségesen bejuttatott spermiumok termékenyítsenek, valamint a lehető legtöbb és legjobb minőségű ondó nyeréséhez a hímek előzetes trenírozása, azaz az eljáráshoz való hozzászoktatása is szükséges (Barna *et al.* 2020). Ezt követően a termékenyítési eljárás fő lépései: az ondó nyerése, annak biológiai minősítése (például spermiumkoncentráció, az előforduló morfológiai rendellenességek és az élő/holt sejtek arányának megállapítása, valamint a motilitás megítélése), megfelelő hígítása és tárolása, valamint a nőtény madárba történő szakszerű bejuttatása.

Az ondó levételének legpraktikusabb és leggyakrabban alkalmazott módja a *dorso-abdominális* masszázstechnika (Burrows & Quinn, 1935), melynek során lényegesen több ondó nyerhető, mint amennyi a természetes ejakuláció alkalmával ürül, feltehetőleg az aktuálisan tárolt teljes napi ondómennyiséget is megközelítheti. Azonban az így nyert ondó hígabb lehet,

mint a párzáskor ürülő, mivel az eljárás során több-kevesebb plazma szűrlet is kiperéselődik. Kakasok esetében ezzel a módszerrel levehető ondó mennyisége 0,3-0,8 ml (Péczy 2013) és általánosságban heti 2-3 alkalommal végezhető, azonban a fajokon és akár fajtakon belül is eltérések lehetnek. Hígítás nélkül, a madárondo kevesebb, mint egy órán át tárolható jelentős minőségi romlás nélkül. Rövid távú tárolása (4-5°C-on 6-48 órán át) pedig szállítás, illetve *in vitro* minőségvizsgálat esetén alkalmazható. A spermiumok életképességének megőrzéséhez és az inszeminálható tojók számának maximalizálásához elengedhetetlen az adott fajnak megfelelő hígító hozzáadása és hosszabb távú megőrzési programok során a megfelelő mélyhűtési technológia alkalmazása is.

A madarakra jellemző bal oldalon elhelyezkedő petefészek miatt a kloáka középső, *urodeum* szakaszában bal oldalon nyíló vaginába történő inszeminálás szükséges, ami leggyakrabban termékenyítő pipettával történik, bár bizonyos kisebb testű fajoknál a spermiumok bejuttathatók közvetlenül a kloákába is (ez a legkönnyebb és legstresszmentesebb módszer, azonban a termékenyülési arány kisebb). Ezen kívül a spermiumok bejuttathatók a magnumba is, ez utóbbi elvégzéséhez azonban érzéstelenítés és endoszkóp szükséges, továbbá korlátozza a tojók spermiumszelekciós lehetőségeit és nagyobb fertőzésveszéllyel járhat (Lorenz & Ogasawara 1968). Az eljárás időzítésekor figyelembe kell venni a tojók szaporodási ciklusát, a termékenyítés ideális ideje a tojásrakást követő néhány órás időszak. Gyakoriságát befolyásolja a tojó fertilis időszakának hossza, a baromfiiparban rutinszerűen 5-7 naponta végzik, azonban rövidebb periódusú fajoknál, illetve mélyhűtött sperma alkalmazásakor 2-3 napos gyakorisággal szükséges. (Barna *et al.* 2020)

4.3. Mindkét ivar megőrzése embrionális sejtek segítségével

Az őssejtek folyamatos önmegújító képességgel rendelkeznek, szimmetrikus és aszimmetrikus osztódásra egyaránt képesek és több típusukat különböztethetjük meg. A megtermékenyített petesejt a legkorábbi, még teljességgel differenciálatlan, „mindentudó” őssejt, azaz egy teljes egyed bármilyen sejttípusa létrejöhet belőle (Németh és Góczy 2014). Az embrionális fejlődés során az első néhány osztódást követően, a korai blasztociszta állapotig az embriót alkotó sejtek totipotensnek tekinthetők. Ezután a sejtek funkciója specializálódik: a külső sejtréteg sejtjei a későbbiekben extraembrionális szöveteket létrehozó trofektoderma sejtekké alakulnak, míg az embrió belsejében található (ICM) sejtek pluripotensek maradnak, vagyis képesek a kifejlett egyed bármelyik testi sejtjének vagy ivarsejtjének kialakítására. Az ICM sejtek egy része tovább differenciálódva létrehozza a hipoblaszt sejtréteget, másik részük epiblaszttá alakul (Nichols & Smith 2009). A „késői” epiblaszt eredetű sejtekből (EpiSC)

kiindulva hozhatók létre *in vitro* sejtenyésztésben fenntartható pluripotens embrionális eredetű őssejtvonalak (ESC) (Alev *et al.* 2013). A gasztruláció során az epiblasztból kialakul a három embrionális csíralemez (endoderma, mezoderma, ektoderma), ezt követően endoderma eredetű sejtek vándorolnak a hipoblaszt egy extra-embrionális területére. Ez a régió a germinális félhold, ahol a már specializálódott őssejtek, az ősvarsejtek is nagyobb számban azonosíthatók és melyeket ekkorra már unipotensnek nevezünk, azaz ezek a sejtek már csak egyféle sejtípus (ivarsejtek) létrehozására lesznek képesek.

Házityúk esetében a megtermékenyítés és a tojásrakás között 24-26 óra telik el, így az ez idő alatt zajló barázdálódás és a korai gasztruláció madarak esetében a nőivarú egyedben, a gasztruláció második fele és az organogenezis pedig már a tojásrakást követően, a tojó szervezetén kívül megy végbe. (Péczy *et al.* 2007) A házityúk embrionális fejlődését a megtermékenyítéstől a primitív csík kialakulásáig Eyal-Giladi és Kochav (1976) írta le tizennégy stádiumot elkülönítve és római számokkal jelölve azokat I-XIV-ig (Eyal-Giladi & Kochav 1976). E besorolás szerint tojásrakáskor az embrió X-es stádiumban van. A további fejlődést, a tojás lerakását követő inkubációval kezdődően a kelésig Hamburger és Hamilton (1951) írta le arab számokkal 46 stádiumot meghatározva (Hamburger & Hamilton 1951), melyek közül az első átfedésben van az Eyal-Giladi & Kochav (1976) által meghatározott X-XIV. szakasszal. (Jacobson 1989).

4.3.1. Blasztodermális sejtek (BC) felhasználása

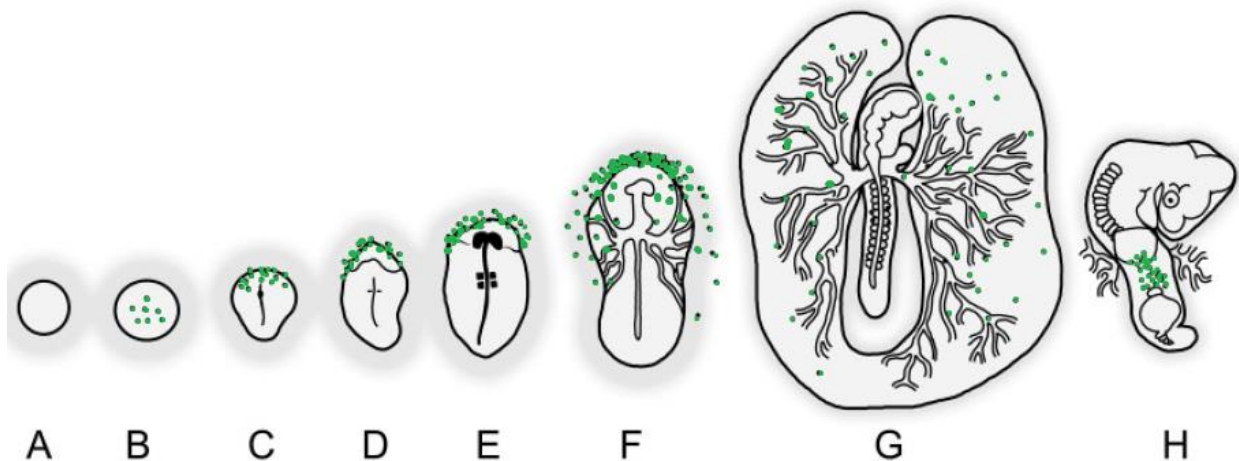
A megtermékenyített, de nem inkubált X. stádiumú (Eyal-Giladi & Kochav 1976) tojások csírákorongja kb. 50 000-60 000 pluripotens, aktív mitotikus állapotban lévő, megújulásra és osztódásra képes blasztodermális sejtet (BC) tartalmaz (Perry 1987). Pluripotenciájukat Spratt és Haas (1961) bizonyította, mikor egy blasztodermát négy egyenlő részre darabolt és mind a négy darab képes volt normál embrió létrehozására, majd Marzullo (1970) számolt be arról, hogy donor eredetű blasztodermális sejtek recipiens embrióba injektálva képesek azt kolonizálni, azonban életképes utódot nem kapott.

A blasztodermális sejtek széleskörű differenciálódási képességük által mind a szomatikus szövetek, szervek, mind pedig az ivarsejtek kialakulásában részt vesznek és a teljes genetikai programot tartalmazzák. Hosszú távú tárolásuk és felhasználásuk lehetőséget ad a nőivar, ezáltal a teljes genetikai anyag megőrzésére, azonban mivel bármilyen testi szövet kialakításában részt vehetnek, az *in vitro* génmegőrzés során kisebb hatékonysággal használhatók fel, mert recipiens embrióba ültetésüket követően a létrehozott kimérák csak kis hányada lesz ivarszervi kiméra (a kimérák előállításával a 4.3.5. fejezet foglalkozik), ami tovább tudná örökíteni a donor

genotípust. A blasztodermális sejtek használata labortechnikailag viszonylag egyszerű, a donor tojás csírákorongjának eltávolításával és a sejtek lemosásával nyerhetők ki, mélyhűtéssel hosszú távon megőrizhetők, valamint recipiens embrió csírákorongjába injektálhatók.

4.3.2. Az ősvarsejtek (cPGC, gPGC) felhasználása

A génmegőrzés során felhasználható másik, unipotens sejtípus az őscsírsejt (PGC; primordial germ cell), amelyből az ivarsejtek fejlődnek ki, így képes a genetikai információ továbbítására a következő generációba (Ichikawa 2023). Ezek vizsgálatával Wentworth és munkatársai (1989) foglalkoztak először. A PG sejtek először az epiblaszt központi régiójában azonosíthatók, ekkor a lerakott (X. stádiumú) tojásban 30-130 db ősvarsejt található (Kochav *et al.* 1980), majd az első sejtosztódási periódusuk a hipoblaszt egy kitüntetett helyén, a germinális félholdban kezdődik meg. Innen jutnak a fejlődő embrió érhalózatába a HH9-es stádiumtól kezdődően, majd a véráramon keresztül az ivarszervkezdeményhez vándorolnak (Simkiss 1990), HH15-17-től kezdődően pedig a keringésből kilépve megtelepednek ott és kolonizálják azt (2. ábra).



2. ábra: A házityúk primordiális ősvarsejtek vándorlása a fejlődő embrióban: A PGC-k vándorlásának sematikus ábrája a tojásrakástól a gonádkezdeményekben való megtelepedésükig: az ősvarsejtek megjelenése a X-XIII. stádiumban (A-B) kezdődik, majd a germinális félhold területén történik az első jelentős sejtosztódási periódusuk (C-E). Ezt követően a PGC-k bejutnak a vérszigetekre (F), majd HH10-es stádiumtól belépnek az embrió érhalózatába (G) és a HH15-17 stádiumtól kilépnek a keringésből, majd a fejlődő ivarszervekhez vándorolnak (H). Szerkesztve Mozdziaik & Petite (2004) nyomán

Mivel kizárólag az ivarsejtek kialakításában vesznek részt, ezek felhasználásával nagyobb arányban állíthatók elő ivarszervi kimérák. Kinyerésük történhet a véráramban történő keringésük ideje alatt (cPGC) vagy későbbi stádiumban az embrionális ivarszervekből (gPGC, GGC) (Petitte 2006), jól mélyhűthetőek, sejttenyészetben fenntarthatók, illetve felszaporíthatók,

átültethetők recipiens embrióba. Ezáltal lehetőség nyílik a genetikai anyag (akár módosított genetikai anyag) egy lépéssel történő átvitelére az utódgenerációba (Simkiss *et al.* 1989).

A PG sejtek véráramból történő kinyerésének és az izolált sejtek recipiens embrióba injektálásának optimális ideje házityúkban HH13-16. közötti időszak (Hamburger & Hamilton 1951), mivel koncentrációjuk ez idő alatt a legmagasabb a véráramban, a gonádokból való izolálásuk pedig a HH27-31. stádiumokban a legsikeresebb.

Az ősvarsejtek injektálásának technikája elméletileg minden madárfaj esetében ugyanúgy alkalmazható, azonban például az ablak nyitása a tojások különbözősége miatt fajok között is eltérő lehet és befolyásolhatja a keltethetőséget. Ezen túl az izolálás és injektálás optimális ideje, azaz hogy mikor éri el az embrió az eljárás szempontjából optimális stádiumot, függ a kelési idő hosszától, amely fajonként eltérő lehet, így szükséges annak előzetes meghatározása is.

4.3.3. Az ősvarsejtek fenntartása sejtenyészetben

Ahogy az előző fejezetekben már említésre került, az EG&K X. stádiumú tojás csírákorongjában viszonylag nagy mennyiségben (50-60 000 sejt) állnak rendelkezésre a blasztodermális sejtek, onnan könnyen kinyerhetők, azonban ivarszervi kimérák létrehozására kevésbé alkalmasak, mivel a sejtek kis része véletlenszerűen épül be a recipiens ivarszervébe. Emellett a génmegőrzés során fontos szempont, hogy a felhasználni kívánt sejtek hosszú távon megőrizhetőek, illetve sejtenyészetben is fenntarthatók legyenek.

Pluripotens, folyamatosan osztódó embrionális eredetű sejtvonalat (ESC) elsőként blasztula állapotú egér embriókból (Evans & Kaufman 1981, Martin 1981, Nichols *et al.* 1990), madarak esetében pedig házityúk és fűj embriók felhasználásával hoztak létre Pain és munkatársai (Pain *et al.* 1996). Munkájuk során megállapították, hogy az ES sejtek sejtenyészetben történő hosszú távú fenntartása kizárólag LIF-et (leukémia inhibíciós faktort) tartalmazó tápoldatban sikeres, máskülönben a sejtek különböző fejlődési irányokba (ektoderma-, mezoderma- vagy endodermaszerű sejtekké) differenciálódnak. A tenyésztési körülmények javítására irányuló későbbi módosítások ellenére is elmondható, hogy ezek a sejtek a hosszú távú tenyésztés során egy idő után elveszítik pluripotenciájukat (6-9 hónap), ezzel együtt ivarsejtekké történő differenciálódási képességüket is, ezért már a tenyésztés korai szakaszában szükséges a sejtek lefagyasztása. Ezért a baromfifajok genetikai anyagának megőrzésére irányuló ES sejtenyésztési módszer csak mélyhűtési technológiával kombinálva lehet sikeres (Whyte *et al.* 2016).

A kiméraelőállításra, így a baromfi génmegőrzési célokra jobban megfelelő PG sejtek esetében is fontos kutatási feladat ezen sejtek hosszú távú megőrzésének kidolgozása is. Mivel az embrionális fejlődés korai szakaszában ezek az ősvarsejtek kisebb számban (300-400 db)

találhatók meg, az injektáláshoz szükséges optimális sejtszámot kezdetben több egyedtől származó sejtek keverésével érték el, azonban ez nem oldotta meg a sejtenyészetben való hosszú távú fenntartást, valamint a génmegőrzési munka során elengedhetetlen, hogy a genetikai információ egyedenként, önmagában is rendelkezésre álljon.

Chang és munkatársai (1995) elsőként hoztak létre *in vitro* ősvarsejt-tenyészetet, melyet 4 napig tudtak sikeresen fenntartani, megőrizve a sejtek csíravonal specifikusságát. Annak ellenére, hogy az általuk alkalmazott médium növekedési faktorokat és szérumot is tartalmazott, használata nem terjedt el az elért sejtosztódás túl lassú üteme miatt. Az ősvarsejtek hosszú távú fenntartására alkalmas technológia és az ahhoz szükséges tenyésztőmédium van de Lavoie *et al.* (2006) munkájához köthető. Eredményeik nagy előrelépést jelentettek a sejtenyészetek fenntartásának területén, azonban az általuk kifejlesztett médium nem volt alkalmas a tojótól származó, nőivarú sejtek fenntartására, ugyanis ezek osztódása elmaradt a hímivarú sejtekétől és fenntartásuk is csak rövidebb távon volt sikeres. A későbbiekben, a sejtek jelátviteli útjaival és molekuláris biológiai információival kapcsolatos ismeretek bővülésének is köszönhetően, számos munka irányult az eljárás hatékonyabbá tételére (Choi *et al.* 2010, Macdonald *et al.* 2010, Miyahara *et al.* 2014, 2016), végül Whyte és munkatársai (2015) fejlesztettek ki egy táplálósejt- és szérummentes médiumot, ami mindkét ivartól származó sejtek felszaporítására és hosszú távú fenntartására egyaránt alkalmasnak bizonyult (Nandi *et al.* 2016).

Az említett, a PG sejtek tenyészetben történő felszaporítására és fenntartására irányuló kutatások a kezelhetőségére és tojástermelésére való tekintettel a kísérletekben leggyakrabban használt fajtát, a White Leghorn-t használták, így ezek a módszerek elsősorban erre a fajtára lettek optimalizálva. A génmegőrzési munka fontos feladata a meglévő módszerek adaptálása őshonos fajtákra, ugyanis nem csak fajok, hanem fajták esetében is eltérő eredményekkel alkalmazhatók a korábban egyéb fajtára kidolgozott eljárások, így minden esetben szükség van az adott fajtától származó PG sejtek igényeinek megfelelő, optimális tápközeg és technológia kifejlesztésére. Az őshonos magyar fajták közül az NBGK-HGI-ben elsőként a fogolyszínű magyar tyúkok esetében adaptálták a korábbi szakirodalmi adatoknak megfelelő hatékonysággal a sejtek tenyészetben való felszaporításának, mélyhűtésének és recipiens embrióba ültetésének módszerét. A hosszú távú cél a különböző fajokból, illetve fajtákból származó egyedi tenyészetek létrehozása és fajonként/fajtánként 50, ivaronként 20-25 ősvarsejt-vonalból álló génbanki gyűjtemény formájában való fenntartása (Patakiné Várkonyi *et al.* 2017).

4.3.4. Az ősvarsejtek hosszútávú tárolása mélyhűtéssel

A mélyhűtéssel való tárolás során a megőrizni kívánt sejteket, szöveteket, illetve szerveket hosszabb ideig 0°C alatti hőmérsékleten tartjuk, anélkül, hogy életképességüket és funkciójukat elveszítenék. Az eljárás a ló ondó hóban történő „fagyasztásától” és felmelegítésétől (Spallanzani, 1776) egészen a számítógép által vezérelt, különböző hűtési programokig fejlődött. Eközben megállapították, hogy a sejteken belüli, alacsony hőmérsékleten történő jégképződés okozza a sejtek elhalását, ezzel létrehozva a kriobiológia tudományát, melynek lényege a víz halmazállapot-változásának nyomonkövetése és biológiai hatásának vizsgálata. Ebből következik, hogy a mélyhűtési eljárások során szükséges a sejtek számára védő funkcióval rendelkező közeg használata, melyeket összefoglalóan krioprotektánsoknak nevezünk. A sejtek membránja féligáteresztő hártyaként működik, így külső és belső tere között ozmózis nyomáskülönbség lép fel, ami a koncentrációkülönbség kiegyenlítéséig az oldószer ki- és beáramlását, ezáltal a sejt zsugorodását vagy megduzzadását okozza. Megkülönböztethetünk kis molekulájú, intracelluláris krioprotektánsokat, melyek a sejteket a belsejükbe jutva védik, valamint nagy molekulájú, hatásukat a sejten kívüli közegben kifejtő, extracelluláris krioprotektánsokat. (Végi *et al.* 2017)

A megőrizni kívánt genetikai anyag mélyhűtése történhet lassú, egy lépcsős, lassú, több lépcsős 'zárt rendszerű' programozott (dinamikus) hűtéssel, gyors 'nyitott rendszerű' nitrogéngőzös statikus hűtéssel, ultragyors pellet-módszerrel vagy vitrifikációval, mely módszerek között az alapvető különbséget a hűtési sebesség adja. Programozott eljárások során a védőanyaggal kezelt minta folyékony nitrogénbe helyezését megelőzi egy számítógép által vezérelt hűtési program. A program végén elért hőmérséklet, azaz a folyékony nitrogénbe helyezés hőmérséklete eltérő a különböző eljárások között, ez határozza meg a sejtek dehidráldásának mértékét, ezáltal a későbbi sikeres felolvasztáshoz szükséges melegítési sebességet is. A nyitott rendszerű, statikus nitrogéngőzös eljárás során a minták hűtése a folyékony nitrogén gőzében történik, ennek sebessége a minta és a nitrogén szintjének távolságától függ, így nehezebben kontrollálható. A pellet módszer alkalmazásakor a hígított mintákat közvetlenül folyékony nitrogénbe vagy szárazjégre cseppentik, vitrifikációs eljárás során pedig a tárolókba adagolást követően közvetlenül folyékony nitrogénbe helyezik, ahol a különösen gyors hűtési sebességnek (2500-600 000°C/perc) és megnövelt viszkozitásnak köszönhetően a sejtekben lévő víz kristályosodás helyett hirtelen, üvegszerűen fagy meg (Palasz & Mapletoft 1996, Nawroth *et al.* 2002).

A mélyhűtési eljárások során is nehézséget jelent, hogy minden megőrizni kívánt faj, fajta, illetve sejttípus esetében meg kell határozni a megfelelő hűtési/felmelegítési sebességet, a

leghatékonyabb tárolási formát, valamint a szükséges krioprotektánsok koncentrációját, mivel ezek az anyagok optimális körülmények között védik a sejteket, azonban attól eltérő koncentrációban, illetve hőmérsékleten már toxikus hatásúak. (Cseh 1989).

A haszonállatfajok közül szarvasmarha, juh, nyúl és legújabban sertés esetében is már megbízható eljárást jelent az embriómélyhűtés, valamint az emlős embrionális sejtek mélyhűtése is megoldott, ami általában két lépésben történik. A sejtszuspenziót 10% dimetil-szulfoxidot (DMSO) és 15-20% magzati borjúsavót (FBS, FCS) tartalmazó médiumban -80°C-ra helyezik 24 órára, ezt követően folyékony nitrogénbe kerülnek, ahol gyakorlatilag korlátlan ideig tárolhatók (Patakiné Várkonyi *et al.* 2017).

Madarak esetében Naito és munkatársai (1994) számoltak be először fűjekből származó embrionális sejtek mélyhűtéséről, Reedy és munkatársai (1994) pedig házityúk embrionális blasztoderma sejteket mélyhűtöttek sikeresen. Ezt követően számos kutatás irányult a különböző védőanyagok és azok koncentrációjának összehasonlítására, valamint az optimális hűtési sebesség meghatározására (Moore D.T. *et al.* 2006, Sawicka *et al.* 2015, Setioko *et al.* 2007, Tonus *et al.* 2016). Eredményeik alapján elmondható, hogy madarak esetében az embrionális sejtek krioprezervációjához leginkább a lassú mélyhűtésen alapuló protokoll alkalmazható, ez - 2°C/perc hűtési sebesség mellett, 10% feletti szérumtartalmú, 5-10% közötti DMSO-t vagy etilén-glikolt tartalmazó fagyasztó médium használatával a legsikeresebb (Patakiné Várkonyi *et al.* 2017).

A vitrifikációs módszer lehetőségeit vizsgálták házityúk BC sejtek mélyhűtésére Patakiné Várkonyi és munkatársai (2012). Mivel nem kizárólag az ivarsejtek kialakításában vesznek részt, kimérák előállítása során nagyobb mennyiségű (800-1000 db) BC sejt beültetése szükséges, azonban ekkora mennyiségű sejt mélyhűtésére a vitrifikációs eljárás során általánosan használt eszközök nem alkalmasak. A kísérlet során a megfelelő mennyiségű sejt mélyhűtéséhez egy újdonságnak számító hálós hordozófelületet használtak, ezzel szignifikánsan jobb eredményt értek el, mint a pellet formában történő hűtéssel. Ősivarsejtek esetében a vitrifikációs módszer jelenleg kevésbé hatékony, azonban ennek fejlesztésére is több kísérlet irányult, ígéretes eredményekkel (Kohara *et al.* 2008, Tonus *et al.* 2017).

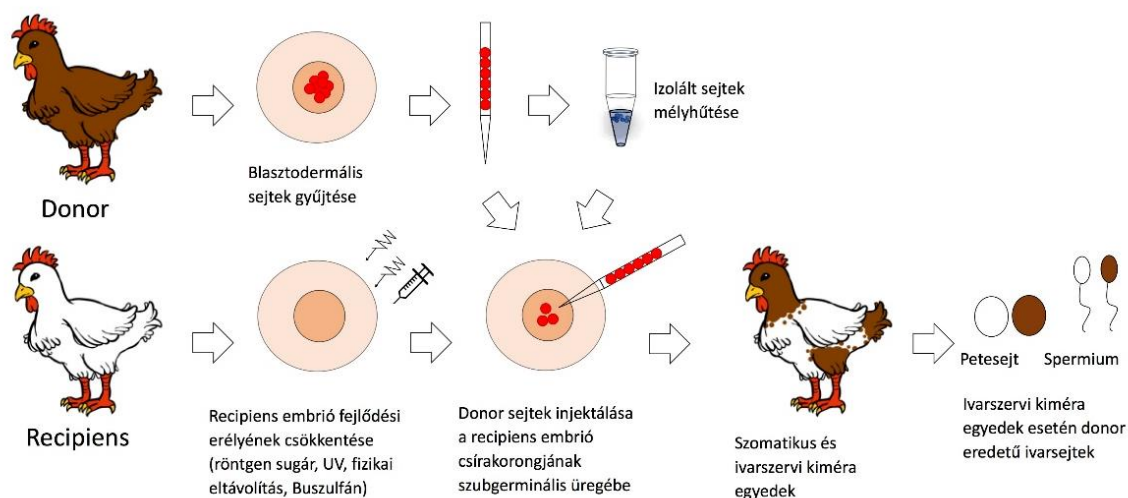
4.3.5. Kiméra előállítás

A kimérák két vagy több eltérő genotípusú (donor és recipiens) sejtvonalból álló szervezetek, melyek létrejöhetnek természetes úton vagy mesterségesen is előállíthatók. A fajok között előállított kimérák is nagy gyakorlati jelentőségük van. Például különböző regenerációs kísérletekben emberi őssejtek és állati embriók egyesítésével előállított kimérákat használnak

gyógyszereszek elvégzésére vagy humán szervek, szövetek előállítására. (Wu & Belmonte 2016).

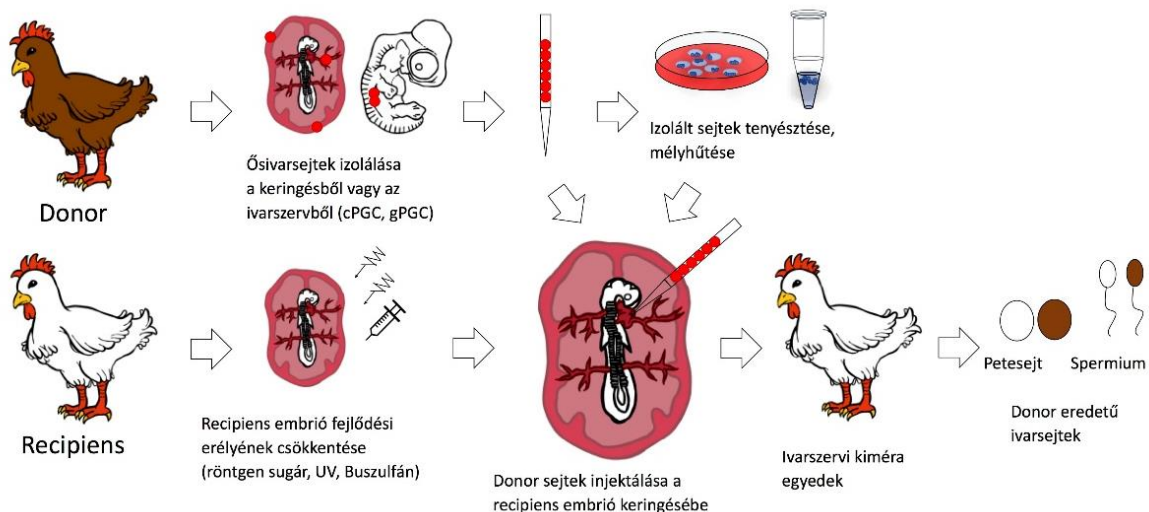
A madár *in vitro* génmegőrzés során a kiméra-előállítás ad lehetőséget a nőivar, így a teljes genetikai anyag megőrzésére. Az embrionális eredetű sejteket recipiens embrióba ültetve és a fejlődés során beépülve, a legkülönbözőbb szövetekben, szervekben megtalálhatók lesznek a bejuttatott sejtekből/szövetekből származó (donor eredetű) utódsejtek. (Gossler *et al.* 1986, Petite *et al.* 1990).

