Szent István Egyetem

Doktori értekezés tézisei

DOI: 10.54598/000070

Lázár Bence
Gödöllő
2020

Szent István Egyetem

MADÁR ŐSIVARSEJTEK IZOLÁLÁSA ÉS FEJLŐDÉSI POTENCIÁLJÁNAK JELLEMZÉSE *IN VITRO* ÉS *IN VIVO*

Lázár Bence
Gödöllő
2020

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdasági Biotechnológia

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Gócza Elen
MTA doktora, tudományos tanácsadó
NAIK, MBK, ÁBF, főosztályvezető

Társ-témavezető: Patakiné Dr. Várkonyi Eszter
tudományos főmunkatárs
Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....	.....
Témavezető jóváhagyása	Társ-témavezető jóváhagyása
Gócza Elen, MTA doktora	Patakiné Várkonyi Eszter Ph.D.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK ..... - 5 -

1.1. BEVEZETÉS ..... - 5 -
1.2. CÉLKITŰZÉSEK ..... - 6 -

2. ANYAG ÉS MÓDSZER ..... - 7 -

2.1. A VIZSGÁLATOKBAN RÉSZTVEVŐ ŐSHONOS TYÚKFAJTÁK JELLEMZÉSE ..... - 7 -
2.2. KÍSÉRLETI ÁLLATOK, ÁLLATKÍSÉRLETEK ..... - 7 -
2.3. A KÍSÉRLETI ÁLLOMÁNY TARTÁSTECHNOLÓGIÁJA ..... - 8 -
2.4. ŐSIVARSEJTEK IZOLÁLÁSA AZ EMBRIÓBÓL ..... - 8 -
2.5. ŐSIVARSEJTVONALAK ALAPÍTÁSA ÉS FENNTARTÁSA – SEJTTENYÉSZTÉS ..... - 9 -
2.6. ŐSIVARSEJTVONALAK JELLEMZÉSE *IN VITRO* ..... - 9 -
2.7. ŐSIVARSEJT VONALAK JELLEMZÉSE *IN VIVO* ..... - 11 -
2.8. ŐSIVARSEJT VONALAK MÉLYHŰTÉSE ..... - 12 -
2.9. ŐSIVARSEJT VONALAK FELOLVASZTÁSA ..... - 12 -
2.10. GÉNBANK LÉTREHOZÁSA ŐSIVARSEJTEK FELHASZNÁLÁSÁVAL ..... - 12 -
2.11. A DONOR FAJTA VISSZANYERÉSE ŐSIVARSEJTEK INJEKTÁLÁSÁVAL ÉS KERESZTEZÉSSEL ..... - 13 -
2.12. STATISZTIKAI MÓDSZEREK ..... - 14 -

3. EREDMÉNYEK ..... - 15 -

3.1. ŐSHONOS MAGYAR TYÚKFAJTÁK ŐSIVARSEJT VONALAINAK ALAPÍTÁSA ..... - 15 -
3.2. AZ ALAPÍTOTT ŐSIVARSEJT VONALAK *IN VITRO* JELLEMZÉSE ..... - 16 -
3.3. AZ ALAPÍTOTT ŐSIVARSEJT VONALAK *IN VIVO* JELLEMZÉSE ..... - 19 -
3.4. GÉNBANK LÉTREHOZÁSA AZ ALAPÍTOTT ŐSIVARSEJT VONALAKBÓL ..... - 20 -
3.5. A DONOR FAJTA VISSZANYERÉSE ŐSIVARSEJTEK INJEKTÁLÁSÁVAL ÉS KERESZTEZÉSSEL ..... - 20 -
3.6. JAVASOLT PROTOKOLL HÁZITYÚK ŐSIVARSEJT VONALAK LÉTREHOZÁSÁHOZ ÉS TÁROLÁSÁHOZ GÉNBANKOK SZÁMÁRA ..... - 21 -
3.7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ..... - 22 -

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK ..... - 23 -

4.1. JAVASLATOK ..... - 26 -

5. KIEMELT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK ..... - 27 -

6. IRODALOMJEGYZÉK ..... - 31 -

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

1.1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedben az Európai Unió komolyan támogatja a génbankok létrehozását és az ezekben tárolt minták tárolását és felhasználását. A Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK HGI) már a 1950-es évektől kezdve megtalálhatóak az őshonos magyar baromfi és víziszárnyas fajok és fajták (Biszkup and Beke, 1951; Báldy, 1954) mint élő génbanki állományok (*ex situ in vivo*). 2016-tól kutatócsoportunk részt vett egy Horizon 2020-as (n° 677353) pályázatban, amelynek célja az európai unión belüli génbankokban tárolt genetikai anyagok felhasználásának koordinálása és a szolgáltatások fejlesztése (*ex situ in vitro* módszerek) volt, majd 2017-től elkezdődött a VEKOP (VEKOP-2.3.2-16-2016-00012) „Kárpát-medencei őshonos haszonállatfajok, -fajták és -ökotípusok XXI. századi génbanki stratégiájának tudományos megalapozása és fejlesztése" című projekt, amelyben mind az NBGK HGI, mind Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (NAIK MBK) konzorciumi tagként vett részt. Így lehetőségem nyílt a már tárolt magyar őshonos baromfi spermaminták mellett létrehozni az ősivarsejt (PGC) génbanki mintákat is.

Madaraknál azért van nagy jelentősége az ősivarsejtek génbanki tárolásának, mert a nőivarban jelenlévő W ivari kromoszóma genetikai anyagát, valamint a mitokondriális DNS-t csak így lehet megőrizni. Madaraknál, ellentétben az emlősökkel, a hímivar rendelkezik a homogametikus ZZ ivari kromoszómapárral, míg a nőivar a heterogametikus ZW kromoszómákkal. Mivel a spermiumok esetében csak a haploid genetikai anyagot tudjuk megőrizni, ezért az eredeti genom rekonstruálásához 6-8-szoros visszakeresztezésekre van szükség (Blesbois, 2007).

Az ősivarsejtek jelentőségét madarakban az 1990-es években kezdték felfedezni (Tajima et al., 1993; Naito et al., 1994). Ahhoz, hogy igazán ki tudják használni a bennük rejlő lehetőségeket, ki kellett dolgozni a felszaporításuk és fenntartásuk módszerét sejttenyészetben. Erre 2006-ig kellett várni. Van de Lavoir és munkatársai (Van De Lavoir et al., 2006) dolgozták ki először az ősivarsejtek hosszútávú fenntartását, majd az ő módszereiket fejlesztették tovább más kutatócsoportok (Macdonald et al., 2010; Whyte et al., 2015; Oishi et al., 2016; Tonus et al., 2016). Napjainkban az ősivarsejtek könnyen kinyerhetők a madárembrió véréből, tenyészthetők, mélyhűthetők, aztán visszainjektálhatók egy recipiens embrió keringésébe. Így mind a génmegőrzésben, mind a génmódosítást célzó kutatásokban nagyon jól felhasználhatók.

Mivel se a génbanki PGC minták előállításának, se a tesztelésének nincs meg a kialakult gyakorlata, a szakirodalmi forrásokat alapul véve (Pain et al., 1996; Macdonald et al., 2010; Kim et al., 2013; Whyte et al., 2015) kidolgoztam ennek a módszertanát, majd teszteltem is az általam eltárolt mintákat. A vizsgálatok során az eltárolt ősivarsejtekből sikerült visszanyernem az eredeti fajtát jó hatékonysággal. További fontos eredmény, hogy mind hímivarú, mind nőivarú ősivarsejteket sikerült sejttenyészetekben fenntartani, és mindkét nemből a visszainjektálás után utódot nyerni. Ezért a dolgozatban bemutatott protokollokat ajánlom madár *in vitro* génmegőrzéssel foglalkozó más intézményeknek/Génbankoknak is.

