



**Újszerű modell kidolgozása a madár ősvarsejtek
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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

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 alkalmazható ondómélyhűtési technológia önmagában 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. A nőivar megőrzésére irányuló 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 (Panda & McGrew 2022) pedig számos országban jogi akadályokba ütközhet, így a jelen kísérletsorozat a recipiensek sterilitásának 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 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

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A hibridek előállítása

A hibridelőállítás sárga magyar tyúk (*Gallus gallus domesticus*) és magyar parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*) keresztezésével történt. A mesterséges termékenyítés során gyöngytyúk tojókat sárga magyar kakasoktól, majd a fordított keresztezés során sárga magyar tojókat gyöngytyúk kakasoktól vett spermával termékenyítettem (Bakst & Dymond, 2013). A tojásokat naponta kétszer gyűjtöttem, felhasználásig 15-17°C-on tároltam, majd két óránként 45°-os forgatással, 37,8°C hőmérsékleten és 70% relatív páratartalom mellett keltettem. A keltetés során többek között vizsgáltam a kelési időt és meghatároztam a keltetés ideje alatt elhalt embriók korát, valamint a látható fejlődési rendellenességeket.

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

2.2.1. Direkt kromoszóma preparátumok készítése elhalt embriókból

A keltetés során elhalt embriókból mintát vettem és kromoszóma preparátumokat készítettem, amiket mikroszkóp alatt vizsgáltam az egyedek ivarának és az esetlegesen előforduló kromoszóma rendellenességek meghatározásához.

2.2.2. Az embrionális ivarszervek vizsgálata immunhisztokémiával

A házityúk kakasok és gyöngytyúk tojók keresztezéséből származó hibrid tojásokból ivarszervmintákat gyűjtöttem a keltetés 6., 10. és 20. napján annak megállapítására, hogy a hibridek ivarszervei tartalmazzak-e ősvarsejteket. Az elkészített metszeteken immunfestést végeztem, majd a lemezeket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam.

2.2.3. *A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálata*

A kikelt egyedek hibrid státuszának vizsgálatához gyöngytyúkok, sárga magyar tyúkok és fenotípusosan hibrid egyedek vérmintájából izoláltam DNS-t a hagyományos kisózásos módszer (Miller *et al.* 1988) madárra módosított protokollja szerint (Bodzsar *et al.* 2009). A polimeráz láncreakcióhoz különböző fluoreszcens jelölésekkel ellátott farkas primereket (GUJ1, GUJ87) használtam. A fragment analízis eredményeként kapott adatokat analizáló szoftverrel dolgoztam fel, ami alapján meghatároztam mindkét faj esetében a felsokszorozott DNS szakaszok pontos allélméretét, ezáltal lehetővé vált a vizsgált egyedek házityúk-gyöngytyúk hibrid státuszának megállapítása.

2.2.4. *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 vizsgálatához a fixált mintákból paraffinos beágyazást követően szövettani metszeteket készítettem, majd azokat haematoxin-eosin technikával, automata festőgépben megfestettem. A lefedett lemezeket mikroszkóp alatt, 100x-os nagyítással vizsgáltam.

2.2.5. *A termékenyítőképesség in vitro vizsgálatai*

A gyöngytyúk kakasok és házityúk tojók keresztezése során megfigyelt nagyszámú terméketlen tojás miatt *in vitro* vizsgáltam, 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, mosást követően tárgylemezre

terítettem és sötét látóteres mikroszkóp használatával, 4x-es nagyítás mellett vizsgáltam a penetrációs nyílások jelenlétét. (Staines *et al.* 1998)

In vitro membránesztel azt 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 oldatban 38°C-on, 5 percig, lassú keverés mellett inkubáltam. Ezt követően tárgylemezre terítettem, majd sötét látóteres mikroszkóppal (Leitz Diaplan), 4x-es nagyítással 3 látóteret vizsgáltam meg és meghatároztam a penetrációs nyílások számát. (Steel *et al.* 1994)

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

Mivel az előzetes vizsgálatok eredményeiből megállapítható volt, hogy csak a gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezése alkalmas a hibridek előállítására, a továbbiakban az ezzel a kombinációval létrehozott hibridek donor ősvarsejtek befogadására való alkalmasságát teszteltem: 3 napos embriók véráramába GFP-t expresszáló ősvarsejteket injektáltam, majd vizsgáltam a donor sejtek ivarszervbe épülését embrionális korban, valamint felnevelt egyedek esetében is.