Kimérák előállításához jelenleg három különböző típusú embrionális sejtet használhatunk fel (Patakiné Várkonyi *et al.* 2017). Ahogyan korábban már említésre került, a donor tojások csírákorongjából nyert blasztodermális (BC) sejtek recipiens tojásokba injektálásával nagyobb arányban szomatikus és kisebb arányban ivarszervi (csíravonallas) kimérák állíthatók elő. A génmegőrzés során utóbbi, vagyis az ivarszervi kimérák előállítása a cél, mivel esetükben a donor genotípus az ivarsejtek kialakításában is részt vesz, így kétféle (recipiens és donor eredetű) genotípusú ivarsejtet termelhetnek. Két ivarszervi kiméra keresztezésével pedig a donor fajta genetikai állományával rendelkező utódokat kaphatunk, ezzel visszanyerve a megőrizni kívánt fajta genotípusát. (3. ábra)



3. ábra: Kiméra előállítása blasztodermális sejtek felhasználásával
(Patakiné Várkonyi *et al.* 2017, készítette: Pataki Luca és Lázár Bence)

Cirkuláló ősvarsejt (cPGC) vagy gonádból származó ősvarsejt (gPGC vagy GGC) recipiens embrióba injektálásával kizárólag ivarszervi kimérák hozhatók létre, így ezen sejtek alkalmazása hatékonyabb a génmegőrzés szempontjából. Ősvarsejtek esetében az izolálás és injektálás a sejtek véráramban való keringésének ideje alatt optimális, azaz a HH13-16. (Hamburger & Hamilton 1951) stádiumban, ami házityúk esetében a kb. 2,5 napos embrió jelent. (4. ábra)



4. ábra: Kiméra előállítása ősvarsejtek felhasználásával
(Patakiné Várkonyi et al. 2017, készítette: Pataki Luca és Lázár Bence)

Házityúk blasztodermális sejtek felhasználásával Petite és munkatársai (1990), Carsience és munkatársai (1993), Etches és munkatársai (1993), valamint Thoraval és munkatársai (1994) is sikeresen állítottak elő kimérákat. Bednarczyk és munkatársai (2002) egy lengyel őshonos tyúkfajta rekonstrukciójáról számoltak be, igazolva, hogy embrionális blasztoderma sejtek felhasználásával, az előállított kimérák által lehetséges a megőrizni kívánt fajta visszanyerése.

Számos korábbi munka irányult fajok közötti kimérák előállítására is. Naito és munkatársai (1991) házityúk embriókba fűrj blasztodermális sejtek injektálásával interspecifikus kimérákat hoztak létre, külső jegyeik alapján a kikelt utódok 8,1 %-a kimérának bizonyult. Li és munkatársai (2002) kacsá blasztodermális sejtek injektálását kísérelték meg White Leghorn X. stádiumú tyúktojásba, ennek eredményeként kaptak ivarszervi kiméra utódot, ezzel bizonyítva, hogy szükség esetén akár egy másik faj is megfelelő recipiens lehet a megőrizni kívánt fajta ivarsejtjeinek termelésére.

Az ősvarsejtek felhasználására irányuló kutatások is nagy változatosságot mutatnak mind hatékonyságban, mind a használt donor-recipiens kombinációkat illetően. White Leghorn fajtaból izolált PGC-ket kétféle retrovírussal fertőztek Vick és munkatársai (1993), majd a sejteket vörös Rhode Island fajtájú embriókba injektálták. A kikelt kimérákat később a White Leghornnal visszakeresztezve vizsgálták az ivarszerveikben előforduló kimérizmust, ami 2-4 %-nak bizonyult. Naito és munkatársai 1994-ben közölt munkájuk során a White Leghorn fajta PG sejtjeit sávozott Plymouth embriókba injektálták, majd az injektálást a fajtákat felcserélve is elvégezték és az utódokban 95%, illetve 81% kimérizmust állapítottak meg. 48 órás csirkeembrió véréből primordiális csírasejtszuspenziót állítottak elő Yasuda és munkatársai (1992), ebből 100 sejtet hasonló korú japán fűrj embrióba injektáltak, majd további 24 órás

inkubációt és fixálást követően a fűrj ivarszervekbe integrálódott házityúk PG sejtek számát vizsgálták, melyek aránya átlagosan 63% volt. Van de Lavoie és munkatársai (2012) GFP-t expresszáló házityúk PGC-k beültetéséhez használtak gyöngytyúk recipienseket, ennek során a donor eredetű sejtek kolonizálták az eltérő fajú ivarszerveket. Az így kialakult, donor és recipiens eredetű spermával termékenyített házityúk tojók utódai közt mind a donor, mind a recipiens genotípus megjelent és csupán 6 hibrid egyedet kaptak, bizonyítva, hogy különböző fajú donor és recipiens esetén is sikeres lehet az ősvarsejtek felhasználása. Kagami és munkatársai (1995) az ivari differenciálódás tanulmányozására hoztak létre különböző ivarú (ZZ, ZW) embriók sejtjeit hordozó csirke kimérákat. Eredményeik azt mutatták, hogy hímvárú (ZZ) donor sejtek nőivarú (ZW) recipiensbe injektálásakor a csírasejtvonalban előforduló kimérizmus kétszeres gyakoriságú volt, mint fordított esetben. Az előállított kimérák ZZ/ZW kromoszómakészlettel rendelkeztek, azonban körülbelül egyforma arányban voltak jelen közöttük a fenotípusosan hím- és nőivarú egyedek. Fordított esetben, vagyis hím (ZZ) recipiens embrióba nőivarú (ZW) donor sejteket injektálva, a létrehozott kimérák fenotípusosan hímvárúak voltak, genotípusosan ZW/ZZ kromoszómakészlettel rendelkeztek. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a hím donor sejtek maszkulinizálhatják a nőivarú recipienst, de a nőivarú donor sejtek nem képesek a hímvárú recipiens feminizálására.

További, a génmegőrzéshez szorosabban kötődő számos példa bizonyítja, hogy a módszer működőképes lehet őshonos fajták vagy veszélyeztetett fajok esetében is, akár különböző madárfajok kombinálásával is. Például a japán őshonos Gifujidori házityúk-fajta (2010a), valamint japán fűrj (2013) esetében Nakamura és munkatársai, a nagymértékben csökkenő egyedszámú galléros tűzok esetében pedig Wernery és munkatársai (2010) is sikeresen nyerték vissza a donor fajtát PG-sejtek injektálásával előállított kimérák által. Lázár *et. al* (2021) hat őshonos magyar házityúk fajtából izolált ősvarsejteket, majd alapított belőlük sejtvonalatokat, melyek hosszú távú fenntartásának sikerességét bizonyította, hogy recipiens embrióba injektálásukkal létrehozott ivarszervi kimérák által a korábbi szakirodalmi adatoknak megfelelő hatékonysággal visszanyerhető a donor genotípus. Egy másik kutatás során fácán ősvarsejtek házityúk embrióba injektálásával kapott kimérák visszakeresztezésével Kang és munkatársai (2008) is visszanyerték a donor genotípust.

Mivel az ősvarsejtek fenntartása és szaporítása sejtenyészetben fajspecifikus tápoldatokat, kinyerésük és visszainjektálásuk speciálisan képzett munkaerőt és laboratóriumi infrastruktúrát igényel, megbízható technológia jelenleg csak házityúk ősvarsejtek esetében áll rendelkezésre. Emellett, a blasztodermális sejtek csírákorongba injektálása kevésbé hatékony az ivarszervi kimérák előállításakor, így Sztán és munkatársai (2017) alternatív megoldást kerestek lúd faj esetében. A blasztodermális sejtek kezelésének egyszerűbb technológiáját és a PGC-k

beültetésének hatékonyságát kihasználva, a kétféle módszer felhasználását kombinálva hoztak létre lúd kimérákat. A kísérlet során blasztodermális sejtszuspenziót injektáltak 3 napos (HH14-17) lúdembrió véráramába, arra alapozva, hogy már a korai embrionális őssejtek között is találhatók ősvarsejtek, így a BC sejteket a vándorlás ideje alatt recipiensbe injektálva növelhető az előállított ivarszervi kimérák aránya.

Az embrionális őssejtek felhasználása mellett egy másik alternatív lehetőség ivarszervi kimérák létrehozására, ezáltal a női ivar megőrzésére a donor eredetű naposkori ivarszervszövetek mélyhűtése, felolvasztása, majd recipiensbe való beültetése. Hasonlóan a PGC-k véráramba injektálásához, ez az eljárás is az előállított ivarszervi kimérák utódai közt minél nagyobb arányban megjelenő donor genotípus létrehozását célozza. Erről a módszerről is elmondható, hogy emlős fajok esetében is jól alkalmazható és kidolgozott technológia, számos baromfifajnál is eredményesen alkalmazták már, azonban madarak esetében nem széleskörűen elterjedt és jelenleg is fejlesztés alatt áll. Különös figyelmet igényel a megfelelő donor-recipiens kombináció meghatározása, illetve kiválasztása, ugyanis például házityúk fajták esetében sem minden fajta alkalmas recipiensnek (Liptói *et al.* 2013). Az eljárás további nehézsége, hogy műtéti beavatkozást igényel, ami naposkorú madarak esetében nehézséget jelent, valamint a teljes petefészek az anatómiai elhelyezkedése miatt nem távolítható el, így az ivarszervek fejlődése során a beültetett donor eredetű mellett a recipienstől származó szövet is megtalálható a létrehozott kimérákban. A különböző mértékben jelenlévő recipiens szövet miatt a donor genotípus megjelenése a kimérák utódaiban nagy változatosságot mutathat (Liptói *et al.* 2020), hatékonysága azonban akár 78,9% is lehet (Buda *et al.* 2024), valamint az egy egyedből származó szövet több darabra vágva tárolható és ezáltal több recipiensbe is beültethető, így ez az eljárás is egy ígéretes kutatási irány a madarak génmegőrzési lehetőségei között.

4.3.6. A recipiens embrió saját ivarsejt-fejlődési erélyének csökkentése vagy gátlása különböző módszerekkel

Az ivarszervi kimérák gonádjaiba épült donor eredetű sejteknek köszönhetően az ivarsejtek között megjelenik a donor genotípus, azonban mellettük nagy arányban jelen vannak a saját (recipiens eredetű) ivarsejtek is. A recipiens ivarszervébe épült donor sejtek könnyen azonosíthatók, amennyiben tartalmaznak valamilyen festékanyagot vagy riporter gént, például zöld fluoreszcens fehérjét (GFP-t). A génmegőrzés során fontos cél, hogy a donor eredetű ivarsejtek minél nagyobb számban jelenjenek meg, aminek elérése több módszerrel is lehetséges.

Egerek esetében több kutatócsoport is tetraploid recipiens embrióba diploid ES sejtek injektálásával (tetraploid komplementáció) érte el, hogy az utódok ivarsejtjei csak a donor

őssejtekből származzanak. (Nagy *et al.* 1990; Valer Carstea *et al.* 2007), Ogawa és munkatársai (2000) pedig fiatal hím egér ivarszervéből származó őssejteket injektáltak egy steril recipiens heréjének kanyarulat csatornácskáiba, így kizárólag a beültetett donor sejtekből származó termékenyítőképes hímivarsejtek keletkeztek.

Madarak esetében a legrégebben alkalmazott módszer a recipiens embrió ivarsejt-fejlődési erélyének csökkentésére a besugárzás volt. Aige-Gil & Simkiss (1991a) UV sugárzás, több publikáció pedig γ -sugárzás alkalmazásáról számol be (Carscience *et al.* 1993, Etches *et al.* 1993, Fraser *et al.* 1993; Thoraval *et al.* 1994) és az eljárásról megállapítható, hogy a donor sejtek beépülésének aránya növelhető vele, hátránya azonban, hogy az embrió fejlődése is lelassul, kb. 24 órával elmarad a kontroll egyedek fejlődéséhez képest.

Emlősökben már sikeresen alkalmazott alkilező ágens a buszulfán (1,4 butándiol-dimetánszulfonát), ami az embrió ivarszerveinek primordiális sejtekből fejlődő részét maradandóan károsítja, majd tíz óra elteltével lebomlik (Brinster & Zimmermann 1994, Nagano *et al.* 1999, Nakagawa *et al.* 2007). Alkalmazása madarak esetében is hasonló hatással bír (Reynaud 1969, Aige-Gil & Simkiss 1991b, Bresler *et al.* 1994, Blank 2024), a donor eredetű ősvarsejtek akár 99,5%-os hatékonysággal kolonizálhatják a recipiens embrió ivarszervét (Nakamura *et al.* 2010b). Azonban annak érdekében, hogy az embrionális ivarszerv környezetébe juttatható legyen, eltérő technika szükséges (Nakamura *et al.* 2008), mely során egy emulzió részeként, a tojáshéjon keresztül, célzottan az embrionális ivarszerv környezetébe kell juttatni, máskülönben, ha nem az optimális helyen éri az embriót, fejlődési rendellenességet vagy akár embrióelhalást is okozhat, valamint beszámoltak szisztémás citotoxikus, például a vérképzésre gyakorolt hatásáról is (Mikkola *et al.* 2006), ami állatjóléti szempontból teszi kérdésessé az eljárás alkalmazását.

Egy másik lehetséges módszer a steril recipiensek alkalmazása. A recipiens, sterilitása miatt nem rendelkezik saját fejlődőképes ivarsejtekkel, így kizárólag a bejuttatott donor sejtekből származó ivarsejteket termelhet és már utódai is kizárólag a donor genotípussal rendelkeznek. A sterilitás több úton is elérhető, melyek közül legújabb módszerként említhető meg a génszerkesztés. Az eljárás precíz, célzott változtatást tesz lehetővé a genomban, anélkül, hogy annak egyéb részein is változást okozna, valamint a génszerkesztett egyed nem lesz megkülönböztethető a természetes úton létrejövő genetikai variánsoktól (Panda & McGrew 2022), azonban a módszer alkalmazása számos országban jogszabályi akadályokba ütközhet. Taylor és munkatársai (2017) TALEN konstrukcióval hoztak létre CVH (chicken VASA homologue, *DDX4*) knock-out házityúk ősvarsejteket, melyeket visszainjektálva olyan házityúk vonalat alakítottak ki, melyben a tojók sterilek voltak, a hímek egészséges spermát termeltek, ennek köszönhetően a vonal fenntartható maradt. A steril tojókban megjelentek a saját

ősivarsejtek, azonban azok a meiózis során eliminálódtak. Egy ritka házityúkfajta felszaporított, majd mélyhűtve tárolt ősiarsejtjeit ilyen steril recipiens embriókba injektálva és a fajta szintén mélyhűtve tárolt spermáját felhasználva Woodcock és munkatársai (2019) kizárólag a ritka fajtaból származó, donor eredetű utódokat kaptak. Ballantyne és munkatársai (2021), valamint Chen és munkatársai (2023) transzgénikus módszerrel indukáltak az ősiarsejtekre specifikus, kémiai úton ható apoptózist és érték el a recipiens sterilitását.

A sterilitás elérésének egy másik megközelítése a fajhibridek alkalmazása, melynek alapja a rájuk általánosságban jellemző sterilitás. Ezt kihasználva ezek az egyedek szintén alkalmasak lehetnek recipiensnek, akár eltérő fajú donor genotípust hordozva és továbbörökítve.

4.4. Fajhibridek

A fajhibridek két különböző faj keresztezésével létrejött egyedek, amelyek előfordulnak mind a természetben, vadállatok között, mind pedig mesterségesen létrehozva kutatási céllal vagy gazdaságilag előnyös, a szülő fajokénál fokozottabban megjelenő tulajdonságaiknak köszönhetően (heterózis hatás). A hibridizáció fontos szerepet tölt be a fajok képződése során is, azonban számos természetes mechanizmus akadályozza a fajok közötti kereszteződést, így az leggyakrabban közeli rokonságban álló fajok között figyelhető meg. Ezek az izolációs mechanizmusok földrajzi, anatómiai, biológiai tényezőkön keresztül vagy már a zigóta létrejöttét követő embrióelhalás, születési rendellenesség vagy éppen a létrejött hibrid sterilitása által gátolják a nemkívánatos génkombinációk fennmaradását és az újonnan elkülönülő fajok genetikai állományának keveredését is. A fajhibridek általában steril egyedeknek tekinthetők, azonban léteznek példák utódok létrehozására is (Jones & Johnsen 1985, Zhao *et al.* 2007, Pongracz *et al.* 2017), megkérdőjelezve a klasszikus, általánosan elfogadott fajfogalmat, miszerint az egy fajba tartozó egyedek képesek egymással szaporodni és termékeny utódokat létrehozni. Mindezek mellett a fajhibridek értékes kutatási modellként is szolgálnak termékenységbeni, genetikai vagy viselkedésbeli sajátosságaiknak köszönhetően.

Az első, madár hibridekről szóló összefoglaló Suchet (1897) nevéhez köthető, majd számos publikáció jelent meg ebben a témában (Cockrum 1952, Gray 1958, Mayr & Short 1970, Meise 1975, Panov 1989, Grant & Grant 1992, McCarthy 2006, Ottenburghs *et al.* 2015). Grant és Grant (1992) becslése szerint az összes madárfaj legalább 9,2%-a hibridizál legalább egy másik madárfajjal, McCarthy már 19%-ra teszi a madárfajok közti hibridizációt 2006-ban megjelent kiadványában, ami tartalmazza mind a természetben, mind a fogságban előfordult, megfigyelt, illetve publikált madár hibridek listáját. Ezt kiegészíti számos egyéb adat, többek között az, hogy fordított irányban is előfordult-e a kereszteződés, ha nem, akkor a hím és nőivar közül melyik

vesz részt a hibridizációban az adott fajok esetében vagy, hogy létrejönnek-e utódok, azok milyen megfigyelt tulajdonságokkal rendelkeznek, például a szaporodóképesség terén.

4.4.1. Fajhibridek előfordulása a természetben

A természetben előforduló hibridizáció aránya a madarak közül a lúdalakúak (*Anseriformes*) rendjében a legmagasabb: 161 faj közül 97 esetében (60,2%) dokumentálták (Aliabadian & Nijman 2007), ez az adat a fogságban történt esetekkel kiegészítve 77% (Ottensmeyer 2015).

A fácánfélék (*Phasianidae*) és a gyöngytyúkfélék (*Numididae*) családjába tartozó számos faj között is létrejöhet fajhibrid, köszönhetően genetikai hasonlóságuknak (Szalay 2015b). A gödöllői Haszonállat-Génmegőrzési Intézet állományában is létrejönnek természetes módon gyöngytyúk-házityúk hibridek (5. ábra).



5. ábra: Természetes úton létrejött házityúk-gyöngytyúk fajhibrid az NBGK- HGI állományában.

(Készítette: Lehoczky István)

Elsőként Hanebrink számolt be természetes körülmények között létrejött gyöngytyúk és páva (1973) hibridekről, melyekről azt állapította meg, hogy maximum 4 éves korig élnek, valamint gyöngytyúk és házityúk hibridek megjelenéséről és viselkedéséről is publikált (Hanebrink 1976). Számos fajtából álló házityúk közé helyeztek két darab fehér színű gyöngytyúk tojót. Megfigyelései szerint a tojások többsége terméketlennek bizonyult, illetve az embrió fejlődése nem indult el, viszont az egyik kikelt, mindkét szülőnél kisebb termettel rendelkező, gyöngytyúkokéhoz hasonló világos narancssárga lábú, felfelé álló farktollú, de sisakkal nem

rendelkező egyed bizonyíthatóan White Leghorn kakastól és fehér gyöngytyúk tojótól származott. A házityúk csibékkel együtt felnevelt hibridek alapvetően nyugodt természetűek voltak, egyikükön sem figyeltek meg ivari jellegre utaló viselkedést, azonban bekerítéskor, illetve megfogáskor idegessé váltak.

4.4.2. Fajhibridek mesterséges előállítása

A fajhibridek mesterséges előállítása számos esetben valamilyen gazdasági céllal történik, az értékes tulajdonságok elérésének vagy fokozásának érdekében, mint például a lónál (*Equus caballus*) erősebb és a számárnál (*Equus asinus*) kezelhetőbb a keresztezésükkel létrejövő öszvér (Travis, 1990) vagy a különleges színű és minőségű bunda eléréséhez keresztezett sarki róka (*Alopex lagopus*) és vörös róka (*Vulpes vulpes*) esetében (Bugno-Poniewierska *et al.* 2015).

A fajhibridek nagy jelentőséggel bírnak a különböző termékenységgel, szaporodásbiológiával, genetikával, evolúciobiológiával kapcsolatos kutatások területén is, melyek számos esetben a tyúkalakúakhoz tartozó fajok keresztezésén alapszik. Mitsumoto & Nishida (1958), valamint Wilcox & Clark (1961) házityúk és fűj keresztezését végezték sikeresen. Házityúk és pulyka hibridekről számol be Warren & Scott (1935), mely keresztezés több szakirodalmi adat szerint is kevés termékeny tojást eredményez és csak néhány embrió indul fejlődésnek (Ogorodii 1935, Quinn *et al.* 1937, Asmundson & Lorenz 1957, Olson 1960). Ghigi (1936) tanulmánya szerint a gyöngytyúk házityúkkal vagy pávával történő keresztezése kizárólag hím utódokat eredményez. Eltérő galambfajok keresztezéséről Cole & Hollander (1950) számolt be, melynek eredményeként szintén csak hím utódokat kaptak, azonban a fordított nemű szülőfajokat párosítva hím és tojó utódok is létrejöttek. Házityúk és gyöngytyúk, valamint házityúk és japán fűj keresztezését végezte Mathis és McDougald (1987), vizsgálva a létrejött hibridek rezisztenciáját a fajspecifikus *Eimeria* fertőzőttségre vonatkozóan.

Különböző kacsafajok keresztezéséről számolt be Tubaro és Lijtmajer (2002). Eredményeik szerint a fajok filogenetikai távolságával növekszik a reprodukív izoláció, aminek mértéke nagyobb szimpatrikus, mint allopatrikus fajok esetében és a létrejött utódok megfelelnek Haldane törvényének: 161 sikeres keresztezés közül 125 esetben a hímek többségben voltak, 23 esetben a két nem aránya megegyezett és 13 esetben a nőstény utódok száma volt magasabb.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. A keresztezésben résztvevő fajok/fajták leírása

5.1.1. A sárga magyar tyúk (*Gallus gallus domesticus*)

A magyar parlagi tyúkok őseinek eredete egyelőre tisztázatlan, de a Kárpát-medence területén talált leletek alapján már a vaskorban (i. e. 900 után) jelen voltak ázsiai eredetű házityúkok (Szalay 2015a).

A parlagi állományokból a 19. században kialakult magyar tyúk ősei valószínűleg Ázsiából kerültek a Kárpát-medencébe, későbbi alakulásukban nagyobb testű ázsiai tyúkok, balkáni és kisázsiai eredetű tyúkok, valamint nyugatról származó tyúkfajták is szerepet játszottak. Az addig különösebb tenyésztői munka nélkül formálódott fajtatípusok nemesítése az 1930-as évektől elsősorban Báldy Bálinthoz és munkatársaihoz köthető. Az általuk Gödöllőn összegyűjtött és fenntartott magyar tyúkfajták több évtizeden át meghatározták Magyarország baromfitenyésztését (Szalay 2015a) és a kialakított színváltozatok mára önálló fajtként találhatók meg génbankokban. (MGE 2009a)

A sárga magyar tyúk (6-7. ábra) a korábban legelterjedtebb színváltozatok egyike, tartása leginkább a Dunántúlon, az Alföld és a Duna-Tisza köze egyes részein volt jellemző. Nemesítése során az olasz parlagi tyúkot, az angol Orpington, az amerikai eredetű Rhode Island Red, valamint a holland Welsummer fajtát is felhasználták.



6-7. ábra: Sárga magyar tyúk tojó és kakas az NBGK-HGI állományából
(Készítette: Lehoczky István)

A többi őshonos baromfifajtaához hasonlóan tartása mára visszaszorult, az intenzív fajták elterjedésével kiszorult a termelésből. Extenzív tartásra alkalmas, különleges húsmínőségű, kettős hasznosítású fajtaként az egyik legkeresettebb a falusi udvarokban. (Monori és Oláh 2019)

A sárga magyar tyúkok közepes termetűek, fejük erősen boltozott, csőrük ívelt, rövid, töben erős. Tarajuk vörös, középnagy, egyenletesen csipkézett, felfelé álló, füllebenyűk ovális alakú, áll-lebenyűk lekerekített, lábuk középhosszú, sárga színű. Jellemzőjük a testhez simuló, élénksárga tollazat, barnásfekete végű faroktollaik a test nagyságához viszonyítva hosszúak, magasan tartottak, szárnyuk magasan tűzött, mellük széles, telt és domború.

A kakasok alapszíne sötétebb, sarlótollaik zöldes árnyalatba hajlóan fekete színűek, sarkantyújuk erős és befelé ívelt. A kakasok súlya 2,5-3 kg, a tojóké 2-2,3 kg. Tojásuk világosbarna színű, a naposcsibék pehelytollai egyszínű világosbarnák. (MGE 2009a)

5.1.2. A magyar parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*)

A Gyöngytyúkfélék családja (*Numididae*) önálló rendszertani egységként sorolható a Madarak (*Aves*) osztályába és a Tyúkalakúak (*Galliformes*) rendjébe. A családon belül megkülönböztethetünk négy nemet (*Agelastes*, *Numida*, *Guttera*, *Acrylium*), ezeken belül elkülöníthető hat faj és számos alfaj is. Az irodalomban általánosan használt gyöngytyúk elnevezés a sisakos gyöngytyúkok (*Numida*) neméhez tartozó egyetlen faj, a sisakos gyöngytyúk (*Numida meleagris*) házasított változatát jelenti. (8. ábra)



8. ábra: Szürke/ezüst színváltozatú gyöngytyúk, a háttérben vadszínű egyedekkel az NBGK- HGI állományából

(Készítette: Lehoczky István)

A baromfifélék között egyedülállóként a gyöngytyúk Afrikából származik és nem az eredeti élőhelyén házasították. Ókori egyiptomi ábrázolása már az i. e. 1900-as évekből fennmaradt, ebben a kultúrában már ismert volt a mesterséges gyöngytyúkkeltetés, de házasítása egy, még azonosítatlan Földközi-tenger melléki kultúra földművelő népéhez köthető i. e. 1000 körül, az

ókorai görögök pedig áldozati célra tenyésztették i. e. 400 körül. A gyöngytyúk húsa és tojása a Római Birodalomban is kedvelt étel volt, az i. sz. 1. században pedig a birodalom távolabbi területein is ismert volt, de a középkor első századaiból nem maradt fenn emlék. A hajózás fellendülésével a 14-15. században került be ismét Európába kelet-afrikai területekről, majd átkerült az amerikai kontinensre és a Távol-Keletre, Kínába és onnan Indiába is. (Szalay 2015b)

A II. világháborút megelőzően számottevő gyöngytyúk fogyasztás és export jellemezte Franciaországot, Olaszországot, Ausztriát, Lengyelországot, Romániát és Magyarországot is, de a háború ideje alatt Közép-Európában, majd az iparszerű baromfitenyésztés megjelenésével, az 1960-as évektől az egész világon rohamosan csökkenni kezdett a gyöngytyúkok száma.

Magyarországi történetét tekintve nem ismert, hogy mikor került a gyöngytyúk az országba (Szalay 2015a). Egyes források szerint a 13. századtól kolostorokban, a 16. századtól főúri vadaskertekben díszmadárként tartották. A 19. század végén szórványosan, paraszti gazdaságokban volt elterjedt, a két világháború között pedig tanyás gazdálkodási helyeken, főleg a Duna-Tisza közén és a Tiszántúlon fordult elő. A leírások szerint a parlagi állományok elsősorban a kékesszürke, néhol a fehér színváltozatból álltak. A hazai gyöngytyúktenyésztés és -áruterelés az 1970-es években Európa élvonalába tartozott, de az 1980-as évektől nagymértékben visszaszorult, mára pedig már kizárólag génbankokban fenntartott tenyészállományai találhatók az országban. (Szalay 2015b)

Az eredeti élőhelyén, vadon élő madárként a cserjés-bozótos területeken 15-20 egyedből álló családokba verődve barangoló gyöngytyúk küllemében és jellemében is alig tér el a házasított gyöngytyúkoktól. A domesztikáció hatására csak testmérete lett valamivel nagyobb, ennek oka lehet a faj viszonylag késői házasítása, kisfokú változékonysága, feltehetően monofiletikus származása, valamint, hogy tenyésztésével kevesen foglalkoztak (MGE, 2009b). Teste vízszintes tartású, háta feldomborodik, a szárnyak hosszúak, szorosan testhez simulók, farka ék alakú, rövid, lefelé álló. Apró, csupasz fején sisak található, kétoldali áll-lebenye tömött, fehér színű, a széleken vörös, arca szürkés-kék, lábai palaszürkék, a kakasok nem viselnek sarkantyút. (Szalay *et al.* 2004)

A gyöngytyúkok tollszínét négy színfaktor (gyöngyözöttség, kékesszürke szín, szürkésbarna szín, fehér tollszín hiánya) határozza meg, melyek kombinációjának és mutációjának eredményeként a fehértől a sötét bronzig számos színváltozat, mint például sötétlila, korallkék, szürkésbarna, ezüstszárnú, barnássárga jöhet létre. Magyarországon elsősorban a kékesszürke színváltozat, az úgynevezett vad típus terjedt el, aminek tollszíne kékesszürke alapon egyenletesen fehérén gyöngyözött, az evező- és farktollak barnák, fehérés tarkázottsággal szélükön, mell- és nyakszíneződése ibolyaszürke. A csibék színe naposkorban barnás színű, hátukon hosszanti sötétebb sávokkal. (Szalay 2015b)

Biológiai igényeit tekintve az extenzív tartási körülmények megfelelők számára, de kiváló alkalmazkodóképessége miatt akár intenzív vagy félintenzív tartásra is alkalmas. Igényei és tartása nem sokban tér el a többi baromfiétól, de számos előnye ellenére néhány viselkedésbeli jellemzője (zajos, félénk, képes rövid távra repülni) miatt már kevésbé elterjedt a háztáji, családi baromfitartásban.

A parlagi, nemesítetlen változatok esetében a kakasok testsúlya 1,3–1,6 kg, a tojóké 1,2–1,4 kg. Húsa ízletes, vadhúsrá emlékeztető. A tojástermelést április végén kezdi, tojása a tyúktojáshoz képest vastagabb héjú, így hosszabb ideig eltartható, beltartalmát tekintve magasabb sárgája/fehérje arány, nagyobb ásványianyag-tartalom és alacsonyabb víztartalom jellemzi (Szalay *et al.* 2004).

5.2. Kísérleti állatok, állatkísérleti engedély

A kísérleti állományok fenntartása a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK-HGI), a Magyar Állatvédelmi Törvénynek (1998. XXVIII.) megfelelő tartási körülmények között történt. A vizsgálatokat az NBGK-HGI Intézményi Etikai Felülvizsgálati Testületének jóváhagyásával (7/2011 számmal) végeztem. A kísérlethez kapcsolódó, a Nemzeti Élelmiszerlánc-bizottsági Hivatal Állat-egészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága által kiállított állatkísérleti engedély száma: PE/EA/2485-6/2016.