1.2. Célkitűzések

Munkám során célkitűzéseim a következők voltak:

- A madár ősivarsejtek izolálásának, homogén sejtpopulációk kialakításának, *in vitro* fenntartásának és mélyhűtésének adaptálása a magyar őshonos házityúk fajtákra.
- Ősivarsejt alapú génbank létrehozása, mely hat őshonos magyar házityúk fajta mintáit tartalmazza.
- A génbankban tárolt sejtvonalak minőségének és az alkalmazott módszerek hatékonyságának tesztelése: Fogolyszínű magyar házityúk fajta felolvasztott génbanki mintáival ivarszervi kimérák, majd donor eredetű utódok létrehozása.
- Egységesen javasolható protokoll kidolgozása házityúk ősivarsejtek génbanki mintáinak előállításához és eltárolásához.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A vizsgálatokban résztvevő őshonos tyúkfajták jellemzése

2.1.1. Magyar tyúkfajták

A magyar tyúkfajták kettőshasznúak, jellemző rájuk a közepes testméret. A tyúkok súlya átlagosan 2,0–2,3 kg, a kakasoké 2,5–3,0 kg. Jellemző rájuk a széles, telt és domború mell, a magasan tűzött szárny, a jól fejlett tojóhas, a középhosszú és sárga láb, a test nagyságához viszonyítva túlfejlett faroktollak és a testhez simuló tollazat. Fejük kicsiny, koponyájuk domború, csőrük rövid és erős tövű, szemük élénk. A taréj középnagy és hátranyúló, egyenesen felálló, a tojóké gyakran megdőlt, egyenletesen csipkézett egyszerű fűrésztaraj.

A magyar tyúk legfőbb értéke finom rostú és ízletes húsa, mely alapján méltán népszerű itthon és külföldön egyaránt. Csirkéi 8–10 hetes koruktól már értékesíthetők. Tojástermelése átlagosan évi 140–150 darab (Szalay, 2015).

Több színváltozatát is megkülönböztetjük, melyek közül leggyakoribbak: Fehér magyar, Kendermagos magyar, Sárga magyar és Fogolyszínű magyar. A dolgozat vizsgálatai során mind a négy színváltozattal dolgoztam.

2.1.2. Erdélyi kopasznyakú tyúkfajták

Az erdélyi kopasznyakú tyúkra jellemző, hogy nyaka, részben a melle, valamint hasi része is tollatlan. A kopasznyakúságot egyetlen autoszomális gén határozza meg. A tulajdonság a fedett nyakúsággal szemben domináns. Homozigóta kopasznyakúak esetében a nyak teljesen csupasz, míg a heterozigóta egyedek esetében elöl, a nyak alsó részén – már naposcsibéken is jól megfigyelhető – tollpamacs van. A fejtetőn szintén kevés toll található. Sokféle színváltozatban fordult elő, korábban legelterjedtebb a fehér volt. Testalkata hasonlít a magyar tyúkéra, de annál nagyobb törzsű, hosszabb és tojásdad alakú, melle kerek, mint a vadmadaraké. Szárnya hosszabb és hegyesebb. A kakasok testsúlya átlagosan 2,5-3,0 kg, a tojóké 2,0-2,3 kg.

Az erdélyi kopasznyakú tyúkfajtákat a 20. század első felében még elsőrendű gazdasági tyúkként tartották nyilván. Rendkívül edzettek, erősek és ellenállóak. Gyorsan fejlődnek és gyorsan tollasodnak. Számukra megfelelő környezetben kitűnő tojástermelők, tojásaik súlya a 70 g-ot is meghaladhatja. A tojások általában barna- vagy krémszínűek, de előfordulnak fehérhéjúak is (Szalay, 2015).

Több színváltozatát is megkülönböztetjük, melyek közül leggyakoribbak: Fehér-, Fekete- és Kendermagos erdélyi kopasznyakú.

A jelen dolgozatban végzett vizsgálataimban a Fekete- és Kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk fajtákkal dolgoztam.

2.2. Kísérleti állatok, állatkísérletek

A kísérletekben résztvevő állatok tartása a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK HGI) történt és megfelelt a Magyar Állatvédelmi Törvénynek (1998. XXVIII), továbbá a NBGK HGI rendelkezik a Nemzeti

Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóságának állatkísérleti engedélyével. Az embrió manipulációs kísérletek követték az Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (NAIK MBK) Állatbiotechnológiai Főosztály szabványos protokolljait, a vizsgálatokat az intézet jóváhagyásával végeztem.

2.3. A kísérleti állomány tartástechnológiája

Az ősivarsejt vonalak alapításához használt termékeny tojások a NBGK HGI génbanki állományától származtak. Az intézetben tartott őshonos tyúkfajtákat nagy kültéri kifutóval rendelkező istállókban tartják. Az állománysűrűség 5-6 db/m^2, az ivararány 7 tyúk : 1 kakas. A tojások tiszta, száraz gyűjtésére tojófészkek állnak rendelkezésre (5 tojó/fészek). A tenyészállomány takarmányozása tojótáppal történik, mészgritt kiegészítés mellett.

A tojásgyűjtést naponta kétszer végzik. Ezután a tenyésztojások a hűtött tojástárolóba kerülnek. A tojások keltetése egy Midi F500S keltetőgépben (PL Maschine Kft.) történt 37,8°C-os hőmérsékleten 60-65 %-os páratartalom mellett.

A kikelt naposcsibéket 4 hetes korig a kísérleti állatházban elhelyezett ún. nevelő inkubátorban neveltem 0,5 m^2/10 állat alapterületen, zeolit alomra kihelyezve, *ad libitum* indítótáp takarmányozás mellett. A készülék belmagassága 40 cm, elölről teljesen átlátszó plexi borítja. Természetes megvilágítás biztosított, de szükség esetén belső világítás is alkalmazható volt. A hőmérsékletet fokozatosan hetente csökkentettem 30°C-ról a végső 22-24°C-ra.

A növendékeket 4 hét után kis csoportban (10-15 állat) zeolit / puhafa forgács mélyalomra helyeztem ki 2 m^2 alapterületre. 16 hetes kortól az állományt nagyobb alapterületű fülkékben, szintén mélyalomra telepítettem át. Ez a mélyalmos elhelyezés a kísérleti, zárt istállón belül történt, rácselemekkel elválasztott, mobilan változtatható méretű, felülről nyitott területen. A takarmányozás *ad libitum* indító-, majd nevelőtáp volt. A megvilágítás természetes, de szükség esetén fényprogrammal is szabályozható. A hőmérséklet a fajnak megfelelő 20-22°C volt.

2.4. Ősivarsejtek izolálása az embrióból

A HH 13-17 stádiumú (2,5-3 napos) embriókból egyedileg vettem vért, melyhez a (az előzetes alkoholos áttörléssel fertőtlenített) tojásokat először egy üveg Petri csészébe törtem fel, így az embrió teljes érhálózata hozzáférhetővé vált. Következő lépésként sztereo-mikroszkóp alatt steril, húzott üvegkapilláris (~ 20 µm -es vég átmérő) és szájpipetta segítségével 1-3 µl vért szívtam le az embriók dorzális aortájából, melyet azonnal tenyésztő edényben (48 lyukú műanyag plate) levő tyúk ősivarsejtek számára kifejlesztett speciális médiumba helyeztem (Whyte et al., 2015). Az izolált embriókból minden esetben szövetmintát vettem későbbi ivarmeghatározás céljára, melyet -20°C-on tároltam későbbi feldolgozásig. Minden esetben rögzítettem az izolálás időpontját, az embriók pontos korát (HH stádiumok) és hogy tapasztalható volt-e valamilyen fejlődési rendellenesség.