2.3.1. 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 eredményeivel, megállapítva az injektálási eljárás esetleges hatását a keltethetőségre.

2.3.2. Az injektált sejtek jelenlétének vizsgálata az embrionális ivarszervekben

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

18,5 napos embriók esetében az ivarszerveket a fixálását követően zselatin blokkba ágyaztam és az abból elkészített metszeteken immunfestéssel is vizsgáltam az injektált sejtek ivarszervbe épülését.

2.3.3. Az ivarérett egyedek ivarszerveinek vizsgálata

Két injektált és egy kontroll hibrid ivarszervét immunfestéssel vizsgáltam, illetve szövettani metszeteket is készítettem annak megállapítására, hogy az injektált donor sejtek beépültek-e a hibridek ivarszerveibe.

Az ivarszerveket a fixálást követően zselatin blokkba ágyaztam, kriosztáttal metszeteket készítettem, majd a lemetszett minták egy részén szövettani vizsgálat céljából hematoxin-eosin festést végeztem és a lefedett lemezeket mikroszkóp alatt 100x-os nagyítással vizsgáltam.

A lemetszett minták egy másik részén sejtmagfestést végeztem, majd a lefedést követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltam a GFP-expressziót.

3. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

3.1. A hibridek előállítása

A gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezésével kapott tojások 44,35 %-a bizonyult terméketlennek, nagyon korai embrióelhalást 20,26 %-nál állapítottam meg. A fejlődésnek indult embriók 11,62 %-a a fejlődés megindulását követő 5 napon belül, 1,56 %-a az inkubálás 6. és 10. napja között, 0,78 %-a a 11. és 15. napja között, 1,23 %-a a 16. és 20. napja között és 1,30 %-a a 21. és 27. napja között halt el. A befűlladt embriók aránya 11,17 %, a kikelt egyedek aránya pedig **6,95 %** volt. Az elhalt embriók vizsgálata során 0,78 % bizonyult abnormálisnak, ezek nyitott koponyával, nyitott hasfallal, rendellenes csőrrel, illetve törpe növéssel rendelkező egyedek voltak. A keltetéskor elhúzódó 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 kelt ki.

A házityúk tojók és gyöngytyúk kakasok keresztezése sikertelennek tekinthető, mivel a 702 db keltetett tojás 98,43 %-a terméketlen volt, 1,13 %-nál állapítottam meg nagyon korai embrióelhalást, 0,14 % volt az inkubáció 16. és 20. napja között elhalt embriók aránya, szintén 0,14 % befűlladt és csupán 1 egyed kelt ki (**0,14 %**).

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

3.2.1. Direkt kromoszóma preparátumok készítése elhalt embriókból

187 db minta kromoszóma vizsgálatát végeztem el, melyeknek 43,24 %-a nőivarú, 56,76 %-a hímivarú egyedtől származott.

A vizsgálat során kétféle kromoszóma rendellenességet azonosítottam. Egyik az aneuploidia, melynek aránya 0,90 % volt. A másik meghatározott rendellenesség a mozaicizmus: a vizsgálat során a haploid/diploid ($1n/2n$) mozaikos kariotípusú egyedek aránya 1,80% volt.

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, 1 pedig kakasnak bizonyult és esetükben nem azonosítottam kromoszóma rendellenességet.

3.2.2. *Az embrionális ivarszervek vizsgálata immunhisztokémiával*

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 Eyal-Giladi & Kochav (1976) által meghatározott X. stádiumtól kezdve megbízhatóan alkalmazható, őssejtspecifikus SSEA-1-t, valamint az ősvarsejt-specifikus p63 markert. A nőivarú ivarszervekben eloszlata, nem koncentrálódva a kéregben számos sejt mutatott pozitív festődést a p63 és az SSEA-1 esetében is, a hím ivarszervekben pedig a p63-pozitív sejtek a *vesiculae seminales* mentén, körkörös elhelyezkedve azonosíthatók, így megállapítható, hogy az ősvarsejtek mindkét ivar esetében jelen vannak a hibridek ivarszervében.