5.3. A kísérleti állomány tartástechnológiája

A gyöngytyúk tojók és a házityúk kakasok keresztezése során a mesterséges termékenyítés idejére 60 db egy éves magyar parlagi gyöngytyúk tojó (9. ábra) és 20 db sárga magyar kakas (10. ábra) került elhelyezésre egyedi ketrecekben. A spermadonor házityúk kakasok kiválogatása a kezelhetőség, az ondóvételre való reagáló-képesség, valamint az egyedi ondóbírálati adatok alapján történt.



9-10. ábra: Gyöngytyúk tojók és sárga magyar kakasok egyedi ketrecekben

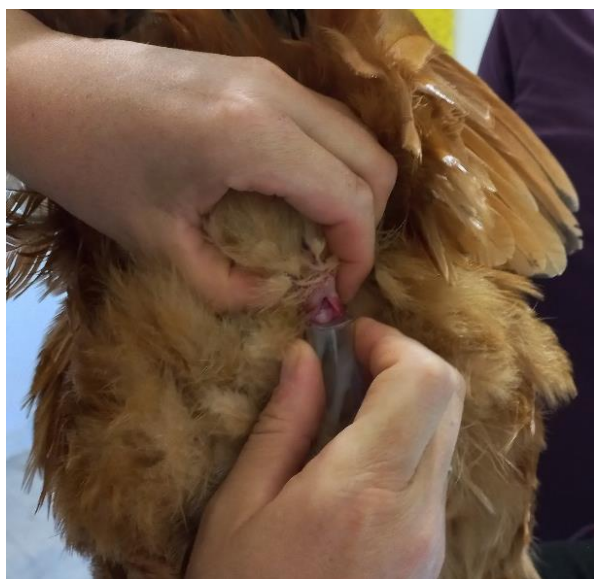
A gyöngytyúk kakasok és a házityúk tojók keresztezése során 50 db házityúk tojó mélyalmos tartásban, 30 db gyöngytyúk kakas pedig egyedi ketreces tartásban került elhelyezésre.

Az állatok hagyományos tojótápot kaptak, a vizet önitató biztosította *ad libitum*. A megvilágítás természetes fény mellett mesterséges kiegészítéssel történt, napi 16 óra időtartamban.

5.4. A hibridelőállítás menete

5.4.1. Mesterséges termékenyítés

A mesterséges termékenyítés gyöngytyúk tojók esetében az első héten heti három alkalommal, az azt követő hetekben heti két alkalommal, házityúk tojók esetében pedig heti három alkalommal történt (Bakst & Dymond 2013) (11-12. ábra). A szükséges spermát (alkalmanként 100 ± 20 millió spermium/tojó) – két hét trenírozási időszakot követően – közvetlenül a termékenyítés előtt, Burrows & Quinn (1935) *dorso-abdominális* masszázstechnikájával vettem, majd a kapott mennyiségtől függően PBS hozzáadásával hígítottam.



11-12. ábra: Ondóvétel sárga magyar kakastól és gyöngytyúk tojó mesterséges termékenyítése

5.4.2. Tojásgyűjtés

A tojásokat naponta kétszer gyűjtöttem és a felhasználásig 15-17°C közötti hőmérsékleten tojástároló helyiségben tároltam. A tojásokon ceruzával jelöltem a megtojás dátumát. Az előzetes vizsgálatok során 2295 db, az injektálásokhoz pedig összesen 3325 db hibrid tojást keltettem.

5.4.3. Alkalmazott keltetési technológia

A keltetés MIDI F500S típusú keltetőgéppel (PL Machine, Tárnok) (13. ábra) történt, két óránként 45°-os forgatással, 37,8°C hőmérsékleten és 70% relatív páratartalommal.



13. ábra: MIDI F500S típusú keltetőgép (Készítette: Lázár Bence)

5.5. Előzetes vizsgálatok a gyöngytyúk-házityúk hibridek donor eredetű ősvarsejtek befogadására való alkalmasságára

A gyöngytyúk és házityúk fajok keresztezése során vizsgálatokat végeztem a termékenységre, a korai embrionális és a kromoszóma rendellenességek előfordulási gyakoriságára, valamint a létrehozott hibridek donor eredetű ősvarsejtek befogadására való alkalmasságára vonatkozóan, melynek főbb lépéseit ebben a fejezetben ismertetem

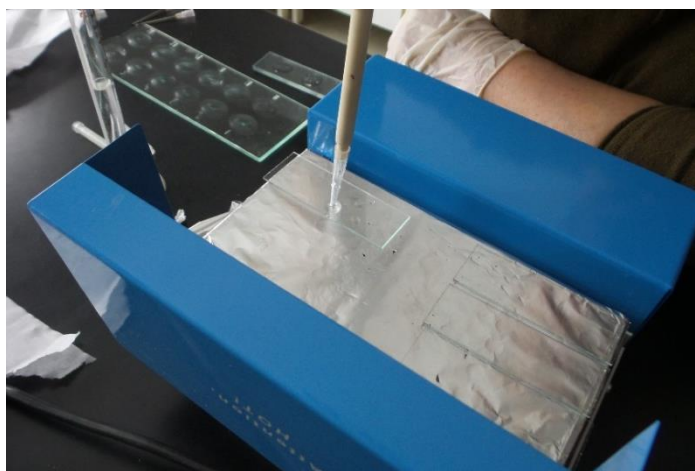
5.5.1. A fejlődés során elhalt embriók fenotípusos vizsgálata

A hibrid tojások keltetése során az embrionális fejlődés 8. és 14. napján lámpázással válogattam ki a terméketlen és az elhalt embriókat tartalmazó tojásokat, majd feltörtem azokat. Rögzítettem a terméketlenséget, illetve az elhalt embriók korát, a látható fejlődési rendellenességeket és az elhalás lehetséges okát, valamint mintákat gyűjtöttem kromoszómavizsgálat céljából.

5.5.2. Direkt kromoszóma preparátumok készítése elhalt embriókból

Az elhalt embriókból vagy embrionális hártókból kimetszett kb. 5x5 mm-es darabot 20 percre 8 ml 0,56 %-os, 10 µl Vinblasztint (Richter Gedeon Nyrt., gy.sz.: 897320286) is tartalmazó KCl (REANAL No. 822930) oldatba helyeztem és termosztátban inkubáltam (Memmert, BE 200) 37°C-on, így egy lépésbe sűrítve a sejtmagorsó roncsolását (metafázisok „gyűjtése”) és a hipotonizálás folyamatát. 20 perc elteltével a hipotóniás oldatot lecseréltem 6 ml, 3:1 arányban 99,8 %-os etanolt (Lachner, No. 603-002-00-5) és cc. ecetsavat (Lachner, No. 607-002-00-6) tartalmazó fixálóra. Újabb 20 perc elteltével a fixálót lecseréltem és ezt a lépést még egyszer megismételtam, majd a mintákat felhasználásig 4°C-on tároltam.

Felhasználáskor a mintát kivettem a fixálóból és leszártítottam, majd óraüvegre helyezve 50%-os ecetsavat cseppentettem rá és mechanikusan, pipetta segítségével az ecetsavban szuszpendáltam. A sejtszuszpenziót 45°C-os tárgylemezmelegítőn előmelegített tárgylemezre cseppentettem, pár másodperc eltelte után szakaszosan visszazívtam, majd újra kicseppentettem a tárgylemez egy másik pontjára, így minden tárgylemezre egy egyed mintájából 6 csepp került. (14. ábra)



14. ábra: Kromoszómapreparátumok készítése elhalt embriókból

A lemezre cseppentett mintákat 24 órás szobahőmérsékleten történő száradást követően festettem meg, amelyhez kétféle puffer oldatból (az egyik oldat 12,5 g dinátrium-hidrogénfoszfát és 500 ml desztillált víz, a másik oldat 4,76 g kálium-dihidrogén foszfát és 500 ml desztillált víz) 25-25 ml-t és 2,5 ml Giemsa festéket (METÁL-Finomvegyszer Kft., No. 1609261101) használtam. A tárgylemezeket festőkádban 7-8 percig festettem, majd desztillált vízzel leöblítettem és 24 órán át száradni hagytam. [Ford & Woollam (1964) nyomán módosítva, Liptói K. és Hidas A. (2005) eljárása nyomán]

Minden egyed esetében legalább 20 metafázist vizsgáltam és amelyik egyed mintájánál ez sikertelen volt, a preparátumból ismétlést készítettem.

5.5.3. Az embrionális ivarszervek vizsgálata immunhisztokémiával

A házityúk kakasok és a gyöngytyúk tojók keresztezéséből származó hibrid tojásokból a keltetés 6., 10., és 20. napján vettem ivarszerv mintákat. A tojásokat a mintavétel napján a keltetőgépből 4°C-os hűtőszekrénybe tettem. A tojás feltörését és az embrió kiemelését követően az embriót steril fiziológiás sóoldatban mostam le, majd az extraembrionális membránok eltávolítása után kimetszettem az ivarszervet, 4%-os paraformaldehidbe helyeztem és 4°C-on hűtőszekrényben tároltam, amíg a mintákat a pályázati együttműködés keretében az Egyesült Királyságba, a Roslin Intézetbe szállíttattam, ahol PGC specifikus immun-hisztokémiai festést végeztek rajtuk annak megállapítására, hogy a hibridek ivarszervei tartalmazzak-e ősvarsejteket.

Az immunfestéshez a mintákat 15% szacharózban ekvibrálták, 7,5% zselatinba ágyazták (15% szacharózzal), majd izopentánban szárazjégen fagyasztották. A szövetekből kriosztátban 10 µm vastagságú metszeteket készítettek, amiket tárgylemezre (Superfrost) helyeztek. A metszést követően a zselatint 38°C-on, PBS-ben távolították el, majd a lemezeket 121°C-ra melegítették az esetlegesen blokkolt antigén epitopok felszabadításához (Access Supreme, Menarini Diagnostics). A metszeteket PBS+0.5% Tween (PBST) oldatban mosták le, majd 5 percre PBST+0.5% Triton X-be tették és újra PBST-ben mosták le, mielőtt 5% kecskeszérum tartalmú PBST-ben blokkolták. Ezt követően a tárgylemezeket p63 (Abcam ab124762) vagy SSEA-1 (egér anti-SSEA-1, 1:10, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA) elleni antitestekkel inkubálták egy éjszakán át 4°C-on. A metszeteket PBST-ben történő mosást követően 1 órán át Alexa Fluor 488-konjugált kecske anti-nyúl IgG (ThermoFisher, A-11034) vagy Alexa Fluor 546-konjugált kecske anti-egér IgM (ThermoFisher, A-21045) másodlagos antitestekkel inkubálták. A minták sejtmag festését Hochst 33342-vel (10 µg/ml) végezték. Az elkészült lemezeket fluoreszcens mikroszkóppal (Leica DMLB), zöld, kék és piros szűrőszettellel, GFP esetében 488nm, UV esetében 392nm és RFP esetében 546nm hullámhossz használatával, 10x-es és 40x-es nagyítással vizsgálták. (Macdonald *et al.* 2010)

5.5.4. A kikelt hibridek tartástechnológiája

A kikelt hibrid csibéket az első 4 hétre 0,5 m²/10 állat alapterületre, *ad libitum* indítótáp takarmányozás mellett, zeolit alomra, a kísérleti állatházban elhelyezett ún. nevelő inkubátorba helyeztem el, melynek belmagassága 40 cm és előlről átlátszó műanyag polimer borítja. Biztosított a természetes megvilágítás, de belső megvilágítás is alkalmazható szükség esetén. A hőmérsékletet 30°C-ról a végső 22-24°C-ra, hetente, fokozatosan csökkentettem.

4 hét után a növendékeket kis csoportban (10-15 állat) 2 m² alapterületre, zeolit / puhafa forgács mélyalomra helyeztem ki. 16 hetes koruktól a hibrideket egy nagyobb alapterületű fülkében, szintén mélyalomra telepítettem át, ami egy kísérleti, zárt istállón belül történt, változtatható méretű, rácselemekkel elválasztott, felülről nyitott területen, ahol legalább a 0,11 m²/állat terület és 7, illetve 15 cm etetővályúhossz/állat biztosított. A takarmányozás *ad libitum*, az NBGK-HGI receptúra alapján, az intézet keverőjében készült indító-, majd nevelő-, a későbbiekben tojótáp volt. A megvilágítás itt is természetes, de szükség esetén fényprogrammal szabályozható volt. A hőmérséklet a házityúk és gyöngytyúk fajnak is megfelelő 20-22°C volt. (15. ábra)



15. ábra: Növendék hibridek és gyöngytyúkok mélyalmos tartásban

5.5.5. A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálata

A vizsgálathoz japán fürj fajra specifikus mikroszatellit markereket választottam ki a szakirodalomból (Kayang *et al.* 2002), mivel ezeket korábban a gyöngytyúkra már adaptáltuk, és optimalizáltuk a reakciókörülményeket. Tizenöt markert teszteltem házityúk és gyöngytyúk mintákon azért, hogy megtaláljam azokat, melyek a két fajban eltérő, jól elkülöníthető méretű (bp) fragmenteket amplifikálnak, ezáltal lehetővé válik a vizsgált egyedek házityúk-gyöngytyúk hibrid státuszának megállapítása. A DNS kivonásához 50 egyed (37 db fenotípusosan hibrid, 11 db gyöngytyúk és 12 db sárga magyar tyúk kontroll egyed) vérmintáját használtam fel. A DNS izolálását a hagyományos kisózásos módszer (Miller *et al.* 1988), madárra módosított protokollja alapján (Bodzsar *et al.* 2009) végeztem, melyet a DNS minőségi és mennyiségi ellenőrzése (DNS koncentrációmérés NanoDrop 2000C spektrofotométerrel), majd 5 ng/μl-re történő egalizálása követett.

A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) úgynevezett farkas primereket (Blacket *et al.* 2012) használtam különböző fluoreszcens jelölésekkel (1. táblázat). A GUJ1 nevezetű primer D4, kék színű, a GUJ87 primer pedig D3, zöld színű fluoreszcens WellRED festékkel való jelölést kapott. A master mix 5 μ M primert, 20mM MgCl₂-t (10x Dream Taq Buffer, Thermo Fisher Scientific), 25mM dNTP mixet (Thermo Fisher Scientific) és 5U/ μ L Taq DNS polimeráz enzimet (Dream Taq DNA polymerase, Thermo Fisher Scientific) tartalmazott, 25 ng DNS hozzáadásával készítettem el a PCR-eket. A paraméterek a következők voltak: 95°C 4 perc, ezt követően 95°C 15 másodperc, 58°C 30 másodperc és 72°C 1 perc 35 cikluson keresztül, majd 72°C 9 perc extenzió, végül 10°C-on tartás (SuperCycler Trinity, Kyratec).

1. táblázat: A molekuláris genetikai vizsgálat során használt primerek szekvenciái

Primer megnevezése	Szekvencia
GUJ1	forward: 5'-CAGGACCAGGCTACCGTGGAAAGCGAAAGCCGAGCCA-3' reverse: 5'-CAGCACTTCGGAGCACAGGA-3'
GUJ87	forward: 5'-CGGAGAGCCGAGAGGTGCATGCCGGCTGCTATGACAG-3' reverse: 5'-AAGTGCAGGGAGCGAGGAAG-3'

A fragment analízist kapilláris gélelektroforézissel, automata DNS szekvenátor használatával (GenomeLab GeXP, Beckman Coulter) végeztem. Három különböző WellRED festéket (a gyártó leírása alapján) használtam a mikroszatellit analízishez: D4 (kék) a GUJ1-hez, D3 (zöld) a GUJ87-hez és D1 (piros) az allélletrához (400 bp size standard). Az adatokat a GenomeLab GeXP System fragment analízáló szoftverrel (Beckman Coulter) dolgoztam fel, ami alapján meghatároztam mindkét faj esetében a felsokszorozott DNS szakaszok pontos allélméretét. (16-17. ábra)

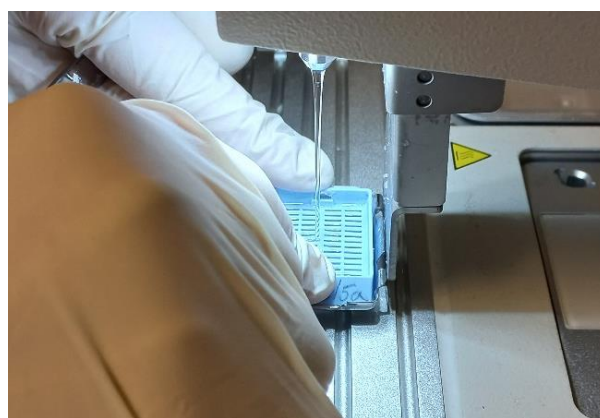
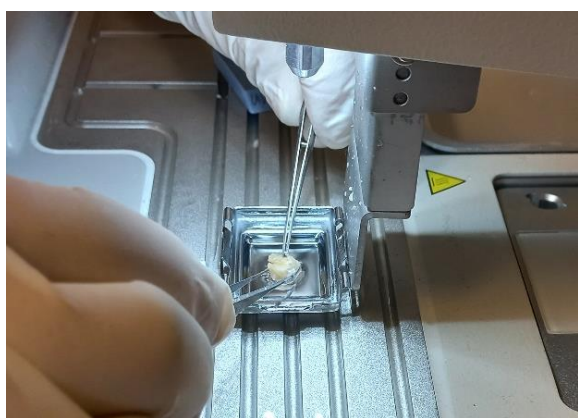


16-17. ábra: A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálata

5.5.6. Az ivarszervek fejlődésének vizsgálata a nevelés során

A kikelt hibridek ivarszerveinek vizsgálatához a nevelés 16. hetétől a 30. hétig kéthetente 4-5 egyed *cervicalis dislocatio*-ja után ivarszervmintát vettem szövettani metszet készítéséhez, valamint vér-, máj- és izomszövetmintákat gyűjtöttem a genetikai vizsgálatokhoz.

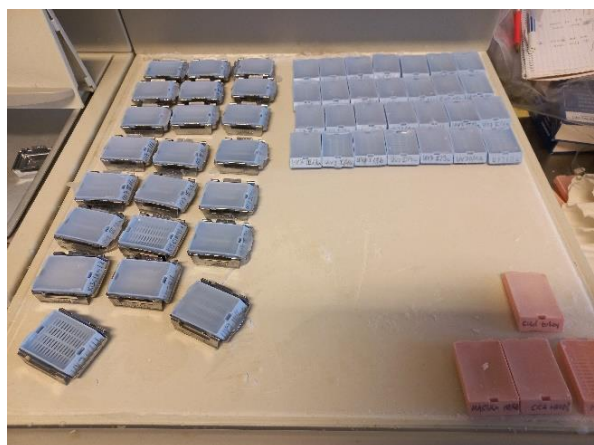
A hisztológiai vizsgálatokhoz az eltávolított ivarszerveket 8%-os pufferolt formalin oldatban 1-2 napig fixáltam (Excelsior AS Tissue Processor, No.: A82300001, Thermofisher). A szövettani metszetek készítéséhez az ivarszervmintákat folyóvízes mosást követően felszálló alkoholsorban dehidráltam, egy kiöntő tálkában 75°C-os paraffinnal feltöltöttem (18. ábra) és kazettával zártam (19. ábra) (Kunz Instrumentz Paraffin Dispenser WD-4C No.: 205510).



18-19. ábra: Ivarszervminták paraffinbe ágyazása és kazettával zárása

(Készítette: Sztán Nikoletta)

A hűtőlapra (Kunz Instrumentz Cooling Plate CP-4D No.: 205600) helyezett mintákból (20. ábra) a paraffin megdermedését követően 3-4 μm vastagságú metszeteket készítettem (Shandon Varistain 24-4 Slide Stainer, No.: 8358-30-1025)., azokat tárgylemezre helyeztem. (21. ábra)



20. ábra: Paraffinba ágyazott minták hűtőlapon



21. ábra: Száradó szövettani metszetek

A festés előtt a lemezeket 37°C-on, 10 percen át PBS-ben rehidratáltam, majd haematoxilin-eosin technikával, automata festőgépben (Leica Autostainer XL ST5010) megfestettem. A festési protokoll első lépése a xylolos kezelés, ezt követi két 100%-os és egy 70%-os etanolban való merítés, egy rövid desztillált vízben történő mosás után haematoxilin-be, majd újabb mosást követően eosinba mártás. Ezután a metszetek 95%-os, majd három alkalommal 100%-os etanolban való kezelést követően fedésig xylen-ben tárolhatók. A fedéshez egy csipesz segítségével üveg fedőlemez helyeztem a mintákra és 1-2 csepp rögzítő médiummal rögzítettem, majd száradni hagytam a lemezeket és mikroszkóp (Zeiss Axioskop 2 plus) alatt 100x-os nagyítással vizsgáltam. (Guzsal 1974 és a Leica Biosystems ajánlása nyomán)

5.5.7. A termékenyítőképesség *in vitro* vizsgálatai

A gyöngytyúk kakasok és házityúk tojók keresztezése során megfigyelt nagyszámú terméketlen tojás miatt *in vitro* vizsgáltam az utolsó két termékenyítést követő 3 napig termelt tojásokat. A vizsgálat célja annak eldöntése volt, hogy a gyöngyös-spermiumok az intravaginális inszeminálást követően milyen arányban voltak képesek feljutni a petevezetőn a házityúk petesejtjéhez. A vizsgálat során a tojások feltörését és a sárgája különválasztását követően a csírákorong felett egy 1x1 cm-es darabot vágtam ki a szikmembránból. A membrán darabot háromszor fiziológiás sóoldatban mostam le, majd tárgylemezre terítettem és sötét látóteres mikroszkóp (Leitz Diaplan) használatával, 4x-es nagyítás mellett vizsgáltam a csírákorong területén és a környezetében a spermiumok által képzett penetrációs nyílások jelenlétét. Összesen 81 db tojás vizsgálatát végeztem el. (Staines *et al.* 1998)

In vitro membrántesztet is vizsgáltam, hogy a gyöngyös spermiumok képesek-e penetrálni az étkezési (terméketlen) házityúk tojások perivitellin membránján. A csírákoronggal ellentétes oldalról egy 0,5 x 0,5 cm-es darabot vágtam ki terméketlen tyúktojás szikmembránjából, melyet tisztítás után 1 ml, 25 millió gyöngytyúk-spermiumot tartalmazó DMEM oldatba helyeztem és 38°C-on 5 percig lassú keverés mellett inkubáltam. Ezt követően háromszor fiziológiás sóoldatban mostam le a membránt, tárgylemezen terítettem és sötét látóteres mikroszkóppal (Leitz Diaplan), 4x-es nagyítással 3 látóteret vizsgáltam meg és meghatároztam a penetrációs nyílások számát. (Steel *et al.* 1994)

5.6. GFP-t tartalmazó ősvarsejtek injektálása 3 napos hibrid embriókba

Mivel az előzetes vizsgálatok eredményei alapján csak a gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezése tekinthető sikeresnek, a további vizsgálatok során ezzel a kombinációval dolgoztam tovább. Az injektáláshoz a korábbi fejezetben (5.4.2.) leírt módon naponta kétszer gyűjtöttem a hibrid tojásokat és felhasználásig 15-17°C közötti hőmérsékleten tojástartoló helyiségben tároltam.

Az injektált sejtek beépülését az embrionális ivarszervbe 173 injektált egyed esetében vizsgáltam. A későbbi vizsgálatok során, a felnevelésre szánt egyedek injektálását 15 héten át, heti 2-3 napon, összesen 43 alkalommal végeztem, amihez összesen 2162 db tojást keltettem, ebből 411 embriót injektáltam.

5.6.1. Az injektáláshoz használt ősvarsejtek eredete és fenntartása

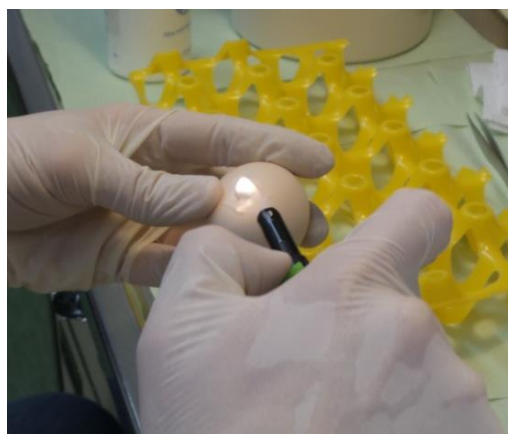
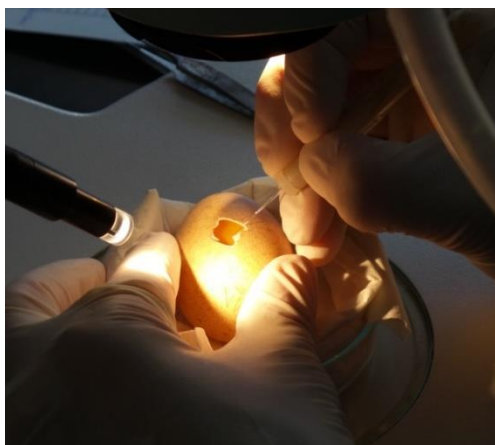
A GFP-t expresszáló PGC vonalak transzgénikus White Leghorn (McGrew *et al.* 2004) embriókból származtak. A mélyhűtve tárolt, majd felolvasztott sejt vonalakat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) Genetika és Biotechnológia Intézetében (GBI) az Alkalmazott Embriológia és Őssejt Biológia Csoport tagjainak segítségével, Whyte és munkatársai (2015) leírása alapján, *in vitro* sejtenyésztésben, CO₂ termosztátban 38°C-on 5% CO₂-koncentráció mellett tartottam fenn (Whyte *et al.* 2015). A médiumcsere kétnaponta a médium egyharmadának eltávolításával, majd ugyanannyi friss médiummal való pótlásával történt, illetve szükség esetén passzálást végeztem.

5.6.2. Ősvarsejtek injektálása 3 napos hibrid embriókba

A keltetés során az embrionális fejlődés 3. napján, kb. 63 óra elteltével GFP-t tartalmazó ősvarsejtek injektálását végeztem a megfelelő stádiumban (HH14-16) levő embriók véráramába. Alkoholos felület-fertőtlenítést követően a tojás tompa felén a légkamránál egy kis lyukat szúrtam a héjon annak érdekében, hogy a légkamra összeesésével az embrió lejjebb süllyedjen és eltávolodjon a tojás héjától. A tojások héján egy 5-6 mm átmérőjű ablakot nyitottam az embrió fölött (22. ábra), majd szájpipetta és üvegkapilláris segítségével embriónként 1 µl, körülbelül 5000-10000 PG sejtet tartalmazó sejtuszuspenziót (23. ábra) injektáltam az embrió véráramába (24. ábra), majd 50 µl steril 1x D-PBS-t cseppentettem a tojásba és 2 réteg parafilmrel zártam le a nyílásokat (Macdonald *et al.* 2010)(25. ábra). Az injektált tojásokat 37,8°C-on, 70% relatív páratartalom mellett inkubáltam tovább.



22-23. ábra: Ablak nyitása a tojás héján és az injektáláshoz használt 37°C-on tartott sejtuszpenzió
(Készítette: Várkonyi Eszter)



24-25. ábra: Injektálás üvegkapillárisal hibrid embrió véráramába és az ablak lezárása kétrétegű
parafilmmel
(Készítette: Várkonyi Eszter)

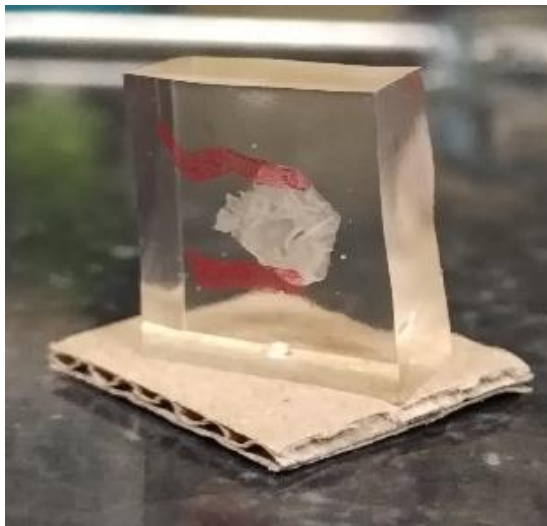
5.6.3. A fejlődés során elhalt injektált embriók fenotípusos vizsgálata

A keltetés során ki nem kelt injektált tojásokat felbontottam és meghatároztam az embrióelhalás napját, valamint feljegyeztem a látható fejlődési rendellenességeket, annak érdekében, hogy összehasonlítsam a nem injektált tojások keltetésének korábbi eredményeivel, megállapítva az injektálási eljárás esetleges hatását a keltethetőségre.

5.6.4. Az injektált sejtek jelenlétének vizsgálata az embrionális ivarszervekben

A GFP-t expresszáló PG sejtek ivarszervekbe épülését 7,5; 14,5 és 18,5 napos embriók ivarszervében vizsgáltam. Az ivarszerveket eltávolításukat követően egy éjszakára 4%-os paraformaldehidbe helyeztem, majd PBS-ben tároltam és fluoreszcens sztereomikroszkóppal (Leica M205 FCA, Leica Ltd., Germany) vizsgáltam.

18,5 napos embriók esetében immunfestéssel is vizsgáltam az injektált sejtek ivarszervbe épülését. Az ivarszervek 4%-os paraformaldehidbe helyezését és fixálását követően a szerveket 10, 20 majd 30%-os szacharóz oldatban ekvibráltam, 7,5% zselatinba ágyaztam (26. ábra) és folyékony nitrogénen izopentánban fagyasztottam. Az így elkészített blokkokból kriosztátban 10 µm vastagságú metszeteket készítettem, amiket tárgylemezre helyeztem.