2.5. Ősivarsejtvonalak alapítása és fenntartása – sejttenyésztés

Az embrióból izolált vért, mely tartalmazta a vér sejtes elemeit és az ősivarsejteket is, 3 hétig tenyésztettem *in vitro* ősivarsejt specifikus médiumban (Whyte et al., 2015) CO_2 termosztátban 38°C-on 5% CO_2 koncentráció mellett. Ez az időtartam elegendő arra, hogy az ősivarsejteken kívül minden egyéb sejttípus eliminálódjon a tenyésztő edényből. Az ősivarsejtek a számukra specifikus tápoldatnak köszönhetően osztódásnak indultak és homogén sejtpopulációt hoztak létre. Ha az egy embrióból alapított tenyészet sejtszáma elérte 3 hét alatt az 1,0 x 10^5 ősivarsejtet, akkor sikeresnek tekintettem a sejtvonal alapítást. Az ősivarsejtek a médiumban szabadon úsztak, a tenyésztő edény nyugalmi állapotában az edény alján, de arra nem letapadva, helyezkedtek el. Ezért a médium csere minden második nap a médium egyharmadának óvatos eltávolításával, majd friss médiummal való pótlásával történt. Heti egy alkalommal a teljes sejtmennyiség szuszpendálásra is sor került. Ekkor steril 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztem a sejtszuszpenziót, majd centrifugáltam a sejteket 4 percig 800 g-vel. Ezt követően a felülúszót eltávolítottam, majd a pelletet friss médiumban szuszpendálva új tenyésztő edénybe helyeztem ki a sejteket.

2.6. Ősivarsejtvonalak jellemzése *in vitro*

Az alapított ősivarsejtvonalakat *in vitro* elemzésnek vetettem alá, hogy meghatározzam az alapvető jellegzetességeiket, illetve megbizonyosodjak róla, hogy valóban homogén sejtpopulációkat kaptam, amelyek rendelkeznek az ősivarsejtekre jellemző sajátosságokkal.

2.6.1. DNS izolálás és ivarmeghatározás

Az embriókból történő vérvétel során gyűjtött embrionális szövetdarabokat lízis pufferben tártam fel. A feltárást követően DNS-t izoláltam (High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche Diagnostics, US), majd a DNS mintákat hígítottam 25 ng/ µl-es koncentrációra. A DNS koncentrációt NanoDrop Spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztam meg, majd a mintákat -20°C-on tároltam későbbi felhasználásig. Ezt követően kezdetben a P2-P8 (Griffiths et al., 1998), majd később CHD1 primer pár (Lee et al., 2010) segítségével sex PCR-t végeztem (MyTaq Red Mix; Bioline Reagents Ltd., UK). A PCR termékeket gélelektroforézis segítségével 1,5%-os agaróz gélen 90 V-on 30 percen keresztül futtattam, majd az eredményeket a ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) berendezéssel dokumentáltam.

2.6.2. Immunohisztokémiai vizsgálatok

Az ősivarsejt tenyészetekből mintát vettem, ezt követően centrifugáltam a sejtszuszpenziót, majd 20 µl PBS-ben szuszpendáltam fel a pelletet. A szuszpenziót kicsöppentve, a sejteket rászárítottam a tárgylemez felületére. Ezt követően 4%-os paraformaldehidben (PFA-ban) fixáltam a cseppeket. Az immunhisztokémiai festés során a kutatócsoportunk által korábban publikált protokollt alkalmaztam (Lázár et al., 2018). A kész lemezek elemzését konfokális mikroszkóp segítségével végeztem el (Leica TCS SP8, Leica Ltd., Germany).

2.6.3. RNS izolálás, cDNS írás és kvantitatív real-time PCR

Az alapított ősivarsejt vonalakból RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (Lázár et al., 2018) segítségével izoláltam a teljes RNS spektrumot a gyártó protokolljának megfelelően. Az RNS koncentrációt NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztam meg, majd a mintákat -70°C-on tároltam későbbi felhasználásig. cDNS íráshoz High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et használtam (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, US) a gyártó előírásai alapján. Az elkészült cDNS-t -20°C-on tároltam későbbi felhasználásig. A kvantitatív real-time PCR-ek SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, US) - mely egy dupla szálú fluoreszcens DNS specifikus festék - segítségével készültek a gyártó ajánlásai alapján. A vizsgálatokban szereplő minden gén esetében három parallel mérést végeztem, mely során detektáltam a fluoreszcens emissziót, majd a GenEx (MultiD, SE) szoftver segítségével kalkuláltam a relatív expressziókat.

2.6.4. Proliferációs assay

Az ősivarsejtek osztódóképességét és az osztódás sebességét proliferációs assay segítségével vizsgáltam. Az ugyanahhoz a fajtákhoz tartozó sejtvonalakat egy kísérlet keretében mértem, minden vonalat egyedileg, három párhuzamos mintát alkalmazva. A mérést három napon keresztül minden nap ugyanabban az időpontban végeztem. Először minden sejtvonal esetében sejtszámolást végeztem (Arthur^{TM} Cell Counter, Nanoentek, AT1000), majd kiosztottam a sejteket 5000 sejt/ well sűrűségben 96-lyukú tenyésztőedénybe. Minden nap a mérést megelőzően 4 órán át, 38°C-on inkubáltam a sejteket CCK-8 (Sigma-Aldrich, 96992) reagenssel, 100 µl médiumhoz 10 µl CCK-8 reagenst adva. A CCK-8 reagens élénk narancssárga színváltozással reagál az élő sejtek jelentétére, vagyis azok által termelt anyagcsere termékre, annak koncentrációját jelezve ezzel. (A narancssárga szín egy formazán festék, mely a WST-8 vegyület bioredukciója által keletkezik egy elektron transzport mediátor (1-Methoxy PMS) jelenlétében.) A keletkező szín intenzitása egyenesen arányos az élő sejtek számával, így az abszorbancia mérésével a sejtszám változásban bekövetkező változás nyomon követhető lesz. A CCK-8 abszorbancia mérése egy CLARIOstar Plus Microplate Reader (BMG Labtech, Germany) készülék segítségével történt. Az így kapott abszorbancia értékekből kiszámoltam minden sejtvonal duplikációs idejét (doubling time, DT), amely a sejtszám megduplázódáshoz szükséges napok száma. A DT értékek kalkulációjához a következő összefüggést használtam: $DT = d * \log(2) / \log(A_t) - \log(A_0)$, ahol d: mérések között eltelt napok száma, A_t: abszorbancia a harmadik napon, A_0: abszorbancia az első napon (Kong et al., 2018).

2.6.5. Mikroszatellit markerek vizsgálata

A sejtvonalakból származó DNS minták koncentrációját NanoDrop spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific USA) segítségével mértem, 5 ng/µl töménységűre hígítottam, majd további felhasználásig -20°C–on tároltam.