3.2.3. *A kikelt egyedek hibrid státuszának molekuláris genetikai vizsgálata*

Az egyedek hibrid státuszának vizsgálatára irányuló fragment analízis eredményeként megállapítható, hogy 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. A markerek vizsgálatának eredménye alapján

megállapítható, hogy mind a 38 vizsgált egyed a házityúk és a gyöngytyúk fajok hibridje volt.

3.2.4. Az ivarszervek fejlődésének vizsgálata a nevelés során

Az ivarszervek vizsgálata során megfigyelhető volt, hogy minden hibrid egyed két ivarszervvel rendelkezett, ezek általában nem egy magasságban helyezkedtek el és enyhén hajlott formát mutattak. A 16. és 30. élethét között méretük lényegesen nem változott. A 16-20 hetes egyedek ivarszerveinek szövettani metszetén spermatociták és spermiumképződésre utaló jel nem látszik, minimális osztódási aktivitással inaktív, illetve infantilis herék figyelhetők meg. A 22. és 30. élethét között vizsgált egyedek ivarszervei normális tubulus szerkezettel jellemezhetők, azonban a sejtek polimorfiát mutatnak, a csírahám inaktív, spermiumképződésre utaló jelek ezekben sem láthatók.

A kontrollként megfigyelt gyöngytyúkok esetében a hímek heréi kifejlődtek, méretük nagymértékben meghaladta a hibridek ivarszerveinek méretét. A tojók petefészke is kifejlődött a 16. élethétre, a 26. héten pedig tojni kezdtek.

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

3.2.5. A termékenyítőképesség in vitro vizsgálatai

A sikertelen keresztezési kombinációnál (házityúk tojó x gyöngytyúk kakas) begyűjtött keltetőtojások vizsgálatának eredményei azt mutatták, hogy az esetek 37 %-ában 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. 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

keresztvezésének ez a kombinációja nem működik. Emellett az is elmondható, hogy a megfigyelt penetrációs nyílások nem olyan kifejezetten, mint normál esetben, aminek feltételezett oka az lehet, hogy a gyöngytyúk spermiumok akrozinja nem tudja megfelelően bontani a membrán szerkezetét.

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

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

3.3.1. A fejlődés során elhalt injektált embriók fenotípusos vizsgálata

Az injektált embriók 57,85%-a a keltetés első 5 napjában halt el, ezen belül az injektálás időpontjában (a 3.napon) elhaltak az összes injektált embrió 32%-át teszik ki. A 6. és 10. nap között elhaltak aránya 21,85%, a 11. és 15. nap között 5,54%, a 16. és 20. nap között 4,62%, a 21. és 27. nap között pedig 4,31%. Az embriók 2,77%-ánál volt megfigyelhető fejlődési rendellenesség, ez az esetek többségében nyitott hasfalat, néhány esetben pedig a felső és/vagy alsó csőrakáva rendellenességét jelenti. A befulladás aránya 1,54% volt, valamint az injektált tojások **1,54%-a** kelt ki.

A nem injektált (kontroll) és injektált hibridek keltetésének adatait összehasonlítva, a keltetés első 10 napjában elhalt, a 11. és 20. napja között elhalt embriók, valamint a befulladás és kikelt egyedek esetében is szignifikáns eltérés figyelhető meg a két csoport között. A keltetés 21. és 27. napja között elhalt embriók arányában nem figyelhető meg szignifikáns eltérés.

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) is szignifikáns eltérés oka lehet, hogy az injektált tojások inkubálása parafilmmel lezárt ablakkal folytatódott, ugyanis ezen az ablakon keresztül a különböző kórokozók könnyebben jutnak be a

tojásba és megfertőzhetik a fejlődő embriót. A befulladás és kikelt egyedek esetében a kontroll csoportnál megfigyelhető nagyobb számú befulladás 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.