26. ábra: Zselatin blokkba ágyazott szövetminta

A zselatint 1x-es PBS-ben, 38°C-on távolítottam el. A PBS-es mosást követően a lemezeket 2,5% szamárszérumot és 0,1% Triton X-100-at (Merck Millipore, US) tartalmazó 0,1% BSA-PBS-ben, szobahőmérsékleten blokkoltam 45 percig. A lemezeket egy éjszakán át 4°C-on nedves kamrában inkubáltam nyúl antiVASA (1:1000; Bertrand Pain, Lyon, Franciaország) elsődleges antitesttel. Következő lépésként a lemezeket három alkalommal mostam 1x-es PBS-ben, majd szamár anti-nyúl IgG-konjugált Alexa 555 (1:400, Molecular Probes Inc., USA) másodlagos antitesttel inkubáltam nedves kamrában, sötétben 1 órán át, 37°C-on. 1x-es PBS-ben történő mosást követően a sejtmagokat TO-PRO®-3-mal (1:500, Molecular Probes Inc., US) festettem meg, ami egy távoli-vörös fluoreszcens (642/661) sejtmag és kromoszóma festék. Újabb három mosást végeztem 1x-es PBS-sel, majd a lemezeket 20 µl VECTASHIELD® (Vector Laboratories Inc., US) alkalmazásával fedőlemezzel fedtem le és konfokális mikroszkóppal (TCS SP8, Leica) vizsgáltam. A negatív kontroll mintákat csak a másodlagos antitesttel festettem meg. (Lázár *et al.* 2018)

5.6.5. Az ivarérett egyedek ivarszerveinek vizsgálata

Két injektált és egy kontroll hibrid trenírozását végeztem spermavétel céljából. Az injektált egyedek esetében 22, illetve 26 hetes kortól, a kontroll egyed esetében 24 hetes kortól, heti rendszerességgel, 5 hónapon keresztül.

A trenírozási időszakot követően a hibridek ivarszervét immunfestéssel vizsgáltam, illetve szövettani metszeteket is készítettem annak megállapítására, hogy az injektált donor sejtek beépültek-e a hibridek ivarszerveibe.

Az ivarszerveket eltávolításukat követően 2 napon át 4%-os paraformaldehidben fixáltam (Excelsior AS Tissue Processor, No.: A82300001, Thermofisher). A mintákat egy-egy éjszakán át 10%-os, 20%-os, majd 30%-os szacharózoldatban kezeltem. A beágyazáshoz 7.5%-os zselatint használtam és a blokkokat izopentánban, -40°C-on fagyasztottam le a metszetek készítéséhez, majd a későbbi felhasználásig -80°C-on tároltam őket.

A metszést kriosztáttal (Microm D-6900, Microm GmbH, Heidelberg, Germany) végeztem, majd a 10 µm vastagságú metszeteket Poly-L-Lysine bevonatú tárgylemezekre helyeztem és -20°C-on tároltam további felhasználásig.

A lemetszett minták egy részén szövettani vizsgálat céljából hematoxin-eosin festést végeztem a korábban (5.5.6. fejezet) leírt módon, a lemezeket lefedtem és mikroszkóp alatt 100x-os nagyítással vizsgáltam azokat.

A lemetszett minták egy másik részén csak sejtmag festést végeztem (27-28. ábra). A metszeteket TO-PRO-3 sejtmagfestéssel (1:500, T3605, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) festettem meg, majd fedőlemezt rögzítettem rájuk 20 µl VECTASHIELD rögzítő médiumot (H-1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) használva és a GFP-expressziót konfokális mikroszkóppal (TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany) vizsgáltam.



27-28. ábra: Szövettani metszetek sejtmagfestése

A minták vizsgálata során kiderült, hogy a GFP-expresszió erőssége nem elégséges a megfelelő dokumentációhoz, így anti-GFP elsődleges antitesttel (Rockland Immunohistochemicals, cat. no: 600-401-215, diluted 1:150 in 1% PBS-BSA) erősítettem fel a GFP jelet. Ehhez a metszeteket 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltam az elsődleges antitesttel, majd számár anti-nyúl IgG-konjugált Alexa 488 fluorescens másodlagos antitesttel tettem láthatóvá a GFP-expressziót (ThermoFisher, A21206). A sejtmagok festése DAPI (Vector

Labs, Burlingame, California) használatával történt, majd a lefedéshez Poly/Mount-médiumot (Polyscience Inc. Warrington, PA, 18606) alkalmaztam. A vizsgálat a Zeiss Zen szoftver által automatikusan beállított DAPI és Alexa Fluor 488 szűrőkockákkal, 20x-os és 40x-es nagyítással történt. (Pan *et al.* 2022)

5.7. Statisztikai analízis

Az "injektált" és a "kontroll" csoportokban tapasztalt embrionális mortalitási és kelési arányokra páros Z-teszteket végeztem. Az adatok statisztikai elemzéséhez és ábrázolásához a Python 3-on belül a "statsmodels" (verzió: 0.14.1) (Seabold & Perktold 2010.), a "pandas" (2.2.1) (Pandas Development Team, 2020), a "numpy" (1.26) (Harris *et al.*, 2020) és a "matplotlib" (3.8.3) (Hunter, 2007) csomagokat használtam. Az elemzéshez használt kódok futtatását a Visual Studio Code-ban (verzió: 1.86.2, Microsoft Corp.) végeztem. A szignifikanciaszinteket a következőképpen alkalmaztam: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$.

6. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

6.1. A hibridelőállítás eredményei

6.1.1. A keresztezési kísérlet eredményeképpen nyert tojások termékenysége és a tapasztalt korai embrionális rendellenességek fenotípus szerinti csoportosítása

A korai embrionális rendellenességek fenotípus szerinti csoportosításához Liptói és Hidas (2003) nyomán az alábbi osztályokat használtam:

ND (no development): Terméketlen tojás, a csírákorong nem indult fejlődésnek, abban osztódások, így metafázisok sem találhatók.

PD (positive development): A tojás termékeny, azonban az inkubáció során, még az embrió kialakulása előtt megállt a differenciálódás.

BWE (blastoderm without embryo): Mezodermális szövetek már létrejönnek, így vérerek is láthatók a tojásban, de embrió nem található.

D (dead embryo): Az embrió mérete és fejlettsége alapján megállapítható, hogy az inkubáció hányadik napján halt el.

AE (abnormal embryo): Az élő embrió lassú fejlődésű, mérete túl kicsi vagy valamilyen morfológiai rendellenességet mutat.

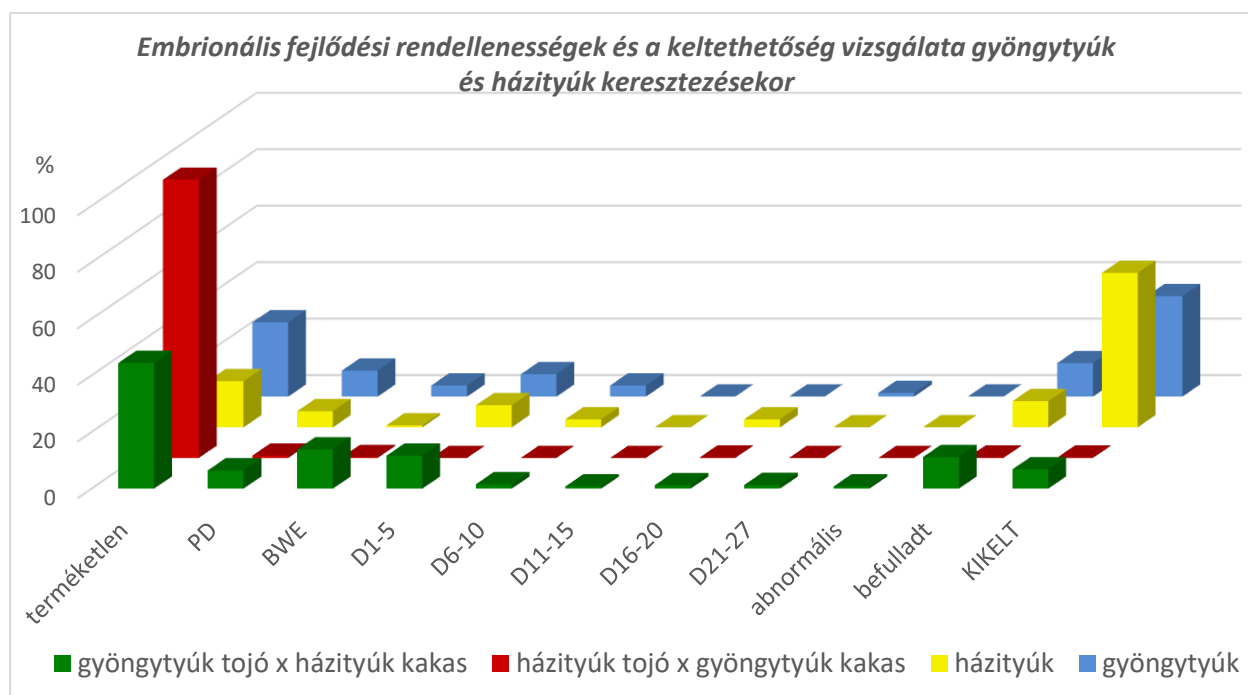
NE (normal embryo): Az embrió korának megfelelő fejlettségű és küllemű, a vizsgálat során ezen belül a „befulladt” és „kikelt” egyedek kategóriáit különítettem el.

A kísérletek során végzett keltetések eredményeit az *M3 melléklet* táblázata tartalmazza.

A gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezésével kapott tojások 44,35 %-a (683 db) bizonyult terméketlennek, nagyon korai embrióelhalást 20,26 %-nál (312 db) állapítottam meg (6,43 % (99 db) PD és 13,83 % (213 db) BWE). A fejlődésnek indult embriók 11,62 %-a (179 db) a fejlődés megindulását követő 5 napon belül (D1-5), 1,56 %-a (24 db) az inkubálás 6. és 10. napja között (D6-10), 0,78 %-a (12 db) a 11. és 15. napja között (D11-15), 1,23 %-a (19 db) a 16. és 20. napja között és 1,30 %-a (20 db) a 21. és 27. napja között (D21-27) halt el. A befulladt embriók aránya 11,17 % (172 db), a kikelt egyedek aránya pedig 6,95 % (107 db) volt. Az elhalt embriók vizsgálata során 0,78 % (12 db) bizonyult abnormálisnak, ezek nyitott hasfallal, nyitott koponyával, rendellenes csőrrel, illetve törpe növéssel rendelkező egyedek voltak.

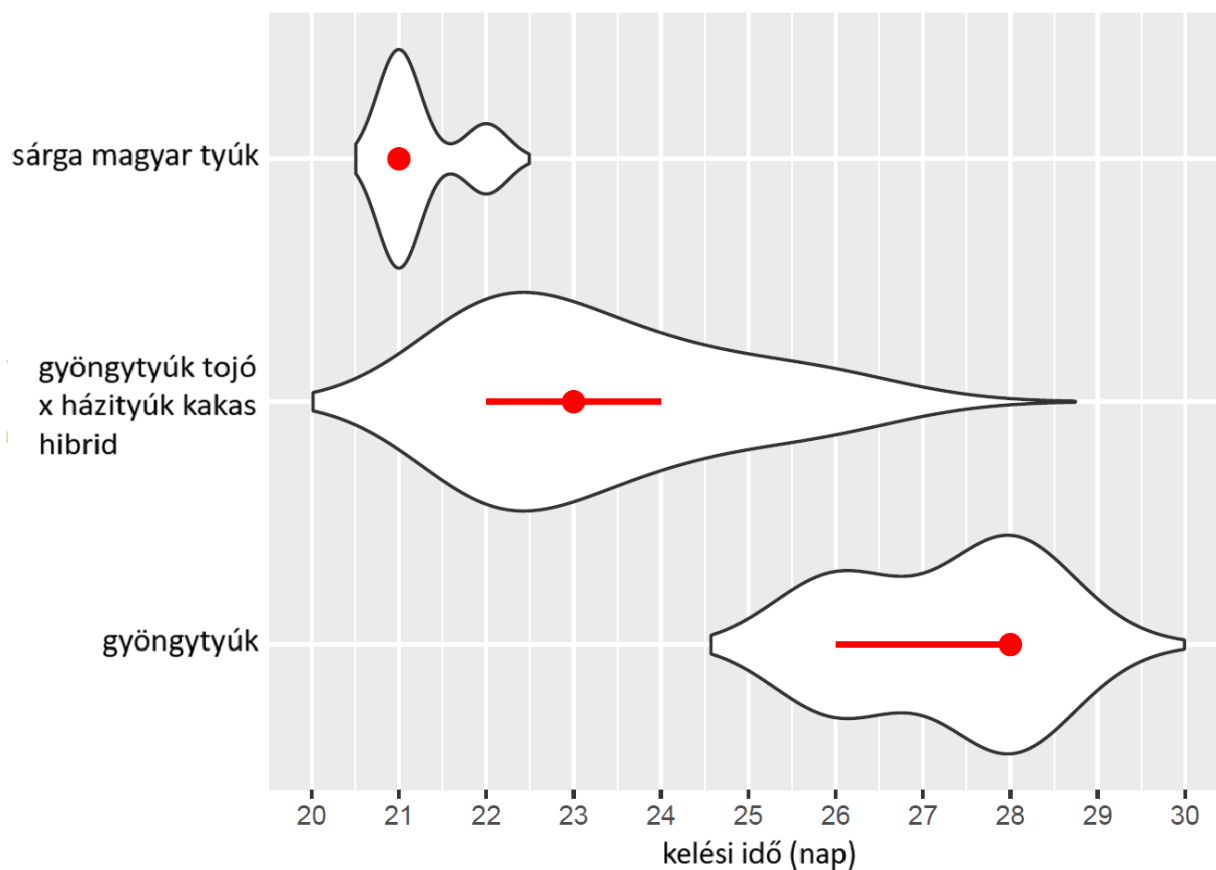
A házityúk tojók és gyöngytyúk kakasok keresztezése sikertelennek tekinthető, mivel a 702 db keltetett tojás 98,43 %-a (691 db) terméketlen volt, 1,13 %-nál (8 db) állapítottam meg

nagyon korai embrióelhalást (0,85 % (6 db) PD és 0,28 % (2 db) BWE), 0,14 % (1 db) volt az inkubáció 16. és 20. napja között elhalt embriók aránya, szintén 0,14 % (1 db) befűlladt és csupán 1 egyed kelt ki (0,14 %). (29. ábra, M3 melléklet)



29. ábra: Embrionális fejlődési rendellenességek és a keltethetőség vizsgálata gyöngytyúk és házityúk mindkét irányú keresztezésekor a kontrollokkal összehasonlítva

A gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok hibridjeinek keltetésekör elhűzódó kelés állapítható meg, kelési idejük 21 és 27 nap között változott, ami a két szűlőfaj kelési ideje közötti átmenetnek tekinthető (házityúknál 21-22 nap, gyöngytyúknál 26-29 nap). A legtöbb (57,9 %) hibrid egyed a 22-23. napon (62 db) kelt ki (30. ábra).



30. ábra: A hibrid tojások kelési ideje a szülőfajok kelési idejével összevetve. A két szülőfaj kelési idejéhez képest (házityúknál 21-22 nap, gyöngytyúk esetében 26-29 nap) a hibridek kelési ideje elhúzódó, a kettő közti átmenetnek tekinthető (21-27 nap). A mediánt és kvartiliseket piros szín jelöli

6.2. A hibridek donor eredetű ősvarsejtek befogadására való alkalmasságára irányuló előzetes vizsgálatok eredményei

6.2.1. Az elhalt embriók kromoszóma vizsgálatának eredményei

Az elkészített kromoszóma preparátumokat mikroszkóp alatt vizsgálva meghatároztam az elhalt embriók ivarát és az esetleges kromoszóma rendellenességeit. A gyöngytyúk és házityúk kariotípusának (Shibusawa *et al.* 2004) összevetésekor megállapítható, hogy a gyöngytyúk 5. kromoszómapárjából származó metacentrikus kromoszóma és a Z ivari kromoszóma méretben nagyon hasonló. (31. ábra). A házityúk esetében azonban nem található metacentrikus kromoszómapár az ivari kromoszómákon kívül. Ezek alapján kikövetkeztethető, hogy hibridjeik esetében a nőivarú egyedek metafázisos képén egy kisebb és egy nagyobb (32. ábra), míg a hímivarú egyedek esetében egy kisebb és két nagyobb metacentrikus kromoszóma (33. ábra) látható. A vizsgálat során először megvizsgáltam, hogy a makrokromoszómák hiánytalanul megvannak-e, majd az ivari kromoszómák alapján meghatároztam az egyedek nemét.

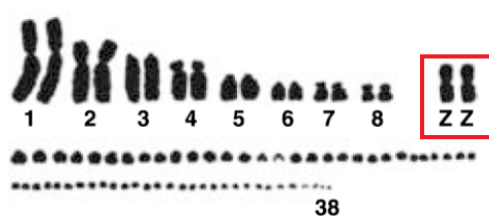
A hibridek ivarának alakulása gyöngytyúk tojó és házityúk kakas keresztezésekor

Gyöngytyúk tojó kariotípusa



szülők

Házityúk kakas kariotípusa



gaméták



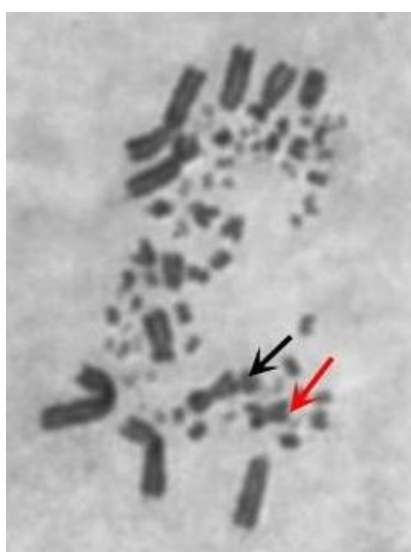
hibridek



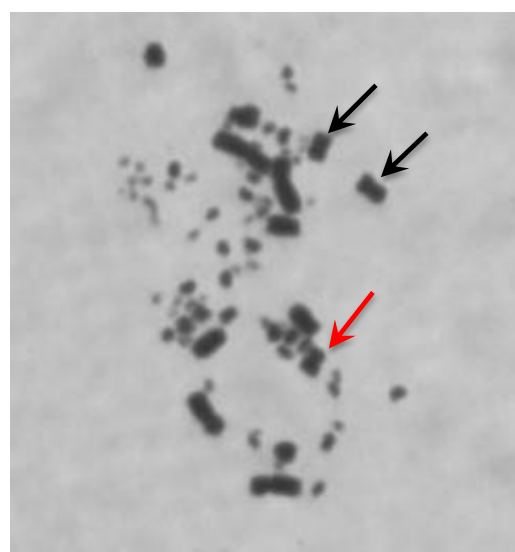
31. ábra: A hibridek ivarának alakulása gyöngytyúk tojó és házityúk kakas keresztezésekor

(Készítve Shibusawa et al. 2004 alapján)

187 db minta kromoszómvizsgálatát végeztem el, melyeknek 43,24 %-a nőivarú (32. ábra), 56,76 %-a hímivarú (33. ábra), egyedtől származott. A fotókon fekete nyíl jelöli a Z ivari kromoszómát, piros nyíl az 5. kromoszómát.

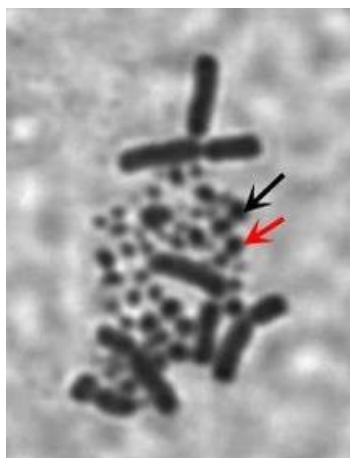


32. ábra: Hibrid tojó (2n ZW)

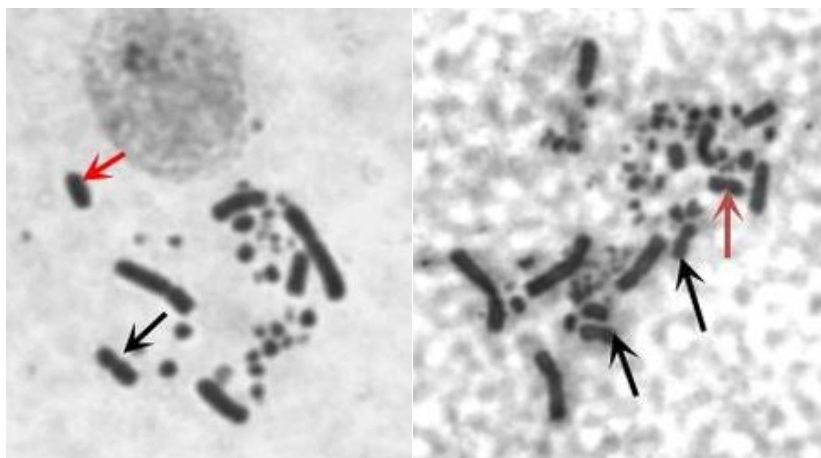


33. ábra: Hibrid kakas (2n ZZ)

A vizsgálat során kétféle kromoszóma rendellenességet azonosítottam. Egyik az aneuploidia, azaz egy vagy több kromoszóma hiánya vagy többlete (Imreh 1986). Az ilyen egyedek aránya 0,90 % volt. A 34. ábra egy hím aneuploid egyed metafázisos képét mutatja, ahol az első, méretben legnagyobb kromoszómapár hiányos. A másik meghatározott rendellenesség a mozaicizmus, ebben az esetben egy egyeden belül több különböző kariotípus is azonosítható (Imreh 1986). A vizsgálat során a haploid/diploid ($1n/2n$) mozaikos kariotípusú egyedek aránya 1,80% volt (35-36. ábra).



34. ábra: Aneuploid hibrid ($2n-1$)

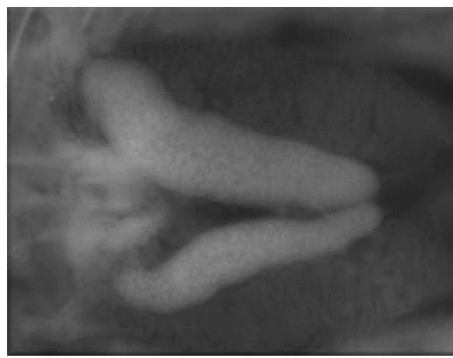


35-36. ábra: Haploid/diploid mozaikos hibrid ($1n/2n$)

A fordított keresztezés (házityúk tojó x gyöngytyúk kakas) során 7 db embrionális elhalásból származó mintát vizsgáltam, melyek közül 3 db volt értékelhető. Ezek közül 2 tojónak és 1 kakasnak bizonyult és esetükben nem azonosítottam kromoszóma rendellenességet.

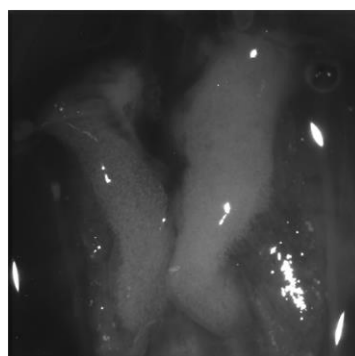
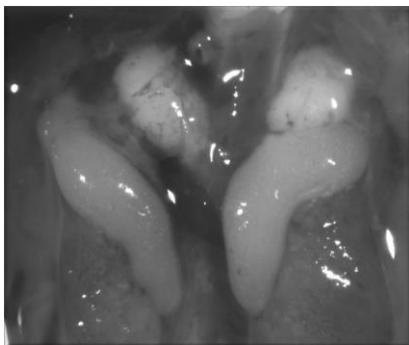
6.2.2. Az ivarszervek embrionális fejlődése során végzett vizsgálatok eredményei

Az embrionális fejlődés során az egészségesen fejlődő embriókból a 6., 10. és 20. napon ivarszerv mintákat vettem a későbbi immun-hisztokémiai vizsgálatokhoz. A vizsgálatok annak megállapítását célozták, hogy a hibridek rendelkeznek-e saját ősvarsejtekkkel. A mintavétel során a 10 és 20 napos embriók esetében az ivarszervek morfológiája alapján szemmel is megkülönböztethetők voltak a hím (37., 39. ábra) és a nőivarú (38., 40. ábra) egyedek.



37. ábra: 10 napos hibrid embrió ivarszerve (hím)

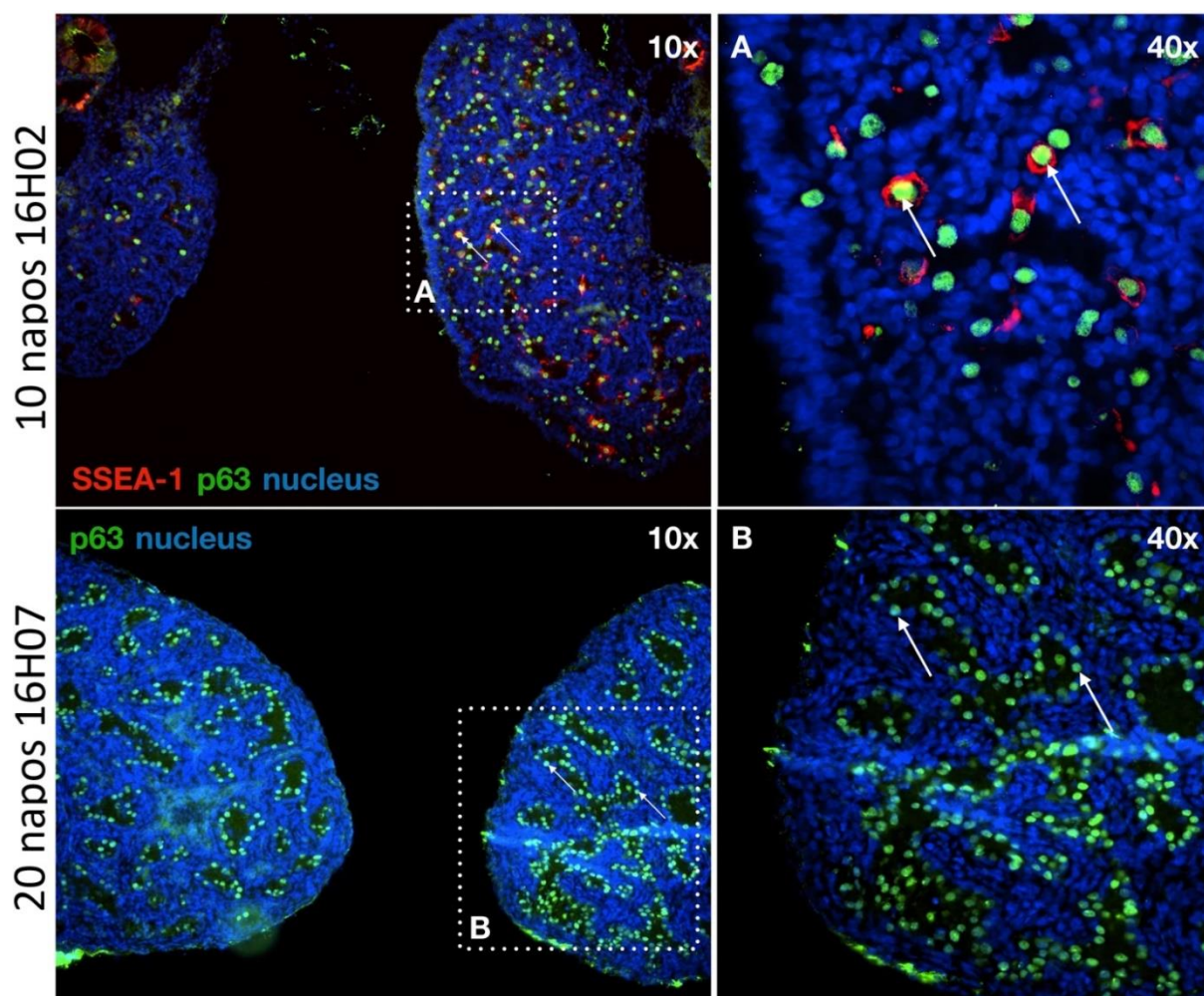
38. ábra: 10 napos hibrid embrió ivarszerve (tojó)



39. ábra: 20 napos hibrid embrió ivarszerve (hím)

40. ábra: 20 napos hibrid embrió ivarszerve (tojó)

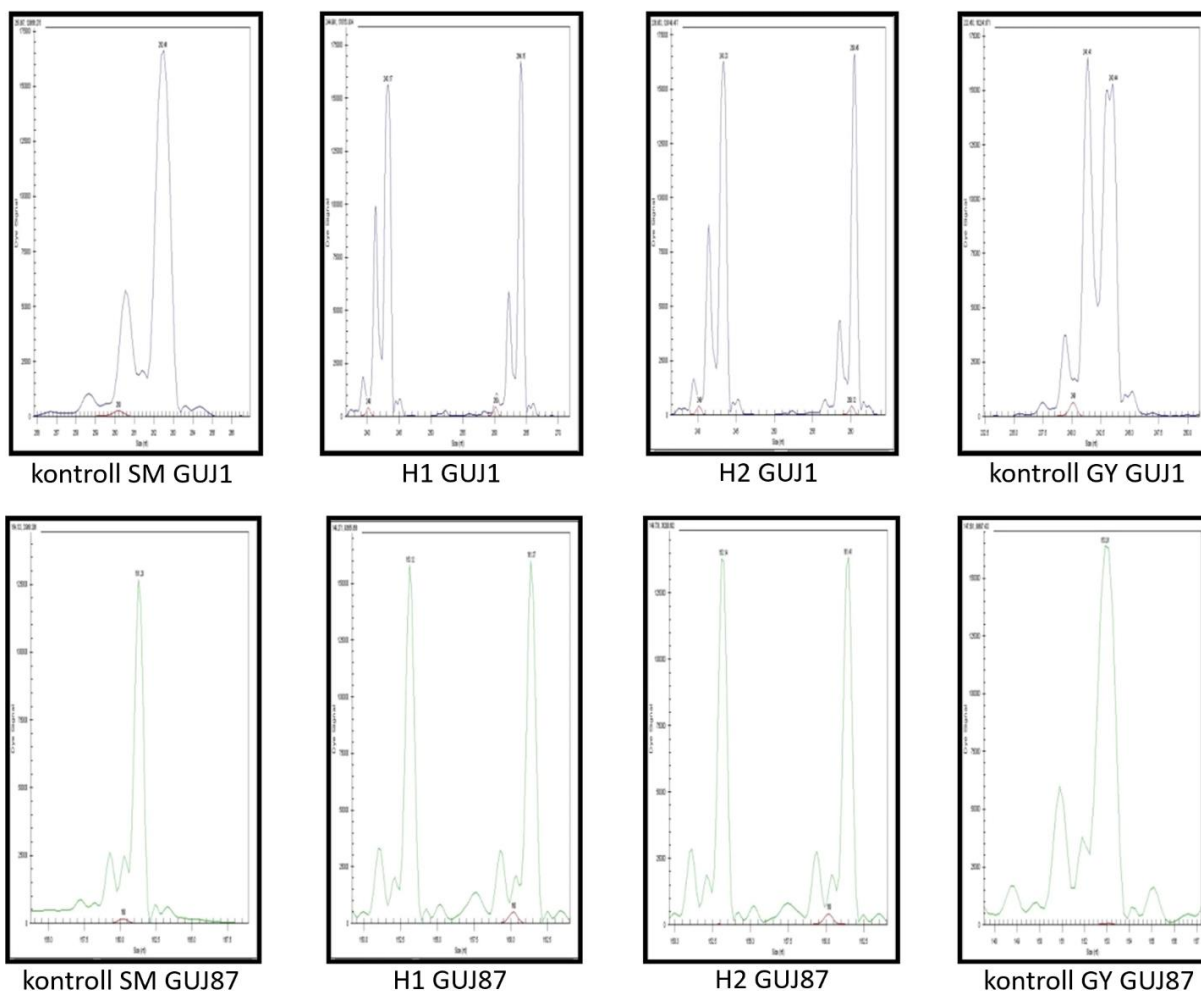
Az immunhisztokémiai festést követően három darab 10 napos, egy darab 18,5 napos, négy darab 20 napos hibrid embrió ivarszervét vizsgáltam. A nyolc darab embrionális korban vizsgált egyed közül az ivarszervek struktúrája alapján négy darab nőivarúnak bizonyult. A vizsgálat során a hibridek ősvarsejtjeinek kimutatására két markert használtam: az EG&K X. stádiumtól kezdve megbízhatóan alkalmazható, őssejtspecifikus SSEA-1-t, aminek expressziója a sejtfelszínen piros festődést mutat, valamint az ősvarsejt-specifikus p63 markert, ami a pozitív sejtek nukleuszában zöld festődéssel látható (41. ábra). A nőivarú ivarszervekben számos sejt mutatott pozitív festődést a p63 és az SSEA-1 esetében is. Az ősvarsejtek eloszlának a gonádban, nem koncentrálnak a kéregben. A hím ivarszervekben a p63-pozitív sejtek körkörösén helyezkednek el a *vesiculae seminales* mentén, így megállapítható, hogy az ősvarsejtek mindkét ivar esetében jelen vannak a hibridek ivarszervében.