Az általam használt 17 mikroszatellit marker (6. táblázat) az AVIANDIV projektből került kiválasztásra (https://aviandiv.fli.de/), hiszen korábbi információinkat a fajtákról szintén ezen markerek segítségével kapták kollégáim. A vizsgálat során úgynevezett farkas primereket használtam (Blacket *et al*. 2012). Ennek lényege, hogy nem közvetlenül jelölt primerekkel dolgoztam, hanem azok forward szekvenciáinak 5' vége elé különböző, vagy

azonos szekvenciákat, de eltérő fluoreszcens jelöléssel raktam (WELL-RED festékek: D2, D3, D4). Így a megfelelő optimalizálással különböző marker szetteket alakítottam ki a PCR reakciókon belüli multiplexálással (7 multiplex, 1 szimplex PCR) és/vagy a PCR termékek poolozásával (I-MCW0206; B-F, H, A-D; C) a fragmens analízis során, vagyis egyidejűleg több markerrel végeztem el a genotipizálást.

A PCR termékek detektálása kapilláris gélelektroforézissel, automata DNS szekvenátor használatával történt (GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System, Beckman Coulter, CA, USA), a gyártó leírása alapján. Az allélméretek meghatározásához 400 bp hosszúságú allél létrát használtunk (400 bp size standard). A kapott eredményeket a GenomeLab Genetic Analysis System program segítségével (Beckman Coulter, Inc. 4300 North Harbor Boulevard, Fullerton, CA 92834-3100) mintánként értékeltem. A populáción belüli beltenyésztettségi értéket (F_{IS}) és annak szignifikanciáját az FSTAT program (Goudet, 2001) használatával határoztam meg.

2.7. Ősivarsejt vonalak jellemzése *in vivo*

A tenyésztett ősivarsejteket *in vivo* jellemzésnek is alávetettem, mely során célom a sejtek megfelelő működésének és vándorlási képességének vizsgálata volt fluoreszcensen jelölt sejtek segítségével.

2.7.1. A mélyhűtött/felolvasztott sejtek fluoreszcens jelölése

A tenyészetben fenntartott ősivarsejteket egy *in vivo* sejtfelületi festékkel jelöltem, mely fluoreszcens tulajdonságainak köszönhetően könnyen nyomon követhető az embrióban. Az ősivarsejteket centrifugálással választottam el a tenyésztő médiumtól, majd egy steril 1x PBS-es mosást követően alkalmaztam a piros (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker, Sigma Aldrich, MIDI26-1KT), illetve zöld (PKH67 Green Fluorescent Cell Linker, Sigma Aldrich, MIDI67-1KT) festékeket a gyártó útmutatását követve. A frissen jelölt sejtek fluoreszcenciáját konfokális mikroszkóppal (Leica TCS SP8, Leica Ltd., Germany) ellenőriztem, majd visszahelyeztem őket CO_2 termosztátba későbbi felhasználásig.

2.7.2. A fluoreszcensen jelölt sejtek recipiens embrióba történő bejuttatása injektálással

A fluoreszcensen jelölt ősivarsejteket összegyűjtöttem, majd megszámoltam (Arthur™ Cell Counter, Nanoentek, AT1000). Centrifugálást követően DMEM és steril víz 2:1 arányú keverékében szuszpendáltam fel (a teljes ősivarsejt tenyésztő médium egyes komponensei hatással lehetnek az embrió fejlődésre, ezért egyszerűsített médiumot használtam) a sejt pelletet.

A recipiens tojások héján alkoholos fertőtlenítést követően 1 cm átmérőjű lyukat nyitottam, majd 1 µl-t injektáltam (~3-5000 ősivarsejt) az előkészített sejtszuszpenzióból a 2,5 napos recipiens embriók szívébe. Az injektálás egy húzott üvegkapilláris segítségével történt, melynek átmérője a hegyes végén ~20 µm volt. Az injektálást követően ~50 µl steril, előmelegített 1x PBS-t csöppentettem az embrióra, majd 2 réteg steril laboratóriumi

parafilm segítségével lezártam a nyílást és egyedi jelölést követően a tojást visszahelyeztem a keltetőbe.

2.7.3. Az injektált sejtek ivarszervbe történő integrációjának ellenőrzése

Az injektálást követően, 6 napos korban a tojásokat felbontottam, majd az embriók ivarszerveit kiboncoltam. Az ivarszerveket steril 1x PBS-ben mostam, majd 4 %-os PFA-ban fixáltam egy éjszakán keresztül. A fixált ivarszervekben fluoreszcens sztereo-mikroszkóp (Leica M205 FCA, Leica Ltd., Germany) segítségével azonosítottam az injektált sejteket, melyekről fotódokumentációt készítettem. Minden esetben rögzítettem az elhalt embriók számát és ha lehetett, a pusztulás okát is.

2.8. Ősivarsejt vonalak mélyhűtése

Az alapított ősivarsejt vonalak fagyasztását frissen összemért ősivarsejt fagyasztó médiummal végeztem, mely a következő komponenseket tartalmazta: DMEM (Gibco, 21068-028) és steril víz (Gibco, 15230-089) 2:1 arányban, továbbá 8 % DMSO (SIGMA, D2650), 10 % házityúk szérum (Sigma Aldrich, C5405) és 0,75% 20 mM-os CaCl2 (Sigma Aldrich, C4901). Az ősivarsejteket óvatosan szuszpendáltam a tenyésztő edény aljáról, majd 1,5 ml Eppendorf csőbe pipettáztam át. A centrifugálást (1000 x g, 3 perc) követően a felülúszót eltávolítottam, majd 250 μl DMSO mentes ősivarsejt fagyasztó médiumban szuszpendáltam a sejteket és átmértem feliratozott fagyasztó csőbe. Ehhez 250 μl ősivarsejt fagyasztó médiumot adtam lassan, cseppenként, majd a csövet -70°C-os mélyhűtőbe helyeztem. Hosszú távú tárolás esetén egy éjszaka után a mintákat -150°C-ra, vagy folyékony nitrogénbe helyeztem át. Minden sejtvonal esetében leszámoltam a mélyhűtésre kerülő sejtek számát, illetve meghatároztam az élő és elpusztult sejtek arányt a fagyasztást megelőzően.

2.9. Ősivarsejt vonalak felolvasztása

Az ősivarsejtek felolvasztásához 37°C-os vízfürdőt használtam, majd a fagyasztó cső teljes tartalmát 2 ml ősivarsejt tenyésztő médiumba pipettáztam át. Centrifugálást (1000 x g, 3 perc) követően a felülúszót leszívtam, majd friss ősivarsejt tenyésztő médiummal való szuszpendálás után a sejteket tenyésztő edénybe helyeztem ki és tovább tenyésztettem.

2.10. Génbank létrehozása ősivarsejtek felhasználásával

A fajták embrióiból létrehozott egyedi ősivarsejt vonalakat kezdetben 48-lyukú, majd 24-lyukú tenyésztő edényben tartottam fent. A sejtek osztódását követve, amikor kitöltötték a rendelkezésre álló felületet, megfeleztem őket, így alakítva ki minden sejtvonalból hat párhuzamos tenyészetet. Az így létrehozott sejtmennyiséget hat párhuzamos, 2 ml-es fagyasztócsőben mélyhűtöttem a 4.8. fejezetben leírtaknak megfelelően. Az így kapott mélyhűtött ősivarsejt tenyészetekből sejtvonalanként három fagyasztócsőnyi mennyiséget a

Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetének (NBGK HGI) Génbankjában helyeztem el folyékony nitrogénben, míg három csövet a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetében (NAIK MBK) erre a célra üzembe helyezett -150°C-os mélyhűtőjében helyeztem el. A szeparált tárolás, biztonsági intézkedésként szolgál, ha esetleg valamelyik intézetben nem várt esemény következne be. Az összes alapított sejtvonalból megfelelő lízis pufferbe sejtszuszpenziót is legyűjtöttem, későbbi RNS és DNS izolálás céljából. Ezeket a csöveket szintén a NAIK MBK -150°C-os mélyhűtőjében tároljuk.