3.3.2. Az injektált sejtek jelenlétének vizsgálata az embrionális ivarszervekben

7,5 napos korban 30 injektált embrió közül 15 volt életben a vizsgálat időpontjában, ezek közül 12 db tartalmazott integrálódott injektált sejteket. További 75 embriót vizsgáltam 14,5 napos, 42 embriót pedig 18,5 napos korban. Az ősvarsejtek azonosítására a fejlődés teljes ideje alatt alkalmas, citoplazmában expresszázó CVH antitestet használtam. A vizsgálat idején élő embriók mindegyikében megfigyelhetők voltak az injektált, ivarszervbe épült donor eredetű ősvarsejtek.

3.3.3. Az ivarérett egyedek ivarszerveinek vizsgálati eredményei

A felnevelt injektált hibridek ivarszervei a kontroll egyedhez hasonlóan nem egy magasságban helyezkednek el és kissé meghajlott formát mutatnak. A házityúk hím ivarszerveinek fejlődéséhez hasonlítva a hibridek heréinek érése jóval lassabb folyamat.

Az egyik injektált egyed ivarszervét 46 hetes korban szövettani metszeteken vizsgálva megállapítható, hogy az érés különböző stádiumában lévő spermatidák, továbbá érett spermiumok is megfigyelhetők a herecsatornában. Az immunhisztokémiai vizsgálat eredménye mutatja, hogy az ivarszerv szinte 100%-ban a donor eredetű GFP-t expresszáló sejtekből fejlődött ki. A metszeteken jól láthatóvá vált, hogy az ivarszervben különböző érési fázisban lévő ivarsejtek donor eredetűek.

A másik, 42 hetes korban vizsgált injektált hibrid ivarszervének szövettani metszetén érett spermiumok még nem, azonban korai érési stádiumban lévő spermatidák láthatók a herecsatornában. Az immunfestett metszeteken ebben az esetben is láthatók a donor eredetű ősvarsejtekből fejlődött ivarszervszövet-részek.

A kontroll egyed ivarszerve is normális tubulus struktúrát mutat, azonban ivarsejtek és azok előalakjai nem láthatók a herecsatornában. Az injektált egyedektől eltérően, a kontroll hibrid ivarszervének metszetén kizárólag a magfestés látható.

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

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A madarak génmegőrzése során nehézséget jelentő nőivar hosszútávú megőrzését célzó kutatómunkához kapcsolódva, a dolgozatban leírt kísérlet-sorozat célja fajhibridek létrehozása és azok alkalmasságának tesztelése az ősvarsejtek (PGC-k) befogadására vonatkozóan.

A fajhibridek előállítása gyöngytyúk és házityúk fajok keresztezésével történt, mely során a gyöngytyúk tojók és házityúk kakasok keresztezése sikeres volt, azonban a házityúk tojók gyöngytyúk kakasokkal történő keresztezésekor a terméketlen tojások aránya drasztikusan megemelkedett, így sikertelennek bizonyult. A nagyarányú terméketlenséget az okozhatja, 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. 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 feltehetőleg nem működnek.

A sikeres keresztezés (gyöngytyúk tojó x házityúk kakas) eredményeként létrejött és felnevelt hibridek mindegyike steril hím volt. 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 ivarérettség során. A létrehozott hím hibridek sterilizálása, 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

keresztkezésének 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).

Mivel a felnevelt hibridek kizárólag hímivarúak voltak, további vizsgálatok szükségesek annak feltárására, hogy a nőivarú (ZW) ősiarsejtek képesek-e a hímivarú (ZZ) ivarszerveket kolonizálni, azokba integrálódni és fejlődhetnek-e életképes spermiumok ebből a genotípusból (ZW). Több korábbi irodalmi adat alapján feltételezhető, hogy lehetséges a nőivarú genotípus megjelenése és örökítése hím kimérák felhasználásával is (Naito *et al.* 1999, Liu *et al.* 2017, Trefil *et al.* 2017, Xu *et al.* 2019, Marinovic *et al.* 2022, Blank *et al.* 2024, Park *et al.* 2020).

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 ivarézés, illetve ivarsejttermelés serkentésének céljából.

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

5. 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.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- 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., 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>
- 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>
- 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.
- 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.
- 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>
- 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.
- 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:

- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ 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.