41. ábra: Ősivarsejtek jelenlétének vizsgálata hibrid embriók ivarszervében. (A) p63 (zöld) és SSEA-1 (piros) esetében is pozitív festődést mutató PGC-k 10 napos (16H02) nőivarú hibrid embrió ivarszervében (B) p63-pozitív sejtek 20 napos hímivarú hibrid (16H07) embrió ivarszervében. Fehér nyilak mutatják a meglévő PG sejteket. Kék színnel láthatók a sejtmagok.

6.2.3. A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálatának eredménye

A GUJ1 marker esetében házityúknál 260 bázispár (bp), 262 bp és 264 bp allélméret látható, míg a gyöngytyúkoknál 241 bp és 243 bp. A hibrid egyedek esetében 260 bp vagy 264 bp és 243 bp allélméret volt megfigyelhető. A GUJ87 marker esetében házityúknál 161 bp, gyöngytyúknál 153 bp allélméret látható, a hibridekben mindkét allél (161 bp és 153 bp) detektálható volt (42. ábra). A markerek vizsgálatának eredménye alapján megállapítható, hogy mind a 38 vizsgált egyed a házityúk és a gyöngytyúk fajok hibridje volt.



42. ábra: Hibrid, sárga magyar tyúk és gyöngytyúk minták allélméretei. A GUJ1 marker esetében házityúk fajban 262 bp allélméret (kontroll SM GUJ1), gyöngytyúk fajban 241 bp és 243 bp allélméret (kontroll GY GUJ1) látható. Az egyik hibrid egyed (H1) egy allélt a házityúktól (264 bp), egy allélt pedig a gyöngytyúktól (243 bp) hoz. A másik hibrid egyed (H2) esetében is megfigyelhető egy házityúkével egyező (260 bp) és egy gyöngytyúkével egyező (243 bp) allél. A GUJ87 allél esetében házityúkban 161 bp allélméret (kontroll SM GUJ87), gyöngytyúkban 153 bp allélméret (kontroll GY GUJ87) figyelhető meg, a hibridek (H1, H2) esetében mindkét allél (161 bp, 153 bp) látható.

6.2.4. A felnevelt hibridek fenotípusának leírása

A gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezése során megfigyelhető volt, hogy a kikelt hibridek 1 hetes korukban a sárga magyar csibéktől eltérően nem egyszínű világosbarnák, hanem hátukon a gyöngytyúk csibékre jellemző, de kevésbé kifejezett sötét csíkok láthatók, szárnyuk sávozott mintát mutat. (43-44. ábra). 18 hetes korukra testméretük mindkét fajtától nagyobb, farkuk hosszú, lefelé álló, hátuk enyhén boltozatos, szárnyuk testhez simuló (45. ábra).



43-44. ábra: 1 napos és 1 hetes hibrid csibék

45. ábra: 18 hetes hibridek

A felnevelt hibridek között alapvetően három fenotípus volt megfigyelhető: egy sötétebb barna (46. ábra), egy világosabb barnás-vöröses változat, gyöngytyúkra jellemző sávozottsággal (47. ábra), valamint egy fehér foltos változat (48. ábra). Arcuk csupasz, a sisak, a taraj és az álllebeny minden esetben hiányzott vagy kisebb lebenykezdemény volt látható, csőrük erős, enyhén ívelt volt.



46. ábra: sötétbarna színváltozat



47. ábra: barna-vörös színváltozat

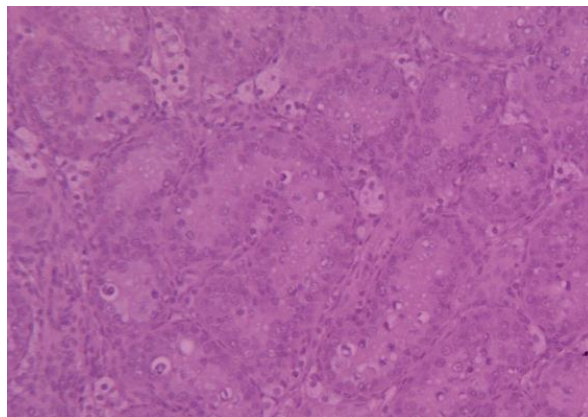


48. ábra: fehér foltos színváltozat

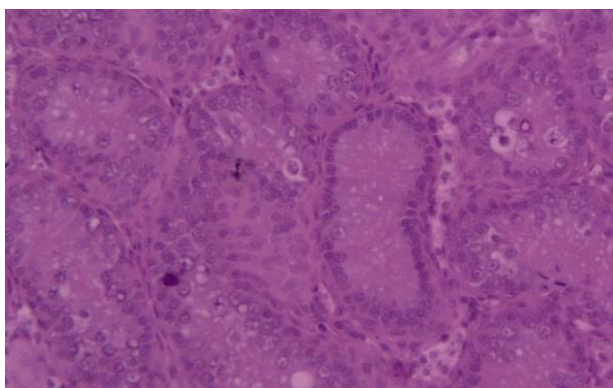
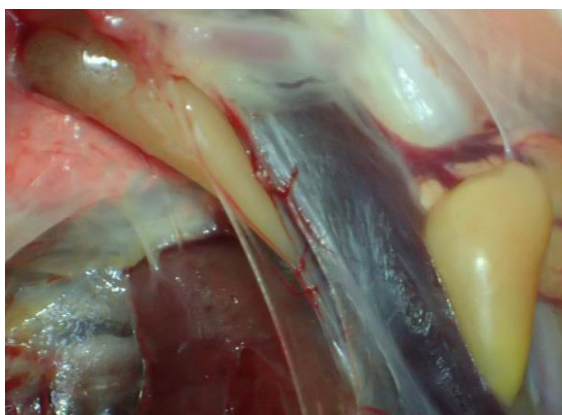
A fordított keresztezéskor kikelt, házityúk tojó-gyöngytyúk kakas hibrid a fentebb (48. ábra) látható, fehér foltos színváltozatot mutatta.

6.2.5. Az ivarszervek fejlettségének vizsgálati eredményei a 16. és a 30. élethét között

A nevelés és mintavételek során megfigyelhető volt, hogy minden hibrid egyed két ivarszervvel rendelkezett, ezek általában nem egy magasságban helyezkedtek el és enyhén hajlott formát mutattak (49-52. ábra). A 16. és 30. élethét között méretük lényegesen nem változott, hosszuk 2-2,5 cm, szélességük 0,3-0,5 cm között maradt. A 16-20 hetes egyedek ivarszerveinek szövettani metszetén szabálytalan alakú, 2-3 sejtréteg vastagságú tubulusok láthatók. Spermatociták és spermiumképződésre utaló jel nem látszik, minimális osztódási aktivitással inaktív, illetve infantilis herék figyelhetők meg (49b., 50b. ábra).

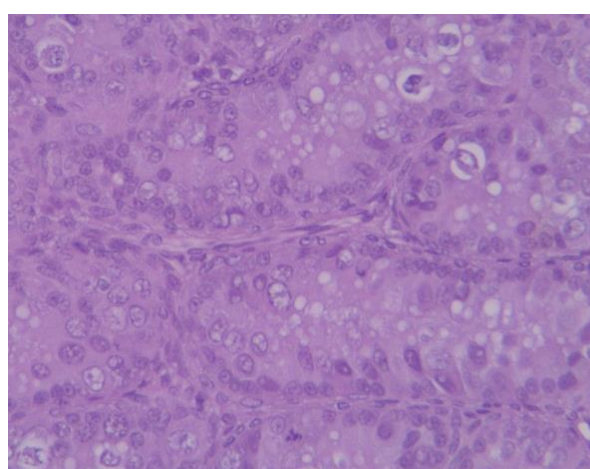


49a,b. ábra: 16 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe

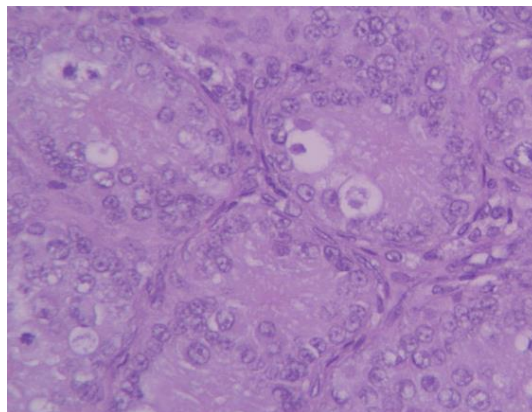


50a,b. ábra: 20 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe

A 22. és 30. élethét között vizsgált egyedek ivarszervei normális tubulus szerkezettel jellemezhetők, azonban a sejtek polimorfíát mutatnak, szórványosan óriássejtek láthatók. A tubulusok lumenében néhol habos sejtmag struktúrát vagy perichromáziát mutató sejtmaggal rendelkező hámsejtek figyelhetők meg. A csírahám inaktív, spermiumképződésre utaló jelek nem láthatók. (51b, 52b. ábra)

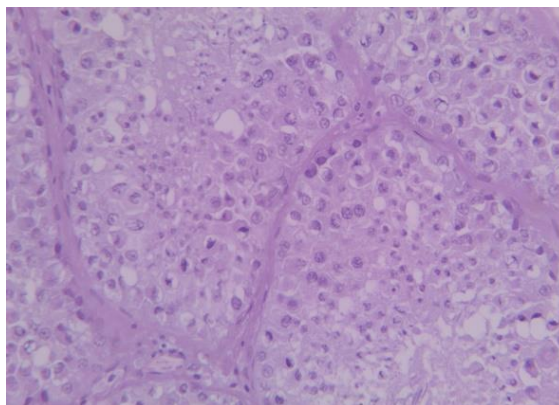


51a,b. ábra: 24 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe



52a,b. ábra: 30 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe

A kontrollként megfigyelt gyöngytyúk esetében a hímek heréi kifejlődtek (53a,b. ábra), hosszuk elérte a 3-3,5 cm-t, szélességük pedig az 1,5-2 cm-t, ez nagymértékben meghaladta a hibridek ivarszerveinek méretét. A tojók petefészke is kifejlődött a 16. élethétre, a 26. héten pedig tojni kezdtek. (54. ábra)



53a,b. ábra: 30 hetes gyöngytyúk kakas heréi és a herék szövettani metszetének képe

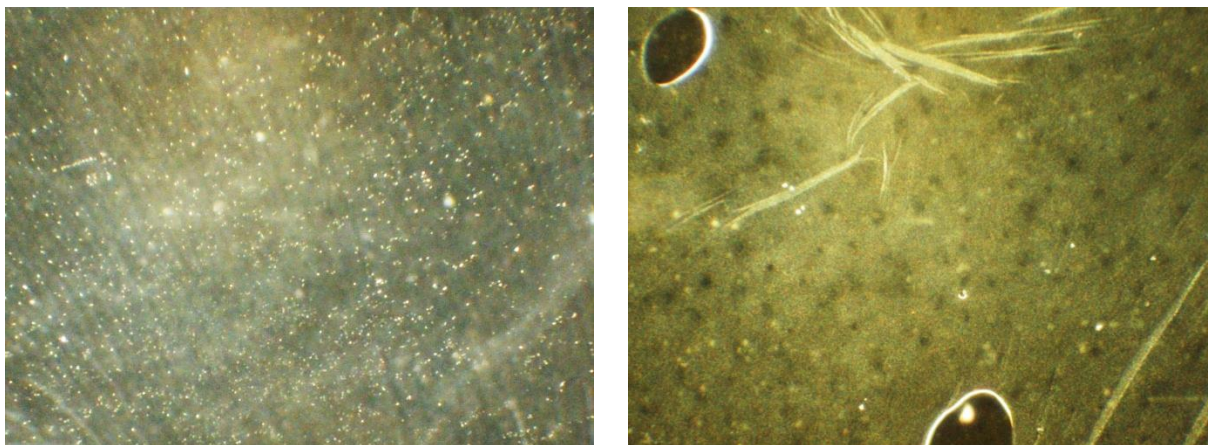


54. ábra: 30 hetes gyöngytyúk tojó petefészke

Az embrionális ivarszervek vizsgálati eredményeitől eltérően, a nevelés során vizsgált 38 egyed mindegyike hímivarú volt.

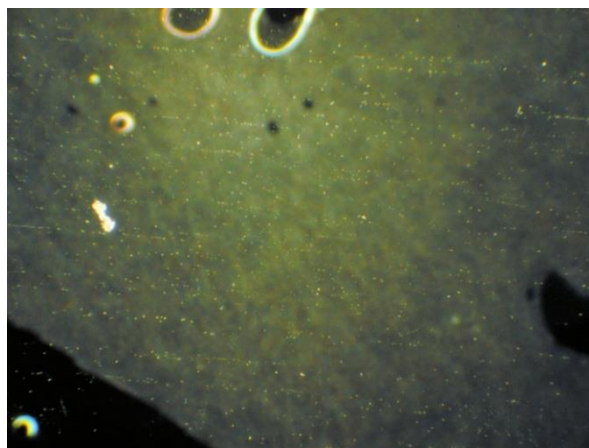
6.2.6. A termékenyítőképesség *in vitro* vizsgálatai

In vitro vizsgáltam a sikertelen keresztezési kombinációnál (házityúk tojó x gyöngytyúk kakas) előforduló terméketlenség lehetséges okait. A begyűjtött keltetőtojások vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy a gyöngytyúk spermiumok az esetek 37 %-ában nem találták meg a házityúk petesejtjét, azaz nem volt látható penetrációs nyílás a szikmembránon. 42 %-ban nem a csírákorong felett, hanem a környező régióban nagyon sok, nem jellegzetes penetrációs nyílás volt megfigyelhető. A termékenyüléshez a csírákorong területén legalább 6 penetrációs nyílás szükséges házityúk fajban (Wishart 1997). A vizsgálat során 9%-ban több mint 6, 12 %-ban pedig kevesebb, mint 6 nyílást találtam a csírákorong területén (55-56. ábra). Az eredmény alapján feltételezhető, hogy a gyöngytyúk spermiumok képesek ugyan a termékenyítés helyszínére eljutni, azonban a feltételezett kémiai vagy egyéb jelátviteli út (chemotaxis) gátolt, illetve a spermiumkötő receptorok fajspecifikussága miatt a két faj keresztezésének ez a kombinációja nem működik. Tehát csak véletlenszerűen következhet be, hogy a gyöngytyúk spermium pont a csírákorong felett hatol át a membránon. Emellett az is elmondható, hogy a megfigyelt penetrációs nyílások nem olyan kifejezetek, mint normál esetben, aminek feltételezett oka az lehet, hogy a gyöngytyúk spermiumok akrozinja nem tudja megfelelően bontani a membrán szerkezetét.



55-56. ábra: Penetrációs nyílások a csírákorong területén és a csírákorong területén kívül
(Készítette: Végi Barbara)

Az *in vitro* membránteszt során látható volt, hogy csak nagyon kevés gyöngytyúk spermium volt képes penetrációs nyílást készíteni a házityúk tojás perivitellin membránján (57. ábra).



57. ábra: Gyöngytyúk spermiumok *in vitro* penetrációs nyílásai tyúktovás membránon
(Készítette: Végi Barbara)

6.3. GFP-t tartalmazó ősvarsejtek 3 napos embriókba történő injektálásának eredményei

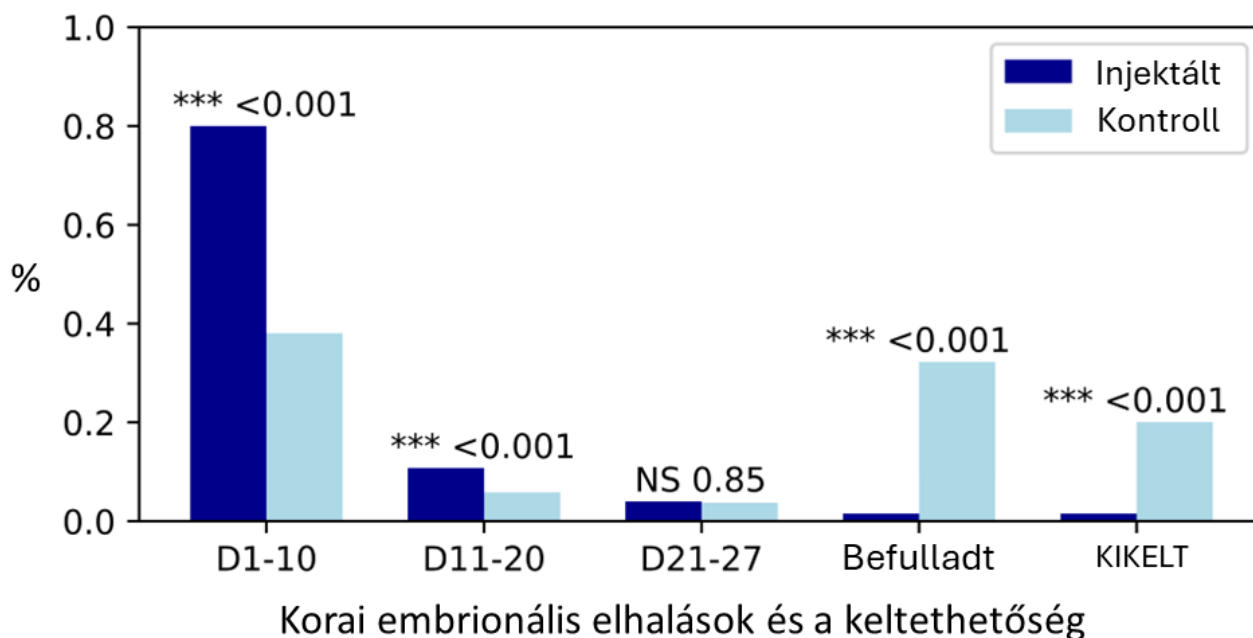
6.3.1. A fejlődés során elhalt injektált embriók fenotípusos vizsgálatának eredménye

Az injektált embriók 57,85%-a (188 db) a keltetés első 5 napjában halt el, ezen belül az injektálás időpontjában (D3) elhaltak az összes injektált embrió 32%-át (104 db) teszik ki. A 6. és 10. nap között elhaltak aránya 21,85% (71 db), a 11. és 15. nap között 5,54% (18 db), a 16. és 20. nap között 4,62% (15 db), a 21. és 27. nap között pedig 4,31% (14 db). Az embriók 2,77%-ánál (9 db) volt megfigyelhető fejlődési rendellenesség, ez az esetek többségében nyitott hasfalat, néhány esetben pedig a felső és/vagy alsó csőrkáva rendellenességét jelenti. A befűlladt egyedek aránya 1,54% (5 db) volt, valamint az injektált tojások 1,54%-a (5 db) kelt ki, melyek közül két egyedet ivarérésig neveltem (58-59. ábra).



58-59. ábra: Injektált hibridek kelést követően és 40 hetes korban

A nem injektált (kontroll) és injektált hibridek keltetésének adatait összehasonlítva, a keltetés első 10 napjában elhalt (D1-10), a 11. és 20. napja között elhalt (D11-20) embriók, valamint a befulladt és kikelt egyedek esetében is szignifikáns eltérés figyelhető meg a két csoport között. A keltetés 21. és 27. napja között elhalt (D21-27) embriók arányában nem figyelhető meg szignifikáns eltérés (60. ábra, M3-as melléklet).



60. ábra: Az embrióelhalás és a keltethetőség összehasonlítása a kontroll és injektált hibridek esetében. A kategóriák összehasonlítása páros Z-tesztekkel történt, az alábbi szignifikanciaszintek alkalmazásával: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

Az injektált embriók elhalásának kimagasló számát a keltetés első tíz napjában a 3. napon végzett injektálási eljárás okozhatta, valamint a keltetés későbbi időszakában (a 11-20. napon) kimutatott szignifikáns eltérés oka lehet, hogy az injektált tojások inkubálása parafilmmel lezárt ablakkal folytatódott. A tojáshéjon nyitott ablakon keresztül a különböző kórokozók könnyebben jutnak be a tojásba és megfertőzhetik a fejlődő embriót. A befulladt és kikelt egyedek esetében a kontroll csoportnál megfigyelhető nagyobb számú befulladt csibe azt jelzi, hogy a gyöngytyúktojás vastag héja megnehezíti az embriók kelését. A kelést megelőzően nehéz megállapítani, hogy a csibének szüksége van-e emberi beavatkozásra a kelés megkönnyítéséhez és ha igen, akkor az mikor szükséges az elhúzódó kelési időszak (21-27 nap) alatt. A házityúk és gyöngytyúk fajok keltetésének paraméterei is jelentősen eltérnek. A keltetések során megfigyelhető volt, hogy a paraméterek módosításával, például a páratartalom megemelésével növelhető a kikelt egyedek aránya. Az injektált egyedek esetében bűjtatáskor hatékonyabban segíthető az embrió az ablaknak köszönhetően, azonban az ablak jelenléte a hibrid egyedek optimális keltetési paramétereire is hatással lehet.

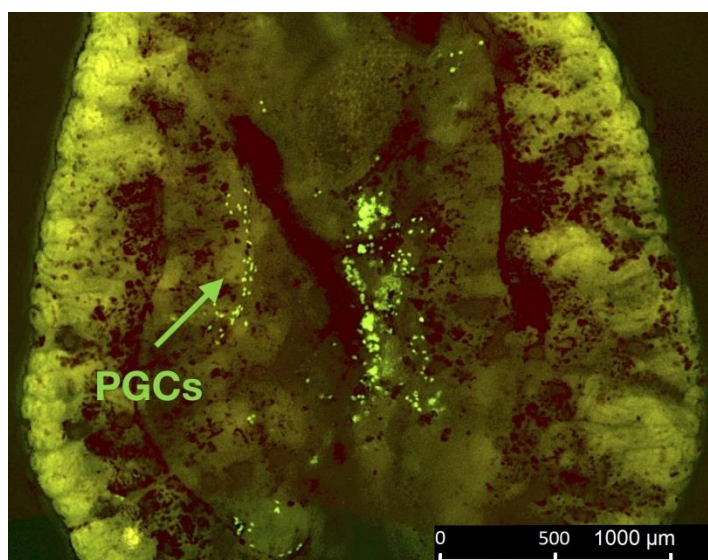
6.3.2. Az injektált sejtek embrionális ivarszervben való jelenlétének vizsgálati eredményei

147 injektált embrió ivarszerveit vizsgáltam az embrionális fejlődés során 7,5; 14,5 és 18,5 napos korban (2. táblázat, M3-as melléklet).

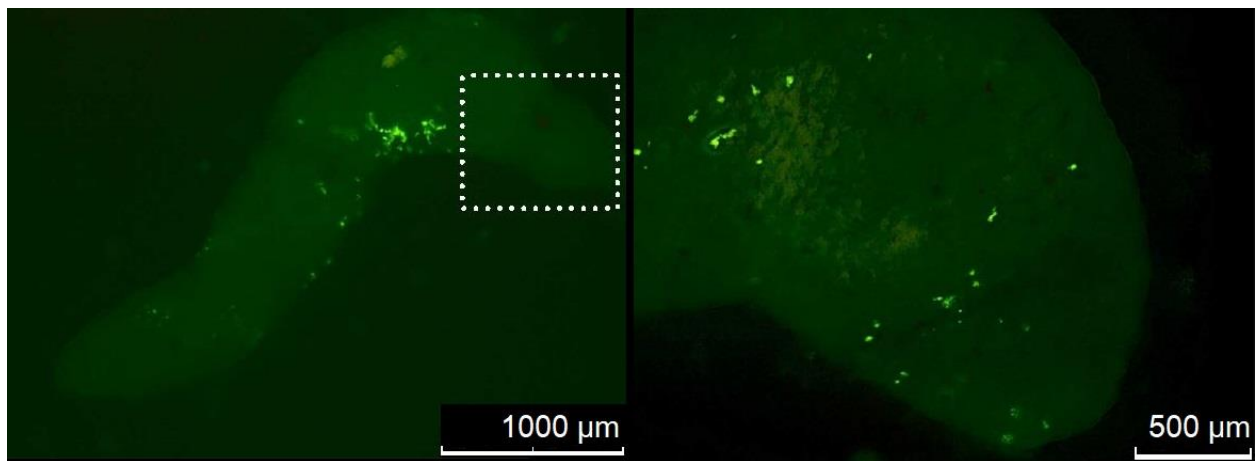
2. táblázat: Az injektált sejtek ivarszervbe épülésének vizsgálata 7,5 napos, 14,5 napos és 18,5 napos embrióban

Embrió kora	Injektált embriók száma	Élő embriók száma és aránya (%)	GFP-pozitív embriók száma és aránya (%)
7,5 nap	30	15 (50%)	12 (40%)
14,5 nap	75	4 (5,3%)	4 (5,3%)
18,5 nap	42	1 (2,4%)	1 (2,4%)
Összesen	147	20 (13,6%)	17 (11,6%)

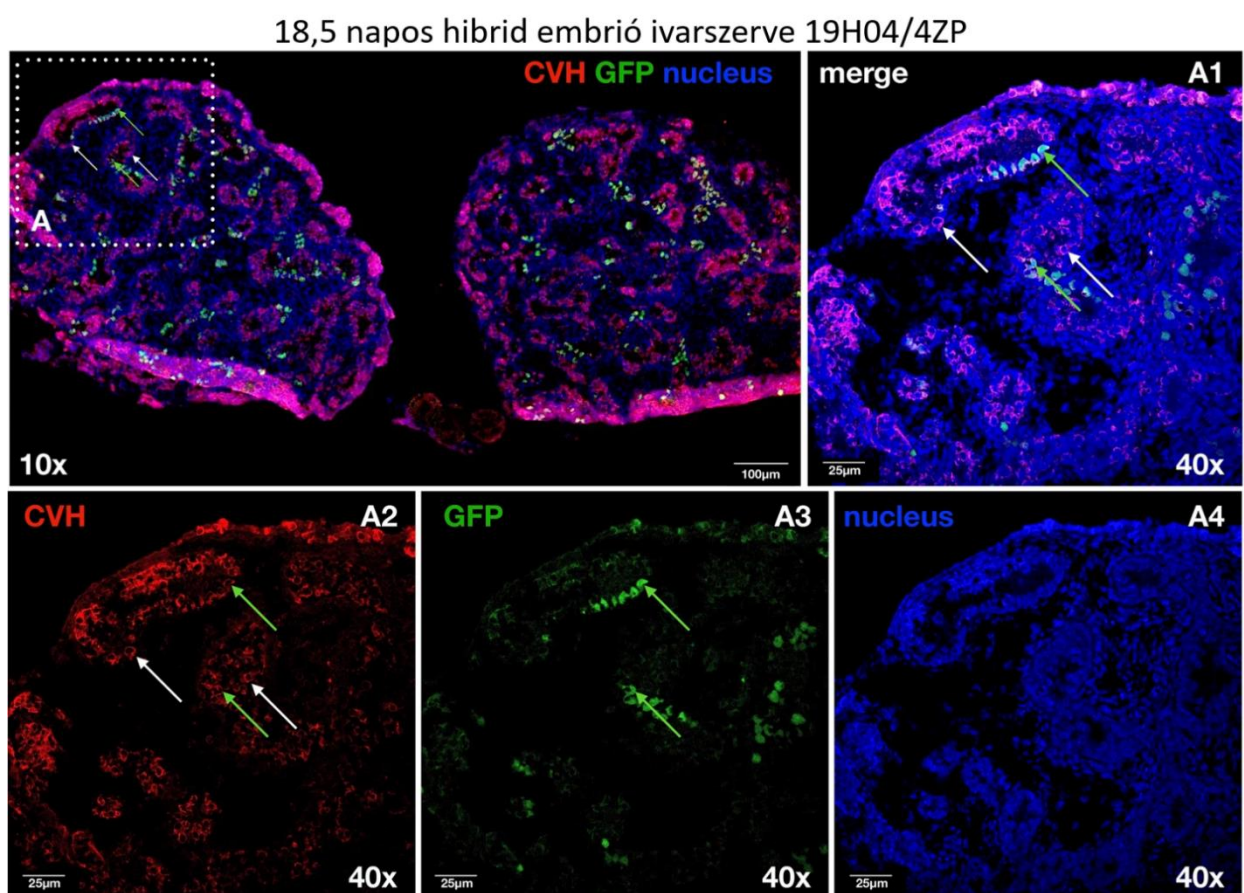
7,5 napos korban 30 injektált embrió közül 15 volt életben a vizsgálat időpontjában, ezek közül 12 db tartalmazott integrálódott injektált sejteket (61. ábra). 75 embriót vizsgáltam 14,5 napos (62a,b. ábra), 42 embriót pedig 18,5 napos korban (63. ábra). Az ősvarsejtek azonosítására a fejlődés teljes ideje alatt alkalmas, citoplazmában expresszálo CVH antitestet használtam, ami piros festődéssel látható. A vizsgálat idején élő embriók mindegyikében megfigyelhetők voltak az injektált, ivarszervbe épült donor eredetű ősvarsejtek.