2.11. A donor fajta visszanyerése ősivarsejtek injektálásával és keresztezéssel

Célom annak bizonyítása volt, hogy az egyedi embriókból alapított ősivarsejt vonalak *in vitro* fenntartást és mélyhűtést követően is alkalmasak recipiens embriók ivarszervébe beépülni, ott az állat kikelését és ivarérését követően ivarérett ivarsejtekké differenciálódni, végül pedig az ivarszervi kiméra egyedek keresztezésével donor eredetű utódot létrehozni. Ehhez a Fogolyszínű magyar fajtát választottam donor fajtának és a Fekete erdélyi kopasznyakú fajtát recipiensnek.

Ezt a döntést arra alapoztam, hogy a fogolyszín kialakulása recesszív tulajdonság, míg a kopasznyakúságé domináns. Így, ha kopasznyakú recipiensbe Fogolyszínű magyar ősivarsejteket ültetünk be, majd az ivarérés után Fogolyszínű magyar egyedekkel keresztezzük vissza a recipienst, tiszta fedettnyakú Fogolyszínű magyar csibét csak abban az esetben kapunk, ha az egyedet kialakító mindkét ivarsejt a Fogolyszínű magyar fajtától származik. Mivel minden alapított Fogolyszínű magyar embrióból alapított sejtvonal esetében megtörtént a mikroszatellit marker analízis, a kapott utódokat ez alapján is ellenőrizni tudtam.

2.11.1. Donor eredetű ősivarsejtek injektálása recipiens embriókba

A recipiens embrióba történő injektálás menete alapvetően megegyezett az 2.7.2. fejezetben ismertetett protokollal, kivéve az alábbiakat: Ebben a kísérletben nem volt szükség a sejtek fluoreszcens jelölésére, hiszen az injektált egyedek kikeltetése és felnevelése volt a célom. Mivel az injektálás pillanatában nem ismertem a recipiens embriók ivarát, így egy-egy előzetesen véletlenszerűen kiválasztott Fogolyszínű magyar hím- és nőivarú sejtvonalat 1:1 arányban keverve injektáltam minden Fekete erdélyi kopasznyakú recipiens embrióba. Ezzel a módszerrel növelve a sikeres beépülés lehetőségét és optimalizálva a szükséges injektálások számát.

2.11.2. Recipiens embriók keltetése, az embrionális fejlődés ellenőrzése

A recipiens tojások keltetése egy Midi F500S keltetőgépben (PL Maschine Kft.) történt 37,8°C-os hőmérsékleten 60-65 %-os páratartalom mellett. Az injektálást követően a tojások visszakerültek a keltetőbe kikelésig. Az embriók fejlődését a tojások lámpázásával végeztem először a keltetés 10. napján. A lámpázás során eltávolított tojásokat felbontottam és rögzítettem az embrió pusztulásának okát.

2.11.3. A kapott ivarszervi kiméra egyedek tesztkeresztezése

A tesztpárosításhoz az általam keltetett és felnevelt potenciálisan ivarszervi kiméra Fekete erdélyi kopasznyakú tojókat és Fekete erdélyi kopasznyakú kakasokat egyedi ketreces tartásban helyeztem el. Az állatok granulált tojótápot fogyasztottak, önitatókból ittak *ad libitum*. A megvilágítás, természetes fény mellett, mesterséges kiegészítéssel történt, napi 16 óra időtartamban. A tojásokat naponta kétszer gyűjtöttem, egyedileg jelöltem, és a felhasználásig tojástároló helyiségben helyeztem el őket.

A tesztpárosításokhoz a Fogolyszínű magyar fajtát használtam, amely egyedeket szintén egyedi ketrecekben helyeztem el. A vélelmezett ivarszervi kiméra Fekete erdélyi kopasznyakú kakasok spermájával egyedenként két Fogolyszínű magyar tyúkot termékenyítettünk. A Fekete erdélyi kopasznyakú tyúkokat 5 darab Fogolyszínű magyar kakas kevert spermájával termékenyítettük.

2.11.4. Ondóvétel és mesterséges termékenyítés

A kakasoktól az ondóvétel dorso-abdominális masszázs-technikával történt (Burrows and Quinn, 1935) az első héten heti 3 alkalommal, az ezt követő hetekben heti két alkalommal két hónapon keresztül, a kéthetes trenírozási időszakot követően. A tojók mesterséges termékenyítése a Bakst és Dymond által leírtak szerint történt (Bakst and Dymond, 2013).

2.12. Statisztikai módszerek

Az adatok elemzéséhez az Excel (MS Office), RStudio (Version 1.3.959), R (R-4.0.2), a GeneEx 6.0 valamint a Microsatellite Toolkit (PARK S. D. E. 2001) szoftvereket használtam. A szigifikancia szinteket a következőek szerint határoztam meg: $*p<0,05$, $**p<0,01$, és $***p<0,001$. A duplikációs idő (DT) adatok esetében a csoportokat Mann-Whitney tesztek segítségével hasonlítottam össze. A qPCR-es vizsgálatok esetében a target gén expressziójának változását a belső kontroll gén referencia értékéhez képest a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formulával számoltam, melyben $\Delta Ct = Ct$ (target gén) $- Ct$ (belső kontroll), valamint $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (teszt minta) $- \Delta Ct$ (kontroll minta).

3. EREDMÉNYEK

3.1. Őshonos magyar tyúkfajták ősivarsejt vonalainak alapítása

Hat őshonos magyar fajtából alapítottam sikeresen ősivarsejt vonalakat. Minden fajta esetében egyedi tenyészeteket hoztam létre, vagyis az adott tenyészet egy embrió vérében található ősivarsejtekből származott. Az alapítási arányt az összes vérvételre vetített sikeres sejtvonal alapítások számával határoztam meg. Összesen 396 vérvételből 166 sikeres vonal alapítás történt, mely a hat fajtára 42,0 %-os átlagos alapítási aránynak felel meg. Három fajta esetében az alapítási arány az átlagosnál magasabb volt: a Sárga magyar – 50,0 %, a Fehér magyar – 47,6 % és a Kendermagos magyar – 48,7 %. A Fekete- és Kendermagos erdélyi kopasznyakú fajtáknál az átlaghoz közeli 39,7 % és 37,5 %-os értékeket kaptam, míg a Fogolyszínű magyar fajta alapítási aránya bizonyult a legalacsonyabbnak 28,4 %-kal (1. táblázat). A sejtvonal alapításnál a cél minimum 20 egyedi embrióból származó stabil sejtvonal kialakítása volt, melyet sikerült teljesítenem. Stabil sejtvonalnak tekintettem minden olyan tenyészetet, melyben 3 hét, *in vitro* tenyésztést követően 1,0 x 10^5 vagy több ősivarsejt volt található. A vérvételek számát az adott időszakban hozzáférhető tojások mennyisége, azok termékenysége és a kísérlet napján megfelelő stádiumban lévő embriók száma határozta meg.

1. táblázat. Magyar őshonos fajtákból alapított ősivarsejt vonalak és az eltárolt génbanki minták száma. Az alapítási arány az összes vérvételre vonatkoztatott sikeres sejtvonal alapítások száma százalékban.