61. ábra: 7,5 napos embrió ivarszerve
(Készítette: Lázár Bence)



62a,b. ábra: 14,5 napos embrió ivarszerve (Készítette: Lázár Bence)



63. ábra: Donor és recipiens eredetű ősvarsejtek vizsgálata 18,5 napos injektált embrió jobb és bal ivarszervében (19H04). A CVH-t expresszáló PGC-k piros színnel, a donor eredetű GFP-t expresszáló PGC-k zöld színnel láthatók, a magfestés kék színnel látható. A fehér nyilak két recipiens eredetű PGC-t, a zöld nyilak két ivarszervbe integrálódott donor eredetű PGC-t mutatnak.

6.3.3. Ivarérett egyedek ivarszerveinek vizsgálati eredményei

Két felnevelt injektált hibrid egyed ivarszerveiben vizsgáltam a különböző érési stádiumban lévő spermatidák és spermiumok jelenlétét hagyományos szövettani metszeteken, illetve,

immunhisztokémiai festéssel, és hasonlítottam össze hasonló korú, nem injektált kontroll egyed ivarszervével.

A felnevelt injektált hibridek ivarszervei a kontroll egyedhez hasonlóan nem egy magasságban helyezkednek el és kissé meghajlott formát mutatnak, azonban méretük valamivel nagyobb, formájuk lekerekítettebb és kevésbé hosszúkas (64-66. ábra). A házityúk hím ivarszerveinek fejlődéséhez (Mfoundou *et al.* 2022) hasonlítva a hibridek heréinek érése jóval lassabb folyamat.



64. ábra: kontroll egyed ivarszerve

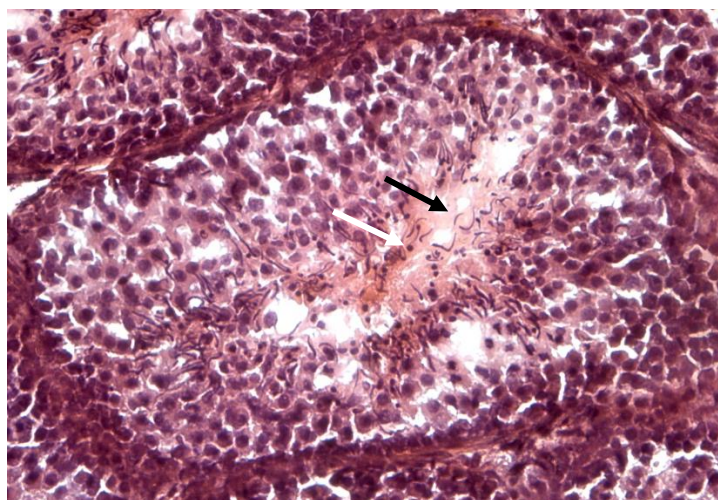


65. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszerve



66. ábra: Injektált hibrid (21H355) ivarszerve

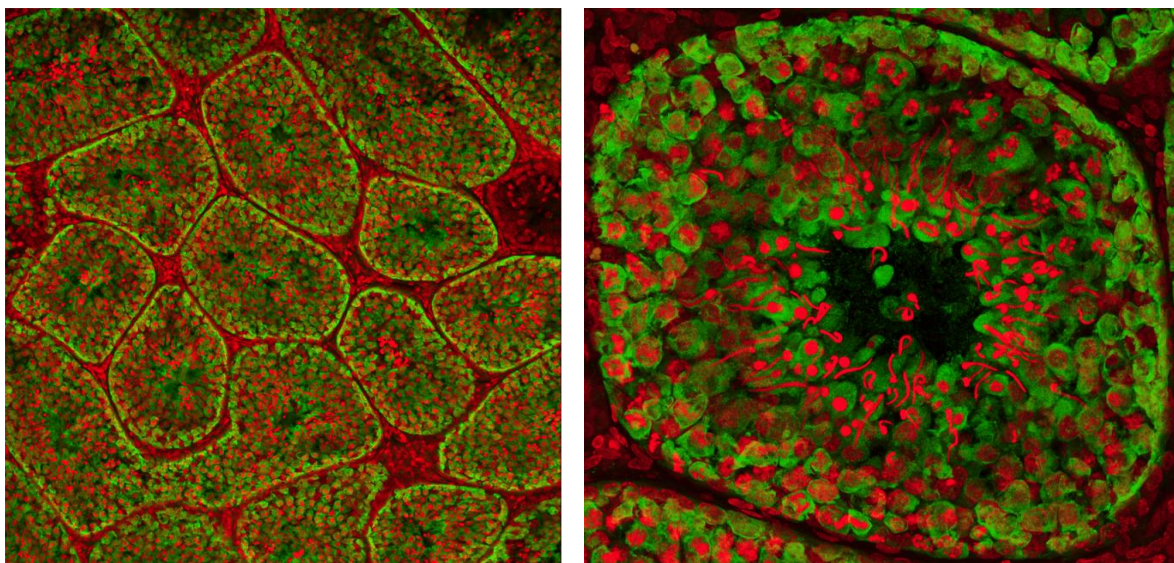
Az egyik injektált egyed (21H268) ivarszervét 46 hetes korban szövettani metszeteken vizsgálva megállapítható, hogy az érés különböző stádiumában lévő spermatidák, továbbá érett spermiumok is megfigyelhetők a herecsatornáknakban. (67. ábra)



67. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszervének hematoxin-eozinnal festett szövettani metszete (fehér nyíl jelöl egy spermatidát, fekete egy érett spermiumot)

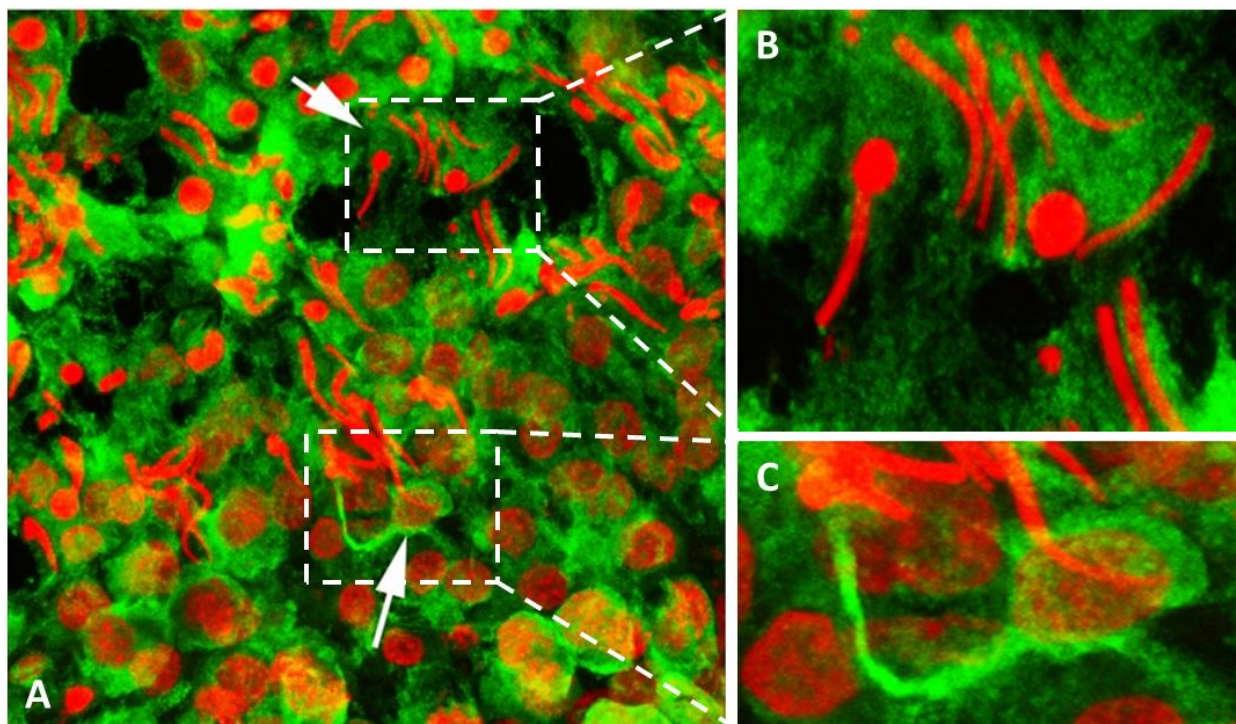
Az immunhisztokémiai festés során a DNS-hez kötődő fluoreszcens festéket, a DAPI-t alkalmaztam. Az injektált egyedek vizsgálata során az eredetileg kék színnel fluoreszkáló, sejtmagban expresszáló DAPI nem különült el megfelelően a GFP-t expresszáló sejtek zöld színétől, így a megjelenített színeket a kétféle festődés határozottabb elkülönítése érdekében, a konfokális mikroszkóp segítségével mesterségesen módosítottam, ennek eredményeként a

sejtmagok piros festődéssel láthatók a metszeteken, az injektált, donor eredetű GFP-t expresszáló sejtek zöld színűek. A vizsgálat eredménye mutatja, hogy az ivarszerv szinte 100%-ban a donor eredetű GFP-t expresszáló sejtekből fejlődött ki. (68-69. ábra).



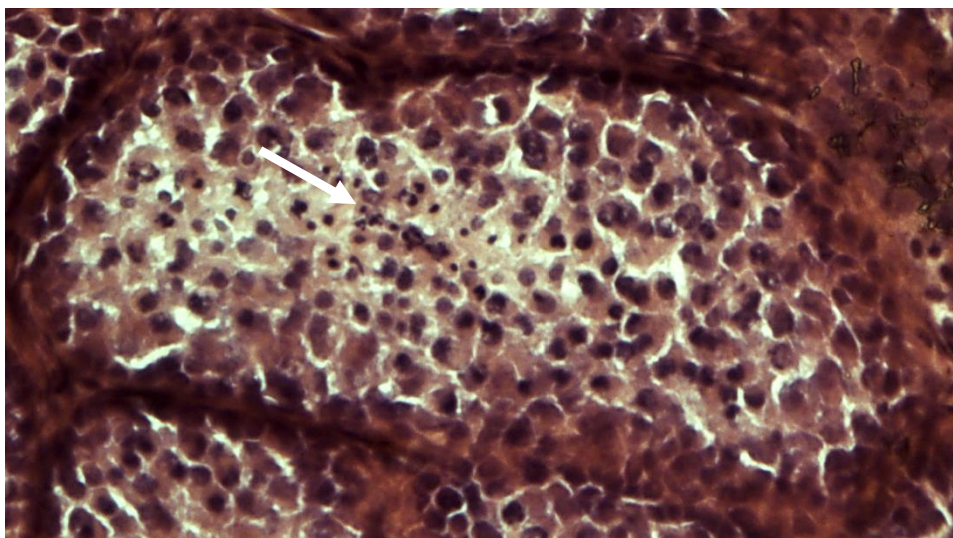
68-69. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszervének metszetei

A GFP jelet felerősítő anti-GFP-vel való festést követően a metszeteken jól láthatóvá vált, hogy az ivarszervben különböző érési fázisban lévő ivarsejtek donor eredetűek. (70. ábra) A citoplazmában megjelenő GFP az ivarsejtek előalakjaiban jobban megfigyelhető, az érett spermiumok magas DNS-tartalmuk miatt piros színnel (DAPI) láthatók.



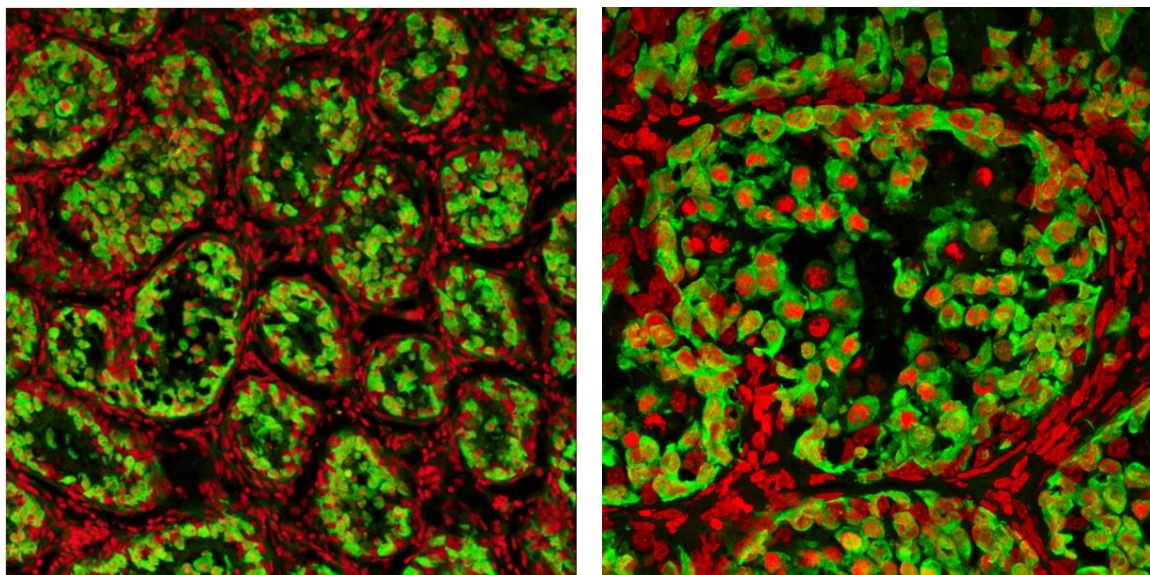
70. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszerve immunfestett metszeten: (A): különböző érési stádiumban lévő, donor eredetű ivarsejtek. (B): érett ivarsejtek és spermatozoa. (C): GFP-t expresszáló spermatozoa. Zöld színnel (anti-GFP) láthatók a GFP-t expresszáló sejtek, piros színnel (DAPI) a sejtmagok.

A másik, 42 hetes korban vizsgált injektált hibrid (21H355) ivarszervének szövettani metszetén (71. *ábra*) érett spermiumok még nem, azonban korai érési stádiumban lévő spermatidák láthatók a herecsatornákban.



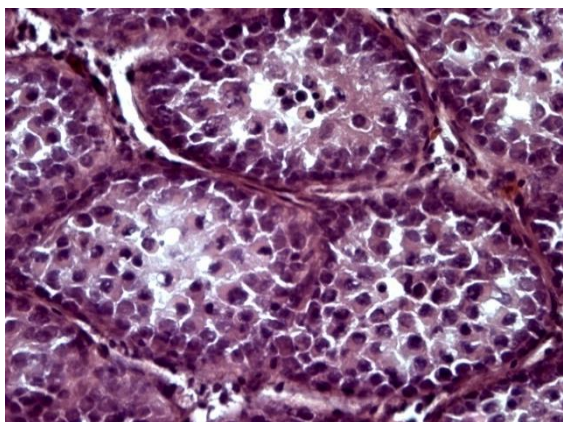
71. *ábra*: Injektált hibrid (21H355) ivarszervének hematoxilin-eozinnal festett szövettani metszete (fehér nyíl jelöl egy spermatidát)

Az immunfestett metszeteken ebben az esetben is zöld színnel (anti-GFP) láthatók a donor eredetű ősvarsejtekből fejlődött ivarszervszövet-részek, valamint piros színnel jelölve (DAPI) láthatók a sejtmagok (72-73. *ábra*).

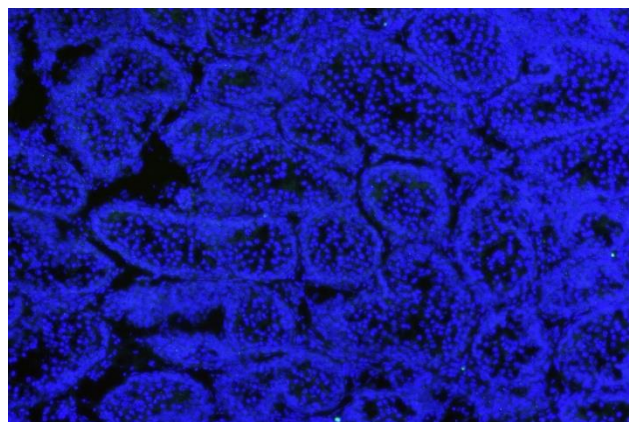


72-73. *ábra*: Injektált hibrid (21H355) ivarszerve immunfestett metszeten [zöld színnel (anti-GFP) láthatók a GFP-t expresszáló sejtek, piros színnel (DAPI) a sejtmagok]

A kontroll egyed ivarszerve is normális tubulus struktúrát mutat, azonban ivarsejtek és azok előalakjai nem láthatók a herecsatornáknakban. (74. ábra) Az injektált egyedektől eltérően, a kontroll hibrid ivarszervének metszetén kizárólag a kék magfestés látható. (75. ábra)



74. ábra: Kontroll egyed ivarszervének hematoxin-eozinnal festett szövettani metszete



75. ábra: Kontroll hibrid ivarszervének immunfestett metszete (DAPI, kék színnel láthatók a sejtmagok)

Összegezve az eredményeket elmondható, hogy sikeresen ültettem be házityúk ősvarsejteket steril fajhibrid recipiens embrióba. A beültetett sejtek kolonizálták a dajka szervezet gonádját, és azokból morfológiailag érett spermiumok fejlődtek.

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A madarak génmegőrzése során nehézséget okoz a nőivar hosszútávú megőrzése, melynek egyik ígéretes módja az ősvarsejtek (PGC-k) felhasználása, ugyanis a megőrizni kívánt donor eredetű sejteket recipiensbe ültetve egy lépésben visszanyerhető a donor genotípus (Nakamura *et al.* 2010a, 2013; Wernery *et al.* 2010, Kang *et al.* 2008). Az eljárás hatékonyságát nagyban csökkenti, hogy a beültetett donor ivarsejtek mellett recipiens eredetű, a génmegőrzés szempontjából haszontalan ivarsejtek, illetve utódok is létrejönnek. Arányuk csökkentésére, azaz a recipiens egyed ivarsejtfejlődésének gátlására számos módszert alkalmaztak már sikeresen (buszulfán, UV, γ -sugárzás), azonban ezek az eljárások nagy kockázatot jelentenek a recipiens életképességére vonatkozóan (Reynaud 1969; Aige-Gil & Simkiss 1991a,b; Carsience *et al.* 1993; Etches *et al.* 1993; Fraser *et al.* 1993; Bresler *et al.* 1994; Thoraval *et al.* 1994). A génszerkesztés ezen a kutatási területen is hatékony eredményt hozhat, akár 100%-kal is lecsökkentheti a recipiens eredetű ősvarsejtek számát (Panda & McGrew 2022), azonban számos országban jogi akadályokba ütközik.

A dolgozatban leírt kísérlet-sorozat egy alternatív irányból, fajhibridek létrehozásával célozta meg egy steril recipiens létrehozását. A kísérlet során a gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezése sikeres volt, viszont a házityúk tojók gyöngytyúk kakasokkal történő keresztezésekor a terméketlen tojások aránya drasztikusan megemelkedett, csupán egy hibrid utód kelt ki, azonban az az egy nem különbözött a fordított irányú keresztezéssel létrehozott hibridektől. A nagyarányú terméketlenség oka valószínűleg az, hogy csak kevés számú gyöngytyúk spermium képes eljutni a termékenyítés helyszínére és a létrejövő penetrációs nyílások nagy része sem a megfelelő helyen (a csírákorong felett) található. Ezt okozhatja az, hogy a spermiumokat a csírákorong megtalálásában segítő és az ivarsejtek közti fúzióhoz szükséges jelátviteli utak (kemotaxis, a spermiumkötő receptorok aktivitása, akroszóma reakció) a két faj keresztezésének ebben a kombinációjában nem működnek.

A sikeres keresztezés (gyöngytyúk tojó x házityúk kakas) eredményeként létrejött és felnevelt hibridek mindegyike steril hím volt. Shibusawa *et al.* (2004) számolnak be 8 faj összehasonlító kromoszóma vizsgálatáról, ami alapján megállapítható, hogy a házityúk és gyöngytyúk esetében a két faj 5. kromoszómapárjában morfológiai eltérés figyelhető meg. Mott és munkatársai (1968) szerint a sterilitás oka lehet, hogy a morfológiai eltérés miatt akadályozott a homológ kromoszómapárok párosodása, ezért a gametogenezis nem folytatódik az első meiózis után, amit a hibridek szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatának eredménye is alátámasztott. A szövettani vizsgálatok azt mutatták, hogy a hibridek nem termelnek saját spermiumokat, azonban az ivarszerveik tubulusai normál struktúrával rendelkeznek, ami arra enged következtetni, hogy

képesek lehetnek a donor eredetű ősvarsejtek befogadására. Az immunhisztokémiai vizsgálat során megállapítottam, hogy embrionális korban a saját ősvarsejtek is jelen vannak a fejlődő ivarszervekben, azonban azok nem alakulnak érett spermiumokká az ivarézés során. A létrehozott hím hibridek sterilitása, valamint a nőivar életképtelensége összhangban van Haldane törvényével; miszerint ha két különböző állatfaj F_1 utódai közül az egyik ivar hiányzik, ritkán fordul elő vagy steril, az a heterogametikus ivar. (Haldane 1922). A gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezésének esetében ennek a szabálynak egy szélsőséges formája nyilvánul meg, mivel a nőivar (ZW) teljes mértékben hiányzik, a hímivar pedig steril.

A hibridek ivarszerveinek vizsgálata arra enged következtetni, hogy esetükben az ivarézés sokkal lassabb folyamat, mint a házityúk vagy akár a gyöngytyúk fajnál, ami feltételezhetően hormonális okokra vezethető vissza, mint például a tesztoszteront termelő Leydig-féle *interstitialis* sejtek alulműködésére vagy akár hiányára (Dimitriadis *et al*, 2015). Ezen túl a hibridek reprodukív teljesítményére hatással lehetnek a kevésbé domesztikált gyöngytyúkok szaporodásbiológiai jellemzői is, mint például, hogy csak a megfelelő környezeti körülmények (legalább 18°C és 14 órás fénytartam) hatására indul meg ivarsejttermelésük.

Mivel a felnevelt hibridek kizárólag hímivarúak voltak, további vizsgálatok szükségesek annak feltárására, hogy a nőivarú (ZW) ősvarsejtek képesek-e a hímivarú (ZZ) ivarszerveket kolonizálni, azokba integrálódni és fejlődhetnek-e életképes spermiumok ebből a genotíusból (ZW). Naito és munkatársai (1999) sikeresen állítottak elő donor eredetű utódokat a recipiens ivarától eltérő ivarú donor PGC-k beültetésével: a donor eredetű utódok aránya hím donor és nőivarú recipiens esetében 0,4-0,9%, nőivarú donor és hím recipiens esetében 0,1-0,3% volt, emellett a nőivarú ősvarsejtekkel injektált hím kiméráktól származó spermiumokban kimutatott W kromoszóma-specifikus szekvenciák is bizonyítják, hogy lehetséges a nőivarú genotípus megjelenése és örökítése hím kimérák felhasználásával is. Liu és munkatársai (2017) számoltak be házityúk PGC-k (ZZ) oogeneziséről egyszülős utódokban. Kísérletük során az *in vitro* fenntartott PGC-k (ZZ) funkcionáló petesejtté differenciálódtak a recipiens ivarszervi kimérák petefészkében és donor ősvarsejt eredetű egyszülős utódot kaptak, bizonyítva, hogy a madár PGC-k képesek akár ellenkező ivarú ivarszervben is funkcionáló ivarsejtekké fejlődni.

Trefil és munkatársai (2017) ivarérett, besugárzással sterilizált kakasok heréibe ültettek fluoreszcens fehérjével jelölt PGC-ket. A kakasok utódainak 60 és 64,3%-ában megjelent a donor genotípus, így eredményeik alapján megállapították, hogy az ősvarsejtek képesek kolonizálni a kifejlett herét is, ebben a környezetben is érett spermiumokká tudnak fejlődni és általuk továbbörökíthető a donor genotípus.

Xu és munkatársai (2019) számoltak be sügérfélék keresztezéséből származó kifejlett, steril fajhibrid (nőstény *Nibea mitsukurii* x hím *Pennahia argentata*) recipiensként való

alkalmazásáról, melybe spermatogoniális sejteket ültettek be. A beültetést követően 25 hét elteltével érett spermiumokat nyertek és a recipiensek 10%-a termelt donor eredetű ivarsejteket.

Marinovic és munkatársai (2022) szintén steril recipienst alkalmaztak hal ősvarsejtek transzplantációjához. Triploid steril szivárványos pisztráng lárvákba ültettek más lazacfélék ivarszervéből származó ősvarsejteket, majd 2 hónap elteltével mind a hímivarú (SSC), mind a nőivarú őssejtek (OSC) kolonizálni tudták a recipiens ivarszervet, azonban több év nevelést követően ivarsejtképződés nem volt megfigyelhető sem a hím, sem a nőivarú recipiensek esetében. Blank és munkatársai (2024) sterilizált csirke recipiensbe ültetettek egy szintén a tyúkalakúak (*Galliformes*) rendjébe tartozó, veszélyeztetett trópusi madárfaj ivarszervéből származó őssejteket (SSC) és azok ivarszervbe épülését figyelték meg 42 nappal a beültetést követően, azonban érett ivarsejteket nem sikerült kinyerniük. Park és munkatársai (2020) pedig japán fűj esetében számoltak be felnőttkori ivarszervből kinyert, majd mélyhűtve tárolt sejtek (TC-k) HH14-17-es stádiumú embriókba injektálásáról, melynek eredményeként 81-ből 20 recipiens esetében donor eredetű utódokat kaptak.

Az elvégzett kísérletsorozat eredményei és tapasztalatai alapján érdemes lehetne injektált hibrid egyedeket még tovább (46 hétnél hosszabb ideig) nevelni az ivarszerveikben termelt ivarsejtek kinyeréséhez és a donor genotípus visszanyeréséhez. Emellett további vizsgálatok tárgya lehet az ivari aktivitás szempontjából is szükséges hormonális háttér meglétének feltárása, aminek eredményétől függően akár a hibridek hormonkezelése is felmerülhet az ivarérettség, illetve ivarsejttermelés serkentésének céljából.

A vizsgálatokat érdemes lehet kiterjeszteni más hibrid kombinációk; például fűj x házityúk hibridek alkalmazásának tesztelésére, mivel az irodalmi források szerint (Asmundson & Lorenz 1957) ebben a hibridben mindkét ivar megjelenik.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Molekuláris genetikai módszerekkel igazoltam, hogy a gyöngytyúknak és a házityúknak van hibridje, amelyek közül kizárólag a hímivarúak életképesek.
2. Megállapítottam, hogy házityúk-gyöngytyúk fajhibridek előállítása csak gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezésével sikeres. A keresztezés fordított irányban nagyon rossz hatékonysággal működik, melynek oka az, hogy a gyöngytyúk spermiumok nem képesek megtalálni és penetrálni a házityúk csírákorongot.
3. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazoltam, hogy a gyöngytyúk x házityúk hibridje rendelkezik saját ősvarsejtekkel, azonban ezekből az egyedfejlődés során nem képződik érett ivarsejt. Szövettani vizsgálatokkal igazoltam, hogy a hibrid steril.
4. A létrehozott fajhibridekről megállapítottam, hogy alkalmasak az injektált donor eredetű ősvarsejtek befogadására és immunfestéssel igazoltam, hogy a felnevelt állatok ivarszerveiben megtalálhatók a beültetett ősvarsejtekből származó különböző stádiumú előalakok és érett ivarsejtek is.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A ritka vagy veszélyeztetett fajok védelme nem csak vadon élő állat- és növényfajok esetében, hanem a kevésbé közismert, a mindennapi gazdálkodási gyakorlatból kiszorult, azonban értékes kulturális és tudományos értékeket képviselő, mára már génbanki fenntartásukon kívül eltűnőben lévő haszonállatfajok, illetve fajták esetében is fontos feladatunk. Számos emlősfaj különböző génbanki mintáinak megőrzésére kidolgozott protokoll áll rendelkezésre, azonban ezek többsége madarakra nem, vagy csak részben adaptálható, jelentős mértékben eltérő szaporodásbiológiai tulajdonságaik miatt. A már sok madárfaj, illetve fajta esetében biztonságosan alkalmazható spermamélyhűtési technológia nem biztosítja a teljes genetikai anyag megőrzését, ahhoz szükséges a nőivar biztonságos megőrzése is, ami azonban a tojás nagy méretét és speciális összetételét tekintve különös kihívást jelent. Az ezzel kapcsolatos kutatások elsősorban az embrionális őssejtek, illetve naposkori ivarszervszövetek kinyerésére, biztonságos tárolására és felhasználási lehetőségeire fókuszálnak. A donor eredetű ősvarsejtek (PGC-k) recipiensbe ültetésüket követően képesek a fejlődő ivarszerv kolonizálására, így a létrehozott kiméra egyed a donor genotípust örökítheti tovább. Az eljárás során minden esetben problémát jelent, hogy a recipiens a beültetett donor genotípus mellett saját ivarsejteket is termel, ami nagyban befolyásolja a módszer hatékonyságát. A recipiens eredetű ivarsejtek képződésének gátlására több módszer is létezik, ezek azonban kockázatosak a recipiens embrió életképességére vonatkozóan, illetve a precíz és gyors eredményt jelentő génszerkesztés pedig számos országban jogi akadályokba ütközhet, így a jelen kísérletsorozat a recipiensek sterilizálásának elérését egy alternatív irányból közelíti meg: gyöngytyúk és házityúk fajok keresztezésével steril interspecifikus hibrid létrehozását és a PGC-k befogadására való alkalmasságának vizsgálatát tűzte ki célul.