Magyar őshonos fajták	Vérvétel (db)	Alapított sejtvonal (db)	Hímivarú sejtvonal (db)	Nőivarú sejtvonal (db)	Alapítási arány (%)	Génbanki minták (db)
Sárga magyar	80	40	29 (72,5%)	11 (27,5%)	50,0%	**240**
Fehér magyar	42	20	14 (70,0%)	6 (30,0%)	47,6%	**120**
Kendermagos magyar	76	37	27 (73,0%)	10 (27,0%)	48,7%	**222**
Fogolyszínű magyar	74	21	17 (81%)	4 (19,0%)	28,4%	**126**
Fekete erdélyi kopasznyakú	68	27	23 (85,2%)	4 (14,8%)	39,7%	**162**
Kendermagos erdélyi kopasznyakú	56	21	11 (52,4%)	10 (47,6%)	37,5%	**126**
Átlag	66,0	27,7	20,2	7,5	**42,0%**	166,0
Összesen	396	166	121 (72,3%)	45 (27,7%)	-	**996**

3.2. Az alapított ősivarsejt vonalak *in vitro* jellemzése

3.2.1. Ivar meghatározás

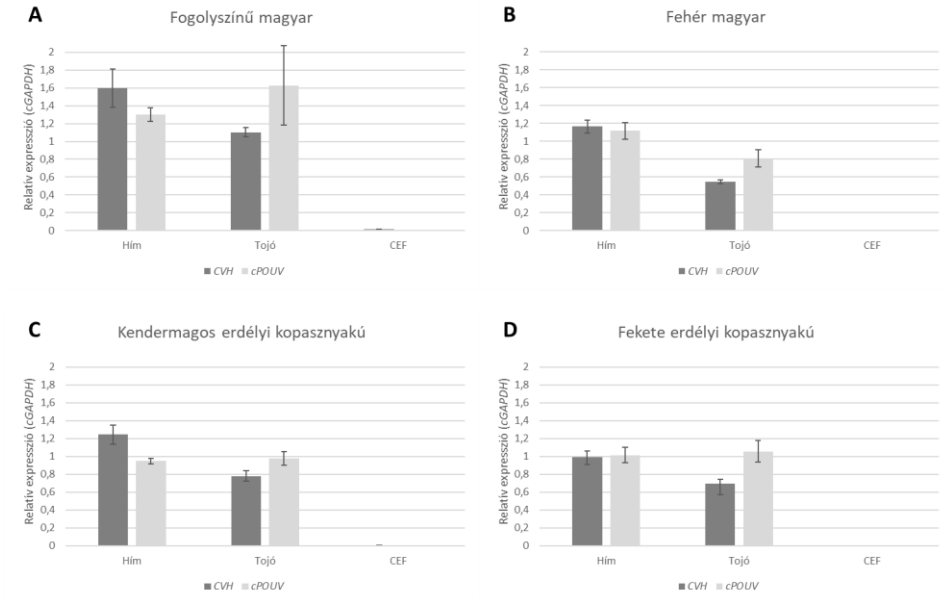
Minden létrehozott ősivarsejt vonal esetében elvégeztem az ivarmeghatározást. Ehhez a vérvétel során gyűjtött embrionális szövetmintákat használtam. A 166 stabil sejtvonalból 121 (72,3 %) hímivarú és 45 (27,7 %) nőivarú volt (1. táblázat). Az 50-50 %-os elméleti arányt a Kendermagos erdélyi kopasznyakú fajta közelítette meg, ahol a sejtvonalak 47,6 % nőivarú volt. Az ivararány a Fekete erdélyi kopasznyakú fajtánál volt a leginkább eltolódva: a nőivarú egyedek aránya csak 14,8 % volt. A nőivarú vonalak arányából arra következtethetünk, hogy az alkalmazott médium, habár alkalmas a nőivarú sejtvonalak tenyésztésére, még nem tekinthető mindkét ivar számára ugyanolyan hatékonynak.

3.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat

Immunhisztokémiai vizsgálatot 6 fajta esetében végeztem. Minden fajta esetében egy hím- és egy nőivarú tenyészetet választottam. Minden vizsgált vonal ősivarsejt (DAZL, CVH) és őssejt (SSEA-1) specifikus festődést mutatott. A DAZL és a CVH a citoplazmában található, míg az SSEA-1 egy sejtfelszíni antigén, így az ősivarsejtek pozitív festődést mutattak mind a citoplazmában, mind a sejtmembránban. A sejtmagfestést TO-PRO®-3-mal végeztem.

3.2.3. Génexpressziós vizsgálat

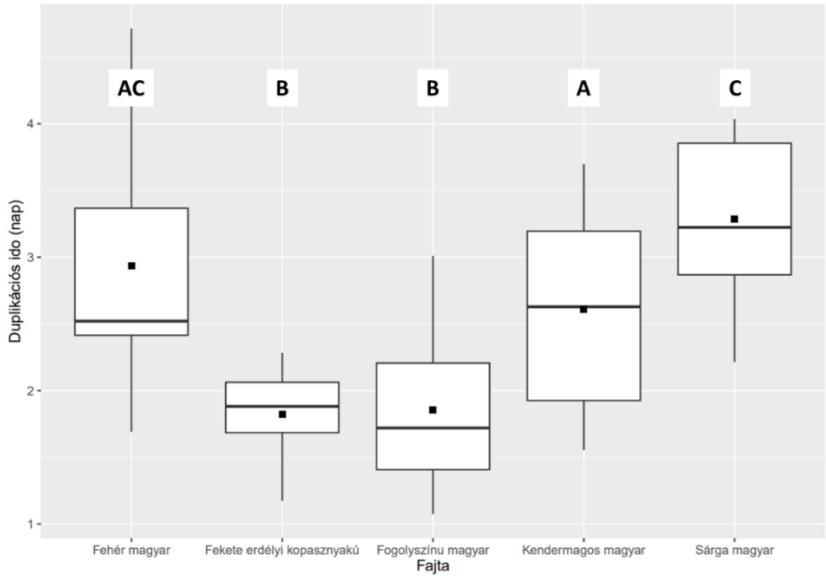
Az ősivarsejt- és őssejt specifikus gének expressziójának vizsgálatát négy tyúkfajta két hímivarú és két nőivarú PGC vonala esetében végeztem el (Fogolyszínű magyar, Fehér magyar, Kendermagos erdélyi kopasznyakú, Fekete erdélyi kopasznyakú). Az ősivarsejt specifikus *CVH* és az őssejtekre jellemző *cPOUV* gének mind a négy vizsgált fajtában, minden egyes vizsgált sejtvonal esetében, magas expressziós értéket mutattak. Az expressziós értékek összehasonlításakor háztartási génként a *cGAPDH-t* használtam, ehhez képest számoltam ki a relatív expressziós értékeket. Házityúk embrionális fibroblaszt sejteket (CEF) használtam kontroll mintaként, melyekben a vizsgált ősivarsejt és őssejt specifikus gének expressziója (a várt módon) nem volt számottevő. Az eredményeket az 1. ábrán foglaltam össze. Az expressziós értékeket az azonos tyúkfajták hím-, illetve nőivarú sejtvonalaiban mért relatív expressziós értékek átlagaként adtam meg.



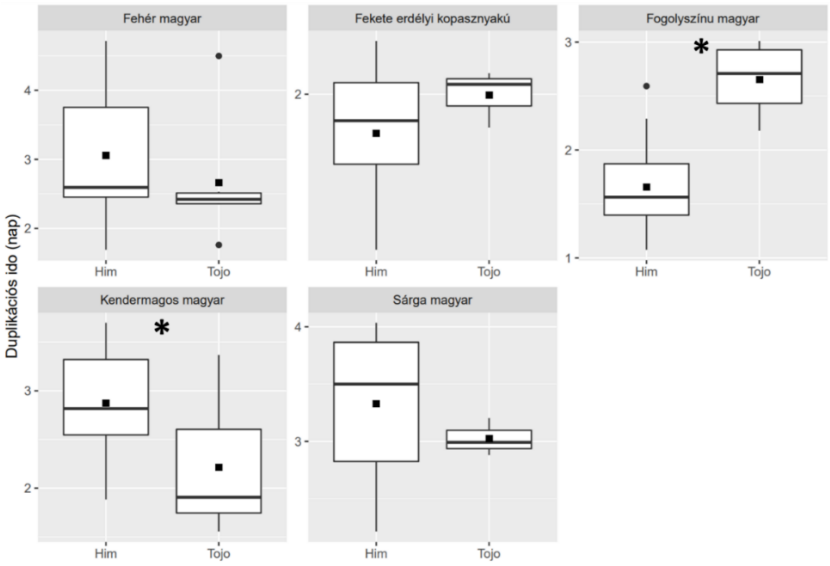
1. ábra. Ősivarsejt- és őssejt specifikus gének expressziójának vizsgálata őshonos magyar házityúk fajták ősivarsejt vonalaiban. Az ábrán két magyar és két erdélyi kopasznyakú fajta esetében látható a *CVH* és *cPOUV* gének expressziója a *cGAPDH* háztartási génhez viszonyítva. Az expressziós értékeket az azonos tyúkfajták hím-, illetve nőivarú sejtvonalaiban mért relatív expressziós értékek átlagaként adtam meg. Kontroll mintaként házityúk embrionális fibroblaszt sejteket (CEF) használtam., **A:** Fogolyszínű magyar fajta, **B:** Fehér magyar fajta, **C:** Kendermagos erdélyi kopasznyakú fajta, **D:** Fekete erdélyi kopasznyakú fajta.

3.2.4. Sejtosztódás vizsgálata

A sejtosztódás sebességének vizsgálata fontos tényező az ősivarsejt vonalak génbanki mintáinak létrehozása során. A gyors osztódási sebesség, ebből következően a rövid duplikációs idő (doubling time, DT) a PG sejtek jellemző tulajdonsága. A gyors osztódási sebesség megkönnyíti a sejtekkel való munkát, így alapvetően kívánatos tulajdonság, azonban, amennyiben valamelyik vonal esetében extrém magas proliferációs rátát találunk, az a vonal genetikai transzformációjára utal, így génbanki megőrzésre nem alkalmas. Azt is fontos megemlíteni, hogy a proliferációs rátákban talált nagy különbség a genetikai diverzitásra utal, ebből következően a génbanki megőrzésből csak abban az esetben zártam ki ősivarsejt vonalat az osztódás sebessége alapján, ha annak lassú osztódása miatt nem lehetett elegendő számú sejtet gyűjteni az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokhoz, illetve a mélyhűtéshez szükséges minimális sejtszám összegyűjtéséhez. Általánosságban elmondható, hogy az összes vizsgált ősivarsejt vonal elfogadható sejtosztódási rátát mutatott, amit az abszorbancia értékekből számolt duplikációs idővel (doubling time, DT) jellemeztem. A vizsgált vonalak esetében a DT értékek alacsonynak adódtak, így a tenyészetek megfeleltek a dolgozatban célul kitűzött génbanki törekvéseknek. Az összes fajta adatait elemezve nem találtam szignifikáns különbséget a hím és tojó vonalak között. A fajtákat egymással összehasonlítva szignifikáns eltérést kaptam 10-ből 7-esetben (2. ábra). Vizsgáltam továbbá a fajtákon belül a hím és tojó vonalak közötti különbséget, mely során az 5 fajtából 2-nél (Fogolyszínű és Kendermagos magyar) találtam szignifikáns különbséget (3. ábra).



2. ábra. A duplikációs idő (DT) értékek fajtánként ábrázolva. A fajtákat egymással összehasonlítva szignifikáns eltérést kaptam 10-ből 7-esetben (8. táblázat). A Mann-Whitney teszt eredményei alapján a betűk különbözősége szignifikáns különbséget jelent, míg az azonos betűvel jelölt csoportok között statisztikailag kimutatható különbség nincs. A boxplot-okon a fekete négyzet jelöli az átlagot, a középső vonal a mediánt, a doboz határok az alsó és felső kvartilist.



3. ábra. Duplikációs idő (DT) értékek fajtánként és ivaronként ábrázolva. Az ivarokat egymással összehasonlítva szignifikáns eltérést kaptam 5-ből 2-esetben (8. táblázat). A Mann-Whitney teszt eredményei alapján csillaggal jelöltem a szignifikáns különbségeket. A boxplot-okon a fekete négyzet jelöli az átlagot, a középső vonal a mediánt, a doboz határok az alsó és felső kvartilist.

3.2.5. Mikroszatellit markerek vizsgálata

A munka célja annak megállapítása volt, hogy az alapított Fogolyszínű magyar ősivarsejt vonalak mennyire jól reprezentálják ezt a fajtát. Ehhez 21 ősivarsejt vonalat használtam, és hasonlítottam össze 30 (NBGK HGI állományából származó) Fogolyszínű magyar mintával, ugyanazon 17 mikroszatellit marker alapján.

Az általános diverzitás mutatókat (átlag allélszám, allélgyakoriság, várt és tényleges heterozigozitás) figyelembe véve elmondható, hogy a sejtvonalak jól reprezentálják a Fogolyszínű magyar tyúkfajtát (2. táblázat). Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy több marker esetében megfigyeltem egy-egy allélt, mely vagy csak az egyik, vagy a másik populációban volt megtalálható. Ennek oka lehet az, hogy összesen mintegy 51 mintát vizsgáltam meg, így a markerek és minták számának növelésével nagy valószínűséggel megtaláltam volna ezeket a kiugró, jelenleg „ritka" allélnak vélt fragmenteket mindkét állományban. Szignifikáns eltérést találtam a kontroll állomány várt és tényleges heterozigozitása között (F_{IS}: populáción belüli beltenyésztettségi érték). A sejtvonalak esetében szignifikáns eltérés nem volt kimutatható.

2. táblázat. Mikroszatellit markerek vizsgálata során használt általános diverzitás mutatók. (MNA: mean number of alleles = átlag allélszámok, H_E: expected heterozigozity = várt heterozigozitás, H_O: observed heterozigozity = tényleges heterozigozitás, SD: standard deviation = szórás, F_{IS}: populáción belüli beltenyésztettségi érték (***P<0.001))

Populáció	MNA±SD	H_E±SD	H_O±SD	F_{IS}
Alapított ősivarsejt vonalak	3,59±2,00	0,52±0,05	0,50±0,03	0,04
Kontroll állomány mintái	3,76±1,44	0,52±0,05	0,43±0,02	0,18***

3.3. Az alapított ősivarsejt vonalak *in vivo* jellemzése

3.3.1. Fluoreszcensen jelölt donor ősivarsejtek integrációjának vizsgálata a recipiens embrióban

A sejtvonalakat egy *in vivo*, funkcionalitást vizsgáló tesztnek is alávetettem. A recipiens embrión belüli vándorlási képességet vizsgáló kísérleteket öt magyar őshonos fajtán végeztem el. Minden fajta esetében véletlenszerűen választottam egy hím és egy tojó sejtvonalat a teszthez. Összesen 118 injektálást végeztem fluoreszcensen jelölt donor ősivarsejtekkel, melyből 69 (58,5%) esetben élt túl a recipiens embrió. A gonádok elemzése során 60 embrió esetében volt kimutatható a donor eredetű sejtek beépülése, mely 87%-os átlagos beépülési aránynak felel meg (3. táblázat). A Sárga magyar, Fehér magyar és Fekete erdélyi kopasznyakú fajták esetén minden, a manipulációt túlélt embrió pozitívnak bizonyult, míg a Fogolyszínű és Kendermagos magyar fajták esetében 76,2 és 77,8 % beépülési arányt mértem.