A két faj keresztezése kizárólag a gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok esetében volt sikeres, a fordított kombináció, azaz a házityúk tojók és gyöngytyúk kakasok keresztezése sikertelen volt, csupán 1 db (0,14%) utód kelt ki.

A gyöngytyúk tojó-házityúk kakas hibridek előállítása során többek között vizsgáltam a keltethetőséget, kelésidőt, a fejlődési és kromoszóma rendellenességek előfordulásának gyakoriságát, ősvarsejtek jelenlétét az ivarszerveikben, az életképes egyedek fenotípusát és ivarszerveik fejlődését a nevelés során. A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei alapján a kikelt és felnevelt egyedek mindegyike steril hím volt. Ivarszerveik vizsgálatának eredményei szerint normál tubulus szerkezettel rendelkeztek és jelen voltak bennük a saját ősvarsejtek, azok azonban nem fejlődtek érett spermiumokká, így a beültetett PGC-k befogadására való alkalmasságukat teszteltem GFP-t expresszáló ősvarsejtek 3 napos

hibrid embriók véráramába injektálásával. A sejtek ivarszervbe épülését vizsgáltam embrionális korban (7,5; 14,5 és 18,5 napos korban), valamint felnevelt egyedek esetében is. A vizsgálat időpontjában élő, embrionális korban vizsgált embriók 85%-ában megfigyelhetők voltak az injektált donor eredetű sejtek. A két felnevelt injektált hibrid ivarszervének vizsgálata során mindkét esetben detektálható volt a beültetett sejtek ivarszervbe integrálódása. Továbbá mindkét egyed esetében a spermiumok különböző érési stádiumban lévő előalakjai voltak megfigyelhetők, az egyik egyed esetében pedig érett spermiumokat is azonosítottam.

Az elért eredmények alapján a gyöngytyúk tojók házityúk kakassal való keresztezése elegendő számú termékeny tojást eredményez az injektálási eljáráshoz, valamint az így létrehozott hibridek sterilek és kizárólag a donor eredetű genotípus jelenhet meg az ivarszerveikben. Ezáltal alkalmas recipiensek lehetnek donor eredetű ősvarsejtek befogadására és ivarsejtek termelésére. Sterilitásuk kihasználható az ősvarsejt alapú génmegőrzési eljárások során, valamint az elért eredmények hozzájárulhatnak a madár génmegőrzési módszerek lehetőségeinek bővítéséhez, az egyéb hibrid kombinációk alkalmasságának vizsgálata pedig további kutatási lehetőséget is nyújt ezen a területen.

10. SUMMARY

Protection of rare or endangered species is important not only for wild, but also for livestock species that have cultural and scientific values but receive less attention. Many species excluded from everyday farming practices and threatened with extinction without genetic conservation programs. In the case of several mammalian species, protocols are available for the conservation of different genetic material, but most of these technologies are not or only partially adaptable to birds due to their significantly different reproductive biology. Semen freezing technology is already used in the case of many avian species and breeds, but it does not ensure the preservation of the entire genetic material, it also requires the safe conservation of the female sex, which is a particular challenge because of the large size and specific composition of the egg. Avian gene preservation research focus on the collection, safe preservation and potential use of the early embryonic stem cells and gonadal tissues of 1-day-old hatchlings. After the injection of donor derived primordial germ cells (PGCs) into surrogate host animal, the cells can colonize the embryonic gonad and this chimeric bird will be able to produce donor derived gametes. During this procedure, it is always a problem that the host animal has not only donor derived gametes, but also contains its own germ cells that greatly affect the efficiency of the transplantation. There are several methods to inhibit the formation of gametes in the recipient; however, these procedures involve high risk regarding the viability of the embryo. Gene editing, which provides precise and fast results, may encounter legal obstacles in many countries, therefore the present experiments approach the achievement of recipient sterility from an alternative direction: to create a sterile interspecific hybrid host by crossing Guinea fowl and domestic fowl species and test its suitability to receive PGCs.

Crossing of the two species was successful with female Guinea fowl and male domestic fowl, but the reverse crossing (female domestic fowl x male Guinea fowl) was unsuccessful, only 1 chick (0,14%) hatched.

During the production of Guinea fowl x domestic fowl hybrids, the hatchability, the hatching time, the incidence of developmental and chromosomal abnormalities, the presence of germ cells in the gonads, the phenotype and the development of the gonads during maturation was investigated. Histological and immunohistochemical analysis showed, that every hatched and raised individuals were sterile males. Based on the results of the analysis, the gonads samples displayed a typically normal tubular structure, the presence of their own germ cells was observed, but the cells did not develop into mature spermatozoas. Therefore their ability to receive donor derived PGCs was tested by injection GFP-labelled PGCs into the bloodstream of 3-day-old embryos. Integration of the cells into the gonads was investigated during embryonic

development (7.5, 14.5 and 18.5 days old) and in the case of adult individuals. During the investigation of the embryos, 85 % of the living embryos contained GFP positive donor cells in their gonad. During the examination of the two raised injected individuals, integration of donor derived cells were observed in the gonads. Precursors of spermatozoa in different maturation stages were seen in their gonads and in the case of one hybrid mature spermatozoa were identified.

Based on the results, crossing of female Guinea fowls and male domestic fowls results sufficient numbers of fertile eggs for the procedure of injection, the produced hybrids are sterile and only the donor-derived genotype can appear in their gonads, thereby they can be suitable hosts for donor germ cells and can produce donor-derived gametes. Their sterility can be exploited in stem cell-based gene conservation procedures and these results may contribute to the expansion of the possibilities of avian gene preservation methods. The investigation of the suitability of other hybrid combinations will also provide further opportunities in this field of research.

11. MELLÉKLETEK

M1 – Irodalomjegyzék

- AIGE-GIL V. AND SIMKISS K. (1991a): Sterilising embryos for transgenic chimaeras. In: *British Poultry Sci.* 32, 427-438.
- AIGE-GIL V. AND SIMKISS K. (1991b): Sterilization of avian embryos with busulphan. In: *Res. in Vet. Sci.* 50, 139-144.
- AIRE T. A. (2011): Anatomy of the testis and male reproductive tract. In: Jamieson B.G.M. (Szerk.): *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds, Part A: Phylogeny, Morphology, Hormones and Fertilization*. Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth. 37–113. p.
- ALEV C., NAKANO M., WU Y., HORIUCHI H., SHENG G. (2013): Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cells. In: *Methods Mol Biol.* 2013;1074:151-73. DOI: 10.1007/978-1-62703-628-3_12.
- ALIABADIAN M., NIJMAN V. (2007): Avian hybrids: incidence and geographic distribution of hybridisation in birds. In: *Contributions to Zoology*, 76 (1) 59-61
- ASMUNDSON V.S., LORENZ F.W. (1957): Hybrids of Ring-Necked Pheasants, Turkeys, and Domestic Fowl. In: *Poultry Science*, Volume 36, Issue 6, 1957, 1323-1334. p. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0361323>
- BAKST M.R. (2002): Oviducal Sperm storage in Turkey (*Meleagris Gallopavo*): The infundibulum as a secondary sperm storage site, or is it? In: *Proc. 18th Int. Congr. Zool.*, Athens, Greece (2002)
- BAKST M.R., J.S. DYMOND (2013): Artificial Insemination in Poultry. In: Lemma, A. (Szerk.): *Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed*. InTech, Jan. 09, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/54918>
- 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.
- BALLANTYNE M., WOODCOCK M., DODDAMANI D., HU T., TAYLOR L., HAWKEN R.J. & MCGREW M.J. (2021): Direct allele introgression into pure chicken breeds using Sire Dam Surrogate (SDS) mating. In: *Nat Commun* 12, 659 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20812-x>
- BARNA J. (1998): A baromfi-spermiumok motilitására és tárolására ható néhány fizikai és kémiai tényező vizsgálata. PhD disszertáció, Pannon Agrártudományi Egyetem
- BARNA J., LIPTÓI K., PATAKINÉ VÁRKONYI E. (2016): Mentsük a menthetőt - új lehetőségek baromfifélék in vitro génmegőrzésének terén./ Save what can be saved – new possibilities in in vitro gene preservation of poultry species. Irodalmi áttekintés/Literature review. In: *Magyar Állatorvosok Lapja* 138. 621-630.
- BARNA J., VÉGI B., LIPTÓI K., PATAKINÉ VÁRKONYI E. (2020): Reproductive technologies in avian species. 193-221.p. In: Presicce G.A. (Szerk.): *Reproductive Technologies in Animals*. Academic Press, 306 p.
- BEDNARCZYK M., LAKOTA P., SLOMSKI R., PLAWSKI A., LIPINSKI D., SIEMIENIAKO B., LISOWSKI M., CZEKALSKI P., GRAJEWSKI B. AND DLUZNIIEWSKA P. (2002): Reconstitution of a Chicken Breed by Inter Se Mating of Germline Chimeric Birds. In: *Poultry Science* 81:1347–1353

- BIRKHEAD T.R., MØLLER A.P. (1992): Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. In: *Biol J Linnean Soc.* 1992;45:367–72.
- BIRKHEAD T.R., MØLLER A.P. (1993): Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. In: *Biol J Linnean Soc.* 1993;50:295–311.
- BLACKET M.J., ROBIN C., GOOD R.T., LEE S.F., MILLER A.D. (2012): Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. In: *Mol Ecol Resour* 2012 May; 12(3):456–63. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x>
- BLANK M.H., GOISSIS M.D., MOTTA DE AVELAR AZEREDO R., SILVEIRA L.F., GARCIA PEREIRA R.J. (2024): Safeguarding genetic resources of curassow through cryopreservation and transplantation of post-mortem recovered testicular cells into recipient roosters. In: *Theriogenology Wild*, 2024, 100084, ISSN 2773-093X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2024.100084>.
- BODZSAR N., EDING H., REVAY T., HIDAS A., WEIGEND S. (2009): Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. In: *Animal Genetics*, 40: 516–523. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01876.x>
- BRESLER M., BENHAM J., LUKE G., SIMKISS K. (1994): Manipulations of germ cell populations in the gonad of fowl. In: *British Poultry Science* 35, 241–247.
- BRINSTER R.L. AND ZIMMERMANN J.W. (1994): Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11298–11302.
- BUDA K., VÉGI B., PÁLINKÁS-BODZSÁR N., EDVINÉ MELEG E., LEHOCZKY I., DROBNYÁK Á., BARNA J., LIPTÓI K. (2024): Transplantation of frozen – thawed gonadal tissue in domestic goose. Nitra, 01.02.2024., Slovak Republic. In: *Proceeding of the Winter Chool „Animal Biotechnology 2024”* p. 44.
- BUGNO-PONIEWIERSKA M., PAWLINA K., ORSZULAK-WOLNY N., WOŹNIAK B., WNUK M., JAKUBCZAK A., JEŹEWSKA-WITKOWSKA G. (2015): Cytogenetic Characterization of the Genome of Interspecies Hybrids (*Alopex-Vulpes*). In: *Annals of Animal Science*. Vol. 15, No. 1 (2015) 81–91. DOI: 10.2478/aoas-2014-0077
- BURROWS W.H., QUINN J.P. (1935): A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. In: *Poultry Sci.* 14:251
- CARSIENCE R.S., CLARK M.E., VERRINDER-GIBBINS A.M. AND ETCHES R.J. (1993): Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. In: *Development* 117, 669–675.
- CHANG I.K., TAJIMA A., CHIKAMUNE T., OHNO T. (1995): Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. In: *Cell Biol Int.* 1995 Feb;19(2):143–9. DOI: 10.1006/cbir.1995.1055.
- CHEN Y.-C., SAITO D., SUZUKI T., TAKEMOTO T. (2023): An inducible germ cell ablation chicken model for high-grade germline chimeras. In: *Development* 15 September 2023; 150 (18): dev202079. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.202079>
- 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.

- 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
- COCKRUM E. L. (1952): A check-list and bibliography of hybrid birds in North America north of Mexico. *Wilson Bull.* 64(3), 140–59.
- COLE L.J. AND HOLLANDER W.F. (1950): Hybrids of pigeons by ringed dove. In: *Amer. Naturalist* 84:275-308.
- CSEH S. (1989): Embriómélyhűtés. - FOLIA BIOTECHNOLOGICA, 29.szám, Üllő. OMIKK
- DAWSON A., KING V.M., BENTLEY G.E., BALL G.F. (2001): Photoperiodic control of seasonality in birds. In: *J Biol Rhythms.* 2001 Aug;16(4):365-80. DOI: 10.1177/074873001129002079.
- DAWSON A., SHARP P.J. (2007): Photorefractoriness in birds--photoperiodic and non-photoperiodic control. In: *Gen Comp Endocrinol.* 2007 Aug-Sep;153(1-3):378-84. DOI: 10.1016/j.ygcen.2007.01.043.
- DIMITRIADIS F., TSIAMPALI C., CHALIASOS N., TSOUNAPI P., TAKENAKA A., SOFIKITIS N. (2015): The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. In: *Hormones* (Athens). 2015 Oct-Dec;14(4):479-503. DOI: 10.14310/horm.2002.1633.
- ETCHES R., CARSIENCE R.S., CLARK M.S., FRASER R.A., TONER A. AND VERRINDER GIBBINS A.M. (1993): Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken genome. In: *Poultry Science* 72, 882-889.
- EVANS M.J., KAUFMAN M.H. (1981): Establishment in culture of pluripotent cell from mouse embryos. In: *Nature* 292, 154-155.
- EYAL-GILALDI H., KOCHAV S. (1976): From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. 1. General morphology. In: *Dev. Biol.* 49: 321-337.
- FORD E.H.R. & WOOLLAM D.H.M. (1964): Testicular chromosomes of *Gallus domesticus*. In: *Chromosoma* 15(5), 568–578. DOI:10.1007/bf00319991
- FRASER R.A., CARSIENCE R.S., CLARK M.E., ETCHES R.J. AND VERRINDER GIBBINS A.M. (1993): Efficient incorporation of transfected blastodermal cells into chimeric chicken embryos. In: *Int. J. Dev. Biol.* 37, 381-385.
- FUJIHARA M. & INOUE-MURAYAMA M. (2024): The wildlife biobanking of germ cells for in situ and ex situ conservation in Japan, In: *Theriogenology Wild*, 2024, 100086, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2024.100086>.
- GEE G.F. (1995): Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. In: Bakst M.R. and Wishart G.J. (Szerk.): *Proceedings of the First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Poultry Science Association, Savoy, IL. p. 262-279.
- GHIGI A. (1936): Galline de faraone e tacchini. Ulrico Hoepli, Milano.
- GOSSLER A., DOETSCHMAN T., KORN R., SERFLING E., KEMLER R. (1986): Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 9065-9069.
- GRANT P. R. & GRANT B. R. (1992): Hybridization of bird species. In: *Science*. 256(5054), 193–7

- GRAY A. P. (1958): Bird hybrids: a check-list with bibliography. Technical communication of the Commonwealth Bureau of Animal Breeding and Genetics; no. 13. 1958 Bucks: CAB (1958)
- GUZSAL E. (1974): Mikrotechnika. p. 164-170. In: Guzsál E.: *Az állatok sejtjei és szövetei*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 186 p.
- HAHN T.P., WATTS H.E., CORNELIUS J.M., BRAZEAL K.R., MACDOUGALL-SHACKLETON S.A. (2009): Evolution of environmental cue response mechanisms: adaptive variation in photorefractoriness. In: *Gen Comp Endocrinol*. 2009 Sep 1;163(1-2):193-200. DOI: 10.1016/j.ygcen.2009.04.012.
- HALDANE J.B.S. (1922): Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. In: *Journ. of Gen.* **12**, 101–109 (1922). DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02983075>
- HAMBURGER V., HAMILTON H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. In: *J. Morphol.* **88**: p. 49-92
- HANEBRINK E.L. (1973): Characteristics and behavior of a peafowl-guinea hybrid. In: *Game Bird Breeders, Aviculturists, Zoologists and Conservationists Gazette* 22:8-11
- HANEBRINK E.L. (1976): Characteristics and behavior of guineafowl and domesticated chicken hybrids. In: *Journal of The Arkansas Academy of Science*, Vol 30 (1976), Art. 17
- HARRIS C.R., MILLMAN K.J., VAN DER WALT S.J. *et al.* (2020): Array programming with NumPy. In: *Nature* 585, 357–362. DOI: 10.1038/s41586-020-2649-2.
- HOLT W.V. (2011): Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. In: *Reprod Domest Anim*. 2011;46(Suppl 2):68–74.
- HUNTER J.D. (2007): Matplotlib: A 2D Graphics Environment. In: *Computing in Science & Engineering*, vol. 9, no. 3, pp. 90-95, 2007. DOI: 10.1109/MCSE.2007.55.
- ICHIKAWA K., HORIUCHI H. (2023): Fate Decisions of Chicken Primordial Germ Cells (PGCs): Development, Integrity, Sex Determination, and Self-Renewal Mechanisms. In: *Genes*. 2023; 14(3):612. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14030612>
- IMREH SZ. I. (1986): A kromoszóma. Kriterion Könyvkiadó, Bukarest, 303 p.
- IVANOV E. (1913) Experience sur la fecondation artificielle des oiseaux. CR Biol. Paris 75 (1913), p. 371.
- 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.
- JACOBSON A. G. (1989): Chick Embryo: Early Development. In: Akkas, N. (szerk.) *Biomechanics of Active Movement and Deformation of Cells*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990. 320-401 p
- JONES W.E., JOHNSEN D.W. (1985): A fertile female mule. In: *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 5, Issue 2, 1985. 87-90. p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(85\)80054-X](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(85)80054-X).
- KAGAMI H., CLARK M. E., VERRINDER GIBBINS A. M., ETCHES R. J. (1995): Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. In: *Molecular Reproduction and Development* 42: 379-387.
- KANG S. J., CHOI J. W., KIM S. Y., PARK K. J., KIM T. M., LEE Y. M., KIM H., LIM J. M., HAN J. Y. (2008): Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. In: *Biology of Reproduction* 79: 931-937

- KAYANG B.B., INOUE-MURAYAMA M., HOSHI T., MATSUO K., TAKASHI H., MINEZAWA M. *et al.* (2002): Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. In: *Genet Sel Evol* 2002;34:233-53.
- 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>.
- KOCHAV S., GINSBURG M., EYAL-GILADI H. (1980): From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II. Microscopic anatomy and cell population dynamics. In: *Dev Biol*. 1980 Oct;79(2):296-308. DOI: 10.1016/0012-1606(80)90117-7.
- KOHARA Y., KANAI Y. AND TAJIMA A. (2008): Cryopreservation of Gonadal Germ Cells (GGCs) from the Domestic Chicken Using Vitrification. In: *J. Poult. Sci.* 45, 57–61.
- LÁZÁR B., ANAND M., TÓTH R., PATAKINÉ VÁRKONYI E., LIPTÓI K., GÓCZA E. (2018): Comparison of the microRNA expression Profiles of male and female avian primordial germ cell lines. In: *Stem Cells Int* 2018; Article ID 1780679, DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1780679>
- 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 colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. In: *Poult Sci.* 2021 Aug;100(8):101207. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101207.
- 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: *Poultry Science* 81: 1360-1364.
- LIPTÓI K., HIDAS A. (2003): Korai embrionális rendellenességek genetikai hátterének vizsgálati lehetőségei madarakban. In: *Állattenyésztés és takarmányozás* 52.1. 17-23.
- LIPTÓI K., HIDAS A., ROUVIER R. (2005): Investigation of chromosome abnormalities and early embryonic mortality in goose lines. In: *Acta Biol Hung.* 2005;56(1-2):53-65. DOI: 10.1556/ABiol.56.2005.1-2.6.
- LIPTOI K., HORVATH G., GAL J., VARADI E. & BARNÁ J. (2013). Preliminary results of the application of gonadal tissue transfer in various chicken breeds in the poultry gene conservation. In: *Animal Reproduction Science*, 141(1-2), 86–89. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.06.016
- LIPTOI K., BUDA K., ROHN E., DROBNYAK A., MELEG E.E., PALINKAS-BODZSAR N., VEGI B., BARNÁ J. (2020): Improvement of the application of gonadal tissue allotransplantation in the in vitro conservation of chicken genetic lines. In: *Anim Reprod Sci.* 2020 Feb;213:106280. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106280.
- LIU C., CHANG I-K., KHAZANEHDARI K.A., THOMAS S., VARGHESE P., BASKAR V., ALKHATIB R., LI W., KINNE J., MCGREW M.J., WERNERY U. (2017): Uniparental chicken offsprings derived from oogenesis of chicken primordial germ cells (ZZ). In: *Biol Reprod.* 2017 Mar 1;96(3):686-693. DOI: 10.1095/biolreprod.116.144253.
- LORENZ F. W. AND OGASAWARA F.X. (1968): Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. VI. The relations of fertility and embryo normality with site of experimental insemination. In: *J Reprod Fertil.* 1968 Aug;16(3):445-55. DOI: 10.1530/jrf.0.0160445. PMID: 5673742.

- LUN S., SMITH P., LUNDY T., O'CONNELL A., HUDSON N., MCNATTY K.P. (1998): Steroid contents of and steroidogenesis in vitro by the developing gonad and mesonephros around sexual differentiation in fetal sheep. In: *Reprod Fertil.* 1998 Sep;114(1):131-9. DOI: 10.1530/jrf.0.1140131.
- MACDONALD J., GLOVER J.D., TAYLOR L., SANG H.M., MCGREW M.J. (2010): Characterization and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. In: *PLoS One* 2010;(5)11: 5:e15518. DOI: 10.1371/journal.pone.0015518.
- MANK J. E., ELLEGREN H. (2009): All dosage compensation is local: gene-by-gene regulation of sex-biased expression on the chicken Z chromosome. In: *Heredity* 102(3):312-20. DOI: 10.1038/hdy.2008.116.
- MARINOVIĆ Z., LUJIĆ J., SUŠNIK BAJEC S., DJURDJEVIĆ I., SNOJ A., HOITSY GY., URBÁNYI B., HORVÁTH Á. (2022): Evaluation of triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* as a surrogate parent for brown trout *Salmo trutta m. fario* and grayling *Thymallus thymallus*. In: *Aquaculture Reports*, Volume 24, 2022. 101163. ISSN 2352-5134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101163>.
- MARTIN G. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78, 7634-7638.
- MARZULLO G. (1970): Production of chick chimaeras. In: *Nature* 225, 72–73. p. DOI: <https://doi.org/10.1038/225072a0>
- MATHIS G.F., MCDUGALD L.R. (1987): Evaluation of interspecific hybrids of the chicken, guinea fowl, and Japanese quail for innate resistance to coccidia. In: *Avian Dis.* 1987 Oct-Dec;31(4):740-5.
- MAYR E. AND SHORT L. L. (1970): Species taxa of North American birds; a contribution to comparative systematics. Publications of the Nuttall Ornithological Club No. 9.; Cambridge. 1970. p. 127
- MCCARTHY E. M. (2006): Handbook of avian hybrids of the world. Oxford: Oxford University Press. 2006. p. 583
- 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 Reports* 2004;(5) No. 7, 728–33.
- MEISE W. (1975): Natürliche Bastardpopulationen und Speziationprobleme bei Vögeln, Abhandlungen aus dem Gebiete der Naturwissenschaften, Herausgegeben von dem naturwissenschaftlichen Verein in Hamburg. 18–9, 187–254 (1975).
- MFOUNDOU J.D.L., GUO Y., YAN Z., WANG X. (2022): Morpho-Histology and Morphometry of Chicken Testes and Seminiferous Tubules among Yellow-Feathered Broilers of Different Ages. In: *Veterinary Sciences.* 2022; 9(9):485. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9090485>
- MGE (2009a): A sárga magyar tyúk tenyésztési programja. Magyar Kisállatnemesítők Génmegőrző Egyesülete
- MGE (2009b): A magyar parlagi gyöngytyúk tenyésztési programja. Magyar Kisállatnemesítők Génmegőrző Egyesülete
- MIKKOLA M., SIRONEN A., KOPP C., TAPONEN J., SUKURA A., VILKKI J., KATILA T., ANDERSSON M. (2006): Transplantation of normal boar testicular cells resulted in

- complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. In: *Reprod Domest Anim.* 2006 Apr;41(2):124-8. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00651.x.
- MILLER S.A., DYKES D.D., POLESKY H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In: *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- MITSUMOTO K. AND NISHIDA S. (1958): Trials of production of the hybrid between quails and chickens. In: *J. lap. Zootech. Sci* 29:10.
- 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.
- MIYAHARA D., OISHI I., MAKINO R., KURUMISAWA N., NAKAYA R., ONO T., KAGAMI H., TAGAMI T. (2016): Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor 2. In: *J Reprod Dev.* 2016 Apr 22;62(2):143-9. DOI: 10.1262/jrd.2015-128.
- MIZUSHIMA S. (2017): Fertilization 2:Polyspermic Fertilization. In: Sasanami T (szerk.): *Avian Reproduction: From Behavior to Molecules.* Springer Singapore (Advances in Experimental Medicine and Biology. 2017;1001:105-123. DOI: 10.1007/978-981-10-3975-1_7.) p. 105-124.
- MONORI I., OLÁH J. (szerk.) (2019): *Az Agrár Kutatóintézetek és Tangazdaság őshonos haszonállatai.* Debreceni Egyetem, Debrecen
- MOORE I.T., BENTLEY G.E., WOTUS C., WINGFIELD J.C. (2006): Photoperiod-independent changes in immunoreactive brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in a free-living, tropical bird. In: *Brain Behav Evol.* 2006;68(1):37-44. DOI: 10.1159/000093059.
- MOORE D.T., PURDY P.H. AND BLACKBURN H.D. (2006): A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. In: *Poult. Sci.* 85, 1784–1790.
- MOTT C.L., LOCKHART L.H., RIGDON R.H. (1968): Chromosomes of the sterile hybrid duck. In: *Cytogenetics* 1 July 1968; 7 (5): 403–412. DOI: <https://doi.org/10.1159/000130001>
- MOZDZIAK P.E. AND PETITTE J.N. (2004), Status of transgenic chicken models for developmental biology. In: *Dev. Dyn.*, 229: 414-421. DOI: <https://doi.org/10.1002/dvdy.10461>
- NAGANO M., AVARBOCK M.R. AND BRINSTER R.L. (1999): Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. In: *Biol. Reprod.* 60, 1429–1436.
- 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* 110(3): 815-821.
- NAITO M., WATANABE M., KINUTANI M., NIRASAWA K. AND OISHI T. (1991): Production of quail-chick chimaeras by blastoderm cell transfer. In: *British Poultry Science* 32, 79-86.
- NAITO M., TAJIMA A., YASUDA Y. AND KUWANA T. (1994): Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. In: *Mol. Repr. Dev.* 39, 153-161.

- NAITO M., MATSUBARA Y., HARUMI T., TAGAMI T., KAGAMI H., SAKURAI M., KUWANA T. (1999): Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. In: *J Reprod Fertil.* 1999 Nov;117(2):291-8. DOI: 10.1530/jrf.0.1170291.
- NAKAGAWA T., NABESHIMA Y.-I. AND YOSHIDA S. (2007): Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. In: *Dev. Cell* 12, 195–206.
- NAKAMURA Y., YAMAMOTO Y., USUI F., ATSUMI Y., ITO Y., ONO T., TAKEDA K., NIRASAWA K., KAGAMI H. AND TAGAMI T. (2008): Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chickens. In: *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 900–907.
- 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.
- NAKAMURA Y., USUI F., ONO T., TAKEDA K., NIRASAWA K., KAGAMI H. AND TAGAMI T. (2010b). Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. In: *Biol. Reprod.* 83, 130–137.
- 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: *Journal of Reproduction and Development* 59: 580-587.
- NANDI S., WHYTE J., TAYLOR L., SHERMAN A., NAIR V., KAISER P., MCGREW M. J. (2016): Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. In: *Poultry Science* 95: 1905-1911.
- NAWROTH F., ISACHENKO V., DESSOLE S., RAHIMI G., FARINA M., VARGIU N., MALLMAN P., DATTENA M., CAPOBIANCO G., PERTS D., ORTH I., ISACHENKO E. (2002): Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. In: *Cryo-Letters* 23: 93-102.
- NÉMETH K., GÓCZA E. (2014): Őssejtek-e az embrionális őssejtek? In: *Természet világa* 145. évf. 9. sz. Tudományos Ismeretterjesztő Társulat, Budapest (2014. szeptember) p. 386-390.
- NICHOLS J., EVANS E.P. AND SMITH A.G. (1990): Establishment of germ-line competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. In: *Development* 110, 1341-1348.
- NICHOLS J., SMITH A. (2009): Naive and primed pluripotent states. In: *Cell Stem Cell.* 2009 Jun 5;4(6):487-92. DOI: 10.1016/j.stem.2009.05.015. PMID: 19497275.
- OGAWA T., DOBRINSKI I., AVARBOCK M. R., BRINSTER R. L. (2000): Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. In: *Nature Medicine* 6: 29-34.
- OGORODII U. (1935) Hybridization of unrelated birds in AskaniaNova. Bull. All Union Acad. Agri. Science (Lenin)1:25.
- 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.

- OTTENBURGH J., YDENBERG R. C., VAN HOOFT P., VAN WIEREN S. & PRINS H. H. T. (2015): The Avian Hybrids Project: gathering the scientific literature on avian hybridization. In: *Ibis*. 157(4), 892–4
- PADHI, M. K. (2016): Importance of Indigenous Breeds of Chicken for Rural Economy and Their Improvements for Higher Production Performance. In: *Scientifica*, 2016, 1–9. DOI:10.1155/2016/2604685
- PAIN B., CLARK M.E., SHEN M., NAKAZAWA H., SAKURAI M., SAMARUT J. AND ETCHES R.J. (1996): Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. In: *Development* 122, 2339-2348.
- PALASZ A. T. AND MAPLETOFT R. J. (1996): Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. In: *Biotechnology Advances* 14: 127-149.
- PAN W., RAHMAN A.A., STAVELY R., BHAVE S., GUYER R., OMER M., PICARD N., GOLDSTEIN A.M., HOTTA R. (2022): Schwann Cells in the Aganglionic Colon of Hirschsprung Disease Can Generate Neurons for Regenerative Therapy. In: *Stem Cells Transl Med*. 2022 Dec 30;11(12):1232-1244. DOI: 10.1093/stcltm/szac076.
- PANDA S.K., MCGREW M.J. (2022): Genome editing of avian species: implications for animal use and welfare. In: *Laboratory Animals*. 2022;56(1):50-59. DOI:10.1177/0023677221998400
- PANOV E. (1989): Natural hybridization and ethological isolation in birds. Moscow: Nauka (1989)
- PARK K.J., JUNG K.M., KIM Y.M., LEE K.H., HAN J.Y. (2020): Production of germline chimeric quails by transplantation of cryopreserved testicular cells into developing embryos. In: *Theriogenology*. 2020 Oct 15;156:189-195. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.06.027.
- 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(11): 673-680.
- PATAKINÉ VÁRKONYI E., GÓCZA E., LÁZÁR B. (2017): Génmegőrzés embrionális sejtek segítségével. 64-80.p. In: Szalay I. (Szerk.): *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében*. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 214 p.
- PÉCZELY P., RÉZ G., ZBORAY G. (2007): Összehasonlító anatómiai praktikum II. (G Zboray, Ed.). Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- PÉCZELY P. (2013): Madár szaporodásbiológia. Agroinform kiadó, Budapest
- PERRY M.M. (1987): Nuclear events from fertilization to the early cleavage stages in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). In: *J. Anat.* 150, 99-109.
- PETITTE J. N., CLARK 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.
- PETITTE J. N. (2006): Avian Germplasm Preservation: Embryonic Stem Cells or Primordial Germ Cells? In: *Poultry Science* 85:237–242

- PONGRACZ J.D., PAETKAU D., BRANIGAN M. AND RICHARDSON E. (2017): Recent Hybridization between a Polar Bear and Grizzly Bears in the Canadian Arctic. In: *ARCTIC*. Vol. 70 No. 2 (2017): June: 121–238.
- QUINN J.P., BURROWS W.H. AND BYERLY T.O. (1937): Turkey-chicken hybrids. In: *J.Heredity* 28:169-173.
- RACEY P.A. (1979): The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. In: *J Reprod Fertil.* 1979;56(1):391–402.
- REEDY S.E., LEIBO S.P. AND ETCHES R.J. (1994): Cryopreservation of chick blastodermal cells to produce chimeric chickens. 31st Annual Meeting of Soc. for Cryobiology, 21-26th of August, Kyoto, Japan.
- REYNAUD G. (1969): The transfer of turkey primordial germ cells to chick embryos by intravascular injection. In: *J. Embryol. Exp. Morphol.* 21, 485–507.
- ROBINSON J.E., FOLLETT B.K. (1982): Photoperiodism in Japanese quail: the termination of seasonal breeding by photorefractoriness. In: *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1982 Apr 22;215(1198):95-116. DOI: 10.1098/rspb.1982.0030.
- ROMANOFF A. L. (1960): The Avian Embryo. Structural and functional development. MacMillan, New York, 1960
- SAWICKA D., CHOJNACKA-PUCHTA L., ZIELINSKI M., PLUCIENNICZAK G., PLUCIENNICZAK A. AND BEDNARCZYK M. (2015): Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. In: *Cell. Mol. Biol. Lett.* 20, 143–159.
- SEABOLD S. & PERKTOLD J. (2010): Statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. In: *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*. Austin, 28 June-3 July, 2010, 57-61. DOI: <https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-011>
- SETIOKO A.R., TAGAMI T., TASE H., NAKAMURA Y., TAKEDA K. AND NIRASAWA K. (2007): Cryopreservation of Primordial Germ Cells (PGCs) from White Leghorn Embryos Using Commercial Cryoprotectants. In: *J. Poult. Sci.* 44, 73–77.
- SHIBUSAWA M., NISHIBORI M., NISHIDA-UMEHARA C., TSUDZUKI M., MASABANDA J., GRIFFIN DK., MATSUDA Y. (2004): Karyotypic evolution in the *Galliformes*: An examination of the process of karyotypic evolution by comparison of the molecular cytogenetic findings with the molecular phylogeny. In: *Cytogenet Genome Research*. 106(1):111-9.
- SIMKISS K., ROWLETT K., BUMSTEAD N. AND FREEMAN B.M. (1989): Transfer of primordial germ cell DNA between embryos. In: *Protoplasma* 151, 164-166.
- SIMKISS, K. (1990): Primordial germ cells and the scope for genetic manipulation using embryos. In: Tullett, S.G. (Ed.) *Avian incubation*, Poultry Science Symposium 22, 125-136. (London, Butterworth-Heinemann).
- SMALL T.W., SHARP P.J., BENTLEY G.E., MILLAR R.P., TSUTSUI K., MURA E., DEVICHE P. (2008): Photoperiod-independent hypothalamic regulation of luteinizing hormone secretion in a free-living Sonoran desert bird, the Rufous-winged Sparrow (*Aimophila carpalis*). In: *Brain Behav Evol.* 2008;71(2):127-42. DOI: 10.1159/000111459.
- SPALLANZANI L. (1776) Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animali. In *Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile*, Opusculo II. Modena, Italy.
- 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>
- STAINES H.J., MIDDLETON R.C., LAUGHLIN K.F., WISHART G.J. (1998): Quantification of a sperm – egg interaction for estimating the mating efficiency of broiler breeder flocks. In: *Br. Poult. Sci.* 39: 273-277.
- STEEL, M.G. MELDRUM W., BRILLARD J.P. AND WISHART G.J. (1994): The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer in vitro and in vivo. In: *J. of Reprod. and Fertil.* 101: 599-603.
- SUCHETET A. (1897): Des hybrides a l'état sauvage. Regne animal. Tome premier. Classe des oiseaux. Paris: Bailliere et fils; 1897.
- SZALAY I. (2015a): Régi magyar baromfifajták a XXI. században. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- SZALAY I. (2015b): A gyöngytyúk tenyésztése és fajtavédelme Magyarországon. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- SZALAY I., BARNA J., KÖRÖSINÉ M. A. (2004): A gyöngytyúk - Mezőgazda Kiadó
- SZALAY I., KOPPÁNY G. (2017): Az *in vivo* génmegőrzés tudományos alapjai. 13-28.p. In: Szalay I. (Szerk.): *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében*. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 214 p.
- SZALAY I., KOVÁCSNÉ GAÁL K. (2008): A baromfi géntartalékok és az alternatív baromfitenyésztés helyzete és jövője. In: *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 57 (5) 425-438 p.
- 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. In: *Reproduction, fertility and development*. DOI: 10.1071/RD16289.
- TAYLOR L., CARLSON D.F., NANDI S., SHERMAN A., FAHRENKRUG S.C., MCGREW M.J. (2017): Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. In: *Development*. 2017 Mar 1;144(5):928-934. DOI: 10.1242/dev.145367.
- 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: *Poultry Science* 73, 1897-1905.
- TONUS C., CLOQUETTE K., ECTORS F., PIRET J., GILLET L., ANTOINE N., DESMECHT D., VANDERPLASSCHEN A., WAROUX O. AND GROBET L. (2016): Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. In: *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 628–639.
- TONUS C., CONNAN D., WAROUX O., VANDENHOVE B., WAYET J., GILLET L., DESMECHT D., ANTOINE N., ECTORS F.J. AND GROBET L. (2017): Cryopreservation of chicken primordial germ cells by vitrification and slow freezing: A comparative study. In: *Theriogenology* 88, 197–206.
- TRAVIS L. (1990). The mule. J. A. Allen & Co, London, 150 p.
- TREFIL P., AUMANN D., KOSLOVÁ A., MUCKSOVÁ J., BENEŠOVÁ B., KALINA J., WURMSER C., FRIES R., ELLEDER D., SCHUSSER B., HEJNAR J. (2017): Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken. In: *Sci Rep.* 2017 Oct 27;7(1):14246. DOI: 10.1038/s41598-017-14475-w.

- TUBARO P.L. & LIJTMAR D.A. (2002): Hybridization patterns and the evolution of reproductive isolation in ducks. In: *Biol J Linn Soc* 77: 193-200. DOI: 10.1046/j.1095-8312.2002.00096.x.
- VALER CARSTEA B., CATUNDA LEMOS A. P., ILIE E. D., VARGA L., BODÓ SZ., KOVÁCS A., BŐSZE ZS., GÓCZA E. (2007): Production of identical mouse twins and a triplet with predicted gender. In: *Cloning Stem Cells* 9(2): 247-56.
- VAN DE LAVOIR M.-C., DIAMOND J. H., LEIGHTON P. A., MATHER-LOVE C., HEYER B. S., BRADSHAW R., KERCHNER A., HOOI L. T., GESSARO T. M., SWANBERG S. E., DELANY M. E., ETCHES R. J. (2006): Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. In: *Nature* 441: 766-769.
- VAN DE LAVOIR M.-C., COLLARINI E.J., LEIGHTON P.A., FESLER J., LU D.R., HARRIMAN W.D., THIYAGASUNDARAM T.S., AND ETCHES R.J. (2012): Interspecific Germline Transmission of Cultured Primordial Germ Cells. In: *PLOS ONE* 7(5): e35664. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035664>
- VÉGI B., VÁRADI É., BARNA J. (2017): Génmegőrzés a hím szaporítóanyag hosszú távú tárolásával. 46-59.p. In: Szalay I. (Szerk.): *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében*. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 214 p.
- VICK L., LI Y. AND SIMKISS K. (1993): Transgenic birds from transformed primordial germ cells. In: *Proc. R. Soc. Lond. B* 251, 179-182.
- VILLALPANDO I., SÁNCHEZ-BRINGAS G, SÁNCHEZ-VARGAS I, PEDERNEIRA E, VILLAFÁN-MONROY H. (2000): The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. In: *Gen Comp Endocrinol.* 2000 Mar;117(3):325-34. DOI: 10.1006/gcen.2000.7425.
- WADA M. (1993): Low temperature and short days together induce thyroid activation and suppression of LH release in Japanese quail. In: *Gen Comp Endocrinol.* 1993 Jun;90(3):355-63. DOI: 10.1006/gcen.1993.1091
- WARREN D.C. AND SCOTT H.M. (1935): An attempt to produce turkey-chicken hybrids. In: *J.Heredity* 26:105-107.
- WENTWORTH B.C., TSAI H., HALLETT J.H., GONZALES D.S., RAJCIC-SPASOJEVIC C. (1989): Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. In: *Poultry Science* 68, 999-1010.
- WERNERY U., LIU C., BASKAR V., GUERINECHE Z., KHAZANEHDARI K.A., SALEEM S., KINNE J., WERNERY R., GRIFFIN D.K., CHANG I. K. (2010): Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line Houbara Bustard offspring: potential for repopulating an endangered species. In: *PLoS One* 5(12): e15824.
- WHYTE J., GLOVER J.D., WOODCOCK M., BRZESZCZYNSKA J., TAYLOR L., SHERMAN A. et al. (2015): FGF, insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. In: *Stem Cell Reports* 2015;5(6):1171-82.
- WHYTE J., BLESBOIS E., MCGREW M. (2016): Increased sustainability in poultry production: New tools and resources for genetic management. In: Burton E., Gatliffe J., Masey O'Neill H., Scholey D. (Szerk.): *Sustainable Poultry Production in Europe*. p. 220.
- WILCOX F.H. AND CLARK O.E. (1961): Chicken-quail hybrids. In: *J Heredity* 52:167-170.
- WISHART G.J. (1997): Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. In: *Animal Reproduction Science*, Volume 48, Issue 1, 1997, 81-92. p, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00042-0).

- WISHART G.J. & HORROCKS A.J. (2000): Fertilization in Birds. In: Juan J., Tarín J.J. & Cano A. (Szerk.): *Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals*, Springer Verlag, Berlin. pp 193–222.
- WOLF U. (1999): Reorganization of the sex-determining pathway with the evolution of placentation. In: *Hum. Genet.*, 105, 288-292.
- WOLFNÉ TÁSKAI E. (2000): A madarak szaporodási folyamatai. In: Husvéth F. (Szerk.): *A háziállatok élettana és anatómiája*. 592-607. p.
- WOODCOCK M.E., GHEYAS A.A., MASON A.S., NANDI S., TAYLOR L., SHERMAN A., SMITH J., BURT D.W., HAWKEN R., MCGREW M.J. (2019): Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct 15;116(42):20930-20937. DOI: 10.1073/pnas.1906316116.
- WU J., IZPISUA BELMONTE J. C. (2016): Interspecies chimeric complementation for the generation of functional human tissues and organs in large animal hosts. In: *Transgenic Research* 25: 375-384.
- XU D., YOSHINO T., KONISHI J., YOSHIKAWA H., INO Y., YAZAWA R., DOS SANTOS NASSIF LACERDA S.M., DE FRANÇA L.R., TAKEUCHI Y. (2019): Germ cell-less hybrid fish: ideal recipient for spermatogonial transplantation for the rapid production of donor-derived sperm. In: *Biol Reprod.* 2019 Aug 1;101(2):492-500. DOI: 10.1093/biolre/ioz045.
- YASUDA Y., TAJIMA A., FUJIMOTO T. AND KUWANA T. (1992): A method to obtain avian germline chimaeras using isolated primordial germ cells. In: *J. Reprod. Fert.* 96, 521-528.
- ZHAO C.J., QIN Y.H., LEE X.H. WU CH. (2007): Molecular and cytogenetic paternity testing of a male offspring of a hinny. In: *Journal of animal breeding and genetics* 123. 403-5. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2006.00615.x.
- The IUCN Red List of Threatened Species: Numbers of threatened species by major groups of organisms (1996–2023), Version 2023-1., Table 1b. ISSN 2307-8235. https://nc.iucnredlist.org/redlist/content/attachment_files/2023-1_RL_Table_1b_v2.pdf
Lekérdezés időpontja: 2024.03.22.
- LEICA BIOSYSTEMS (Geoffrey Rolls): An Introduction to Specimen Processing. <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-specimen-processing/> Elérés időpontja: 2024.07.29.
- PANDAS DEVELOPMENT TEAM. (2020). Pandas (Version latest) [Software]. Zenodo. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3509134>

M2 – Táblázatok és ábrák jegyzéke

Táblázatok jegyzéke:

1. táblázat: A molekuláris genetikai vizsgálat során használt primerek szekvenciái
2. táblázat: Az injektált sejtek ivarszervbe épülésének vizsgálata 7,5 napos, 14,5 napos és 18,5 napos embrióban

Ábrák jegyzéke:

1. ábra: A genetikai anyag megőrzésének lehetséges módjai
2. ábra: A házityúk primordiális ősvarsejtek vándorlása a fejlődő embrióban
3. ábra: Kiméra előállítása blasztodermális sejtek felhasználásával
4. ábra: Kiméra előállítása ősvarsejtek felhasználásával
5. ábra: Természetes úton létrejött házityúk-gyöngytyúk fajhibrid az NBGK- HGI állományában
- 6-7. ábra: Sárga magyar tyúk tojó és kakas az NBGK-HGI állományából
8. ábra: Szürke/ezüst színváltozatú gyöngytyúk, a háttérben vadszínű egyedekkel az NBGK- HGI állományából
- 9-10. ábra: Gyöngytyúk tojók és sárga magyar kakasok egyedi ketrecekben
- 11-12. ábra: Ondóvétel sárga magyar kakastól és gyöngytyúk tojó mesterséges termékenyítése
13. ábra: MIDI F500S típusú keltetőgép
14. ábra: Kromoszómapreparátumok készítése elhalt embriókból
15. ábra: Növendék hibridek és gyöngytyúkok mélyalmos tartásban
- 16-17. ábra: A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálata
- 18-19. ábra: Ivarszervminták paraffinbe ágyazása és kazettával zárása
20. ábra: Paraffinba ágyazott minták hűtőlapon
21. ábra: Száradó szövettani metszetek
- 22-23. ábra: Ablak nyitása a tojás héján és az injektáláshoz használt 37°C-on tartott sejtszuspenzió
- 24-25. ábra: Injektálás üvegkapillárisal hibrid embrió véráramába és az ablak lezárása kétrétegű parafilmmel
26. ábra: Zselatin blokkba ágyazott szövetminta
- 27-28. ábra: Szövettani metszetek sejtmagfestése
29. ábra: Embrionális fejlődési rendellenességek és a keltethetőség vizsgálata gyöngytyúk és házityúk mindkét irányú keresztezésekor a kontrollokkal összehasonlítva
30. ábra: A hibrid tojások kelési ideje a szülőfajok kelési idejével összevetve
31. ábra: A hibridek ivarának alakulása gyöngytyúk tojó és házityúk kakas keresztezésekor
32. ábra: Hibrid tojó (2n ZW)
33. ábra: Hibrid kakas (2n ZZ)
34. ábra: Aneuploid hibrid (2n-1)
- 35-36. ábra: Haploid/diploid mozaikos hibrid (1n/2n)
37. ábra: 10 napos hibrid embrió ivarszerve (hím)
38. ábra: 10 napos hibrid embrió ivarszerve (tojó)
39. ábra: 20 napos hibrid embrió ivarszerve (hím)

40. ábra: 20 napos hibrid embrió ivarszerve (tojó)
41. ábra: Ősivarsejtek jelenlétének vizsgálata hibrid embriók ivarszervében
42. ábra: Hibrid, sárga magyar tyúk és gyöngytyúk minták allélméretei
- 43-44. ábra: 1 napos és 1 hetes hibrid csibék
45. ábra: 18 hetes hibridek
46. ábra: sötétbarna színváltozat
47. ábra: barna-vörös színváltozat
48. ábra: fehér foltos színváltozat
- 49a,b. ábra: 16 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe
- 50a,b. ábra: 20 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe
- 51a,b. ábra: 24 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe
- 52a,b. ábra: 30 hetes hibrid ivarszervei és a herék szövettani metszetének képe
- 53a,b. ábra: 30 hetes gyöngytyúk kakas heréi és a herék szövettani metszetének képe
54. ábra: 30 hetes gyöngytyúk tojó petefészke
- 55-56. ábra: Penetrációs nyílások a csírákorong területén és a csírákorong területén kívül
57. ábra: Gyöngytyúk spermiumok in vitro penetrációs nyílásai tyúktojás membránon
- 58-59. ábra: Injektált hibridek kelést követően és 40 hetes korban
60. ábra: Az embrióelhalás és a keltethetőség összehasonlítása a kontroll és injektált hibridek esetében
61. ábra: 7,5 napos embrió ivarszerve
- 62a,b. ábra: 14,5 napos embrió ivarszerve
63. ábra: Donor és recipiens eredetű ősivarsejtek vizsgálata 18,5 napos injektált embrió jobb és bal ivarszervében (19H04)
64. ábra: kontroll egyed ivarszerve
65. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszerve
66. ábra: Injektált hibrid (21H355) ivarszerve
67. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszervének hematoxilin-eozinnal festett szövettani metszete
- 68-69. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszervének metszetei
70. ábra: Injektált hibrid (21H268) ivarszerve immunfestett metszeten
71. ábra: Injektált hibrid (21H355) ivarszervének hematoxilin-eozinnal festett szövettani metszete
- 72-73. ábra: Injektált hibrid (21H355) ivarszerve immunfestett metszeten
74. ábra: Kontroll egyed ivarszervének hematoxilin-eozinnal festett szövettani metszete
75. ábra: Kontroll hibrid ivarszervének immunfestett metszete

M3 – Összefoglaló táblázat az elvégzett vizsgálatokról

<i>sárga magyar kakas x gyöngytyúk tojó</i>													
	ND	PD	BWE	D1-5	D6-10	D11-15	D16-20	D21-27	befulladt	KIKELT	abnormális	Σ	
1. Előzetes vizsgálatok													
2016/1	db 143	26	92	60	8	8	3	18	65	36	3	462	
2016/2	db 148	28	121	60	7	3	13	1	32	26	9	448	
2021	db 392	45	0	59	9	1	3	1	75	45		630	
Összesen	% 44,35	6,43	13,83	11,62	1,56	0,78	1,23	1,30	11,17	6,95	0,78		
db 683	99		213	179	24	12	19	20	172	107	12	1540	
2. Embriónális ivarszerv-mintavételhez												53	
db												1593	
<i>sárga magyar tojó x gyöngytyúk kakas</i>													
	ND	PD	BWE	D1-5	D6-10	D11-15	D16-20	D21-27	befulladt	KIKELT	abnormális	Σ	
2017	% 98,43	0,85	0,28	0	0	0	0,14	0	0,14	0,14	0		
db 691	6		2	0	0	0	1	0	1	1	0	702	
ÖSSZES keltetett hibrid kontroll tojás												2295	
db													
<i>Házityúk kontroll</i>													
	ND	PD	BWE	D1-5	D6-10	D11-15	D16-20	D21-27	befulladt	KIKELT	abnormális	Σ	
	% 16,31	5,67	0,71	7,80	2,84	0	2,84	0	9,22	54,61	0		
db 23	8		1	11	4	0	4	0	13	77	0	141	
<i>Gyöngytyúk kontroll</i>													
	ND	PD	BWE	D1-5	D6-10	D11-15	D16-20	D21-27	befulladt	KIKELT	abnormális	Σ	
	% 26,32	9,21	3,95	9,21	3,95	0	0	0	11,84	35,53	0		
db 20	7		3	7	3	0	0	0	9	27	0	76	

Injektálás

sárga magyar kakas x gyöngytyúk tojó

1. Injektálás embrionális ivarszervek vizsgálatához

[illegible][illegible][illegible]

ÖSSZES injekciós keltető hibrid tojás

92

12. FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Molnár, M., Lázár, B., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Buda, K., Nagy, N., Szőcs, E., Fejszák, N., Liptói, K., Gócza, E., McGrew, M.J., Várkonyi, E.: Successful formation of sperm cells from transplanted primordial germ cells in sterile interspecific avian recipients. **SCIENTIFIC REPORTS**, (elfogadás alatt)

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 REPORTS**, <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

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 blasztodermasejtjeinek 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

Az értekezés témájában megjelent nem impakt faktoros tudományos cikkek:

Molnár, M. (2018): The use of infertile interspecific hybrids for a novel model of PGC reintroduction applicable in gene preservation for poultry. In: *Innovative Management of Animal Genetic Resources Newsletter*, 2018/3. pp.3.

Konferenciaközlemények:

Molnár M., Lázár B., Sztán N., Végi B., Drobnyák Á., Buda K., Nagy N., Szőcs E., Fejszák N., Liptói K., Gócza E., Várkonyi E. (2023): Sikeres ősvarsejt beültetésből származó hímvarsejtek detektálása steril fajok közötti hibridben. In: S., n. 28. *Szaporodásbiológiai Találkozó Összefoglalók* p. 28.

Buda K., Pálincás-Bodzsár N., Végi B., Várkonyi E., Lázár B., **Molnár M.**, Drobnýák Á., Barna J., Liptói K. (2023): Novel developments in the poultry gene conservation practice. In: *Program and Abstract Book of the 32nd Annual Meeting of DAGENE* p. 26.

Molnár M., Lázár B., Sztán N., Végi B., Tóth R., Liptói K., Gócza E., Nandi S., McGrew M.J., Várkonyi E. (2022): Production and investigation of guinea fowl and domestic fowl hybrids for PGC-based cryopreservation programmes. In: Brajković V., Čubrić Čurik V., Čurik I., Držaić I., Shihabi M. (szerk.): *ASD 2022 - Book of Abstracts : 30th International Symposium Animal Science Days 2022* p. 100.

Molnár M., Lázár B., Sztán N., Végi B., Drobnýák Á., Buda K., Liptói K., Gócza E., Várkonyi E. (2022): Steril interspecifikus hibridek felhasználhatóságának vizsgálata az ősvarsejt alapú baromfi génmegőrzésben In: *S. n. 27. Szaporodásbiológiai Találkozó Összefoglalók* p. 26.

Molnár M., Lázár B., Sztán N., Végi B., Drobnýák Á., Buda K., Liptói K., Gócza E., Várkonyi E. (2022): Steril interspecifikus hibridek előállítása és felhasználhatóságának vizsgálata őshonos baromfifajaink ősvarsejt alapú génmegőrzésben = Production and investigation of infertile interspecific hybrids for PGC-based gene conservation in hungarian native poultry breeds. In: Bényi E., Bodnár Á., Pajor F., Póti Péter (Póti P. (szerk.): *VIII. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap : Előadások és poszterek összefoglaló kötete = 8th Scientific Day of Animal Breeding in Gödöllő : Book of Abstracts of presentations and Posters* p. 45.

Molnár M., Lázár B., Sztán N., Végi B., Drobnýák Á., Liptói K., Gócza E., Nandi S., McGrew M.J., Patakiné Várkonyi E. (2022): A new model for PGCs reintroduction into host animal using infertile interspecific hybrids. In: Tixier-Boichard M., Duclos M. (szerk.): *26th World's Poultry Congress, Book of abstracts* p. 513.

Lázár B., Tóth R., Tokodyné Szabadi N., Sztán N., **Molnár M.**, Végi B., Drobnýák Á., Liptói K., Patakiné Várkonyi E., Gócza E. (2022): Successful cryobanking of seven indigenous chicken breeds with primordial germ cell lines. In: Tixier-Boichard M., Duclos M. (szerk.): *26th World's Poultry Congress, Book of abstracts* p. 509.

Molnár M., Lázár B., Sztán N., Patakiné Várkonyi E. (2021): Baromfifajok in vitro génmegőrzésének lehetőségei ősvarsejtek felhasználásával. In: Hajdu T., Korsós Z., Málnási Csizmadia G., Mecsnóber M. (szerk.): *A Magyar Biológiai Társaság XXXII. Vándorgyűlése : Program és összefoglalók*, p. 20.

M. Molnár, B. Lázár, N. Sztán, B. Végi, Á. Drobnyák, E. Gócza, M. McGrew, E. Patakiné Várkonyi (2021): Interspecies hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes; investigation of the hybrids obtained from crossing Guinea fowl and domestic fowl. In: *2nd Conference of the Visegrád Group Society for Developmental Biology: Abstracts Oral and Poster presentations* p. 20.

Tokodyné Szabadi N., Sima K., Tóth R., Lázár B., **Molnár M.**, Patakiné Várkonyi E., Gócza E. (2021): Házityúk esetében alkalmazható *in vitro* génmegőrzés, az ősisvarsejt tenyészetek jelentősége. In: Szabó P., Simon B., Soós A., Faludi G., Fitos G. (szerk.): *Kutatás-fejlesztés-innováció az agrárium szolgálatában II. kötet* pp 167-180.

Molnár M., Lázár B., Sztán N., Drobnyák Á., Végi B., Liptói K., Gócza E., Patakiné Várkonyi E. (2019): Az ősisvarsejt alapú génmegőrzésben alkalmazható steril interspecifikus baromfi hibrid recipiens előállítása. In: *S., n. 25. Szaporodásbiológiai Találkozó Összefoglalók* p. 24.

B. Lázár, R. Tóth, M. Anand, **M. Molnár**, K. Liptói, E. Patakiné Várkonyi, E. Gocza (2018): Germline chimera production from cryopreserved primordial germ cell lines of a Hungarian indigenous chicken breed. In: Prukner-Radovcic E., Medic H. (szerk.): *WORLD'S POULTRY SCIENCE JOURNAL: The XVth European Poultry Conference, Conference Information and Proceedings* p 453.

Lázár B., Tóth R., Anand M., Sztán N., **Molnár M.**, Végi B., Drobnyák Á., Patakiné Várkonyi E., Gócza E. (2018): Successful biobanking of an indigenous chicken breed with cryopreserved primordial germ cell lines. In: *POULTRY SCIENCE* (0032-5791 1525-3171): 97 E-Supplement 2 p. 16.

E. Patakiné Várkonyi, **M. Molnár**, N. Sztán, Á. Drobnyák, É. Váradi, B. Végi (2016): Optimization of deep-freezing method of early embryonic cells of Guinea fowl (*Numida meleagris*) for gene preservation purpose. In: N. Yang, L. Lian, J. Zheng, X. Liu, C. Wu (szerk.): *The Proceedings of XXV World's Poultry Congress 2016: Abstracts* p. 449.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Dr. Várkonyi Eszternek**, aki egyetemi tanulmányaim kezdetétől fogva konzulensként, majd témavezetőként is minden téren kitartóan mentorálta szakmai előrehaladásomat. Köszönöm **Dr. Lázár Bencének** az ősvarsejtek felhasználásával kapcsolatos elméleti és gyakorlati tudásának megosztását, valamint a kísérletek végrehajtásában, az eredmények publikálásában és a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét.

Köszönöm az NBGK-Haszonállat-génmegőrzési Intézet további munkatársainak, hogy lehetővé tették a kísérletsorozat és azzal együtt PhD tanulmányaim elvégzését. Külön köszönettel tartozom **Dr. Liptói Krisztinának** a korai embrionális rendellenességek azonosításában, **Lipcei Józsefnének** a kromoszómapreparátumok elkészítésében és **Dr. Buda Kitti Anikónak** a szövettani metszetek elkészítésében nyújtott segítségével.

Köszönöm a Szaporodásbiológiai Laboratórium csapatának, többek között **Dr. Végi Barbarának**, **Dr. Drobnyák Árpádnak**, **Dr. Váradi Évának**, **Szabó Zsuzsának** és **Török Évának** a mesterséges termékenyítés, a mintavételek és az *in vitro* vizsgálatok során végzett több éves munkáját.

Köszönöm a MATE Genetika és Biotechnológia Intézetében dolgozó Alkalmazott Embriológia és Össejt Biológia Csoport tagjainak, köztük **Dr. Gócza Elennek** magasszintű elméleti hozzájárulását a kísérlet kivitelezéséhez, valamint köszönöm **Dr. Tóth Rolandnak** a sejtvonalak biztosítását számomra.

Köszönöm a Roslin Institute (UK) munkatársainak, köztük **Michael J. McGrew-nak** és **Sunil Nandi-nak**, a SOTE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Össejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium vezetőjének, **Dr. Nagy Nándornak** és munkatársainak, **Dr. Pecsénye-Fejszák Nórának** és **Szőcs Emőkének** az immunhisztokémiai vizsgálatok során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom családom és barátaim kitartó támogatásáért. Külön köszönöm szüleimnek, **Molnár József Gyulának** és **Domoszlai Máriának**, illetve testvéremnek, **Molnár Bálintnak**, hogy végig stabil háttérrel biztosítottak hosszantartó tanulmányaimhoz.