3. táblázat. Az alapított ősivarsejt vonalak vándorlási képességének vizsgálata a recipiens embriókban. A beépülési arányt az injektálást túlélt embriók számához viszonyítva adtam meg.

Magyar őshonos fajták	Injektálások száma (db)	Élő embriók száma (db)	Kimérák száma (db)	Kimérák aránya
Sárga magyar	**20**	**13 (65,0%)**	**13**	**100,0%**
Fehér magyar	**15**	**8 (53,3%)**	**8**	**100,0%**
Fogolyszínű magyar	**32**	**21 (65,6%)**	**16**	**76,2%**
Fekete erdélyi kopasznyakú	**19**	**9 (47,4%)**	**9**	**100,0%**
Kendermagos erdélyi kopasznyakú	**32**	**18 (56,3%)**	**14**	**77,8%**
Összesen (db)	**118**	**69 (58,5%)**	**60 (87,0%)**	**-**

3.4. Génbank létrehozása az alapított ősivarsejt vonalakból

Az egyedi embriókból származó stabil ősivarsejt vonalakat mélyhűtöttem. Minden fajta esetében az összes alapított vonalat bevontam a génbanki megőrzésbe. Minden ősivarsejt vonal felszaporítását addig végeztem, míg 6 x (5 x 10^4) (6 párhuzamos fagyasztócsőre elegendő) sejtet elő nem állítottam. A génbank földrajzilag két különböző helyen, a NBGK HGI és a NAIK MBK létesítményiben került kialakításra. A HGI-ben folyékony nitrogénben, míg az MBK-ban egy -150°C-os mélyhűtőben találhatóak a minták, intézetenként, sejtvonalanként 3-3 fagyasztó csőnyi sejt. A hat fajtából összesen 972 génbanki minta került megőrzésre. A mintaszámokat az 1. táblázat tartalmazza fajtákra lebontva.

3.5. A donor fajta visszanyerése ősivarsejtek injektálásával és keresztezéssel

3.5.1. Donor eredetű ősivarsejtek injektálása

Öt kísérlet során összesen 52 Fekete erdélyi kopasznyakú recipiens embrióba injektáltam mélyhűtött, majd felolvasztott Fogolyszínű magyar donor ősivarsejteket. Az injektáláshoz 1:1 arányban használtam egy hím- (FS101) és egy nőivarú (FS111) tenyészet sejtjeit azért, hogy a recipiens embrió nemétől függetlenül minél nagyobb eséllyel kapjak ivarszervi kiméra állatokat. Az injektált embriók közül összesen 29 (55,8 %) kelt ki, melyekből 24 (82,8 %) érte el az ivarérett kort (13 kakas és 11 tyúk).

3.5.2. Feltételezett ivarszervi kiméra egyedek tesztkeresztezése

A 24 Fekete erdélyi kopasznyakú feltételezett ivarszervi kiméra egyedet a donor fajtával kereszteztem. A tesztkeresztezés során 795 darab tojás került keltetőgépbe 9 héten keresztül. A 340 kikelt utódból 14 (4,1 %) bizonyult tiszta fedett nyakú fogolyszínűnek. A 14 (7 kakas és 7 tyúk) kikelt Fogolyszínű magyar utód 4 (3 kakas és 1 tyúk) injektált Fekete erdélyi kopasznyakú egyedtől származott, így a feltételezett kimérák 16,6 %-ról sikerült bizonyítani, hogy valóban ivarszervi kimérák voltak. A tesztkeresztezés bizonyította, hogy a génbankban tárolt (*in vitro* tenyésztett, mélyhűtött, majd felolvasztott) ősivarsejtek segítségével a donor fajta mindkét nemben sikeresen visszanyerhető.

3.6. Javasolt protokoll házityúk ősivarsejt vonalak létrehozásához és tárolásához génbankok számára

A magyar őshonos házityúk fajták ősivarsejt alapú génbankjának létrehozása mellett célom volt egy olyan általános protokoll kidolgozása, amely kellőképpen egyszerű (ezáltal kevésbé jól finanszírozott laborok/kutatóintézetek is alkalmazhatják), de általa jó minőségű génbanki ősivarsejt minták állíthatók elő. A témában eddig közzétett módszereket áttekintve azt tapasztaltam, hogy nincs egy általánosan elfogadott eljárás, mely alapján a terület kutatói megítélhetik az ősivarsejt vonalak minőségét. A minőség márpedig fontos, tekintve, hogy a jövőben az előállított és tárolt sejtvonalakból donor eredetű egyedek előállítása a cél. Az eddigi kutatásokat és saját tapasztalataimat alapul véve az alábbiakban ajánlok egy protokollt, melyet követve nagy bizonyossággal állíthatjuk, hogy a génbankba szánt sejtvonalak megfelelnek az ősivarsejtekre jellemző *in vitro* és *in vivo* sajátosságoknak, illetve alkalmasak a későbbi felhasználásra a génmegőrzésben. A protokoll tartalmazza azt a kritériumrendszert, melynek véleményem szerint a sejtvonalaknak meg kell felelni. A javasolt lépéseket és kritériumokat az 3. táblázat foglalja össze. Az alkalmazandó technikák részletes leírása megtalálható a dolgozat 2. fejezetében.

3. táblázat. Javasolt protokoll házityúk ősivarsejt vonalak létrehozásához és tárolásához génbankok számára.

	Lépések	Kritérium
1	Vérvétel donor állomány embrióiból	Min. 50 db vérvétel
2	Ősivarsejt vonalak alapítása táplálósejt mentes környezetben	Min. 1,0 x 10^5 ősivarsejt 3 hét alatt / sejtvonal
3	Ősivarsejt vonalak ivarmeghatározása	Min. 4-6 db nőivarú sejtvonal
5	Ősivarsejt vonalak immunhisztokémiai festése	CVH / DAZL és SSEA-1 pozitív sejtek
6	Ősivarsejt vonalak génexpressziós vizsgálata	*CVH és cPOUV* expresszió
7	Ősivarsejt vonalak vándorlási képességének vizsgálata	Integrálódás a recipiens embriók ivarszervébe
8	Tesztelt ősivarsejt vonalak mélyhűtése	Min. 6 db fagyasztó cső, min. 5,0 x 10^4 sejt/cső

3.7. Új tudományos eredmények

1. Elvégeztem hat magyar őshonos házityúk fajtából (Fehér magyar, Sárga magyar, Kendermagos magyar, Fogolyszínű magyar, Fekete erdélyi kopasznyakú, Kendermagos erdélyi kopasznyakú) mindkét ivar esetében az ősivarsejtek izolálását és hosszú távú fenntartását sejttenyészetben, valamint kialakítottam egy ősivarsejt alapú génbankot, mely mind a hat fajta mintáit tartalmazza.
2. Ivarszervi kimérákat hoztam létre öt magyar őshonos házityúk fajta (Fehér magyar, Sárga magyar, Fogolyszínű magyar, Fekete erdélyi kopasznyakú, Kendermagos erdélyi kopasznyakú) ősivarsejtjeinek felhasználásával.
3. Sikeresen visszanyertem a donor fajtát Fogolyszínű magyar házityúkból származó ősivarsejtek génbaki mintáiból.
4. Kidolgoztam egy általános protokollt és kritériumrendszert a házityúk ősivarsejt vonalak alapítására, minőségbiztosítására és génbanki megőrzésére.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A világon nyilvántartott baromfi fajták száma 3689 (ebből 2222 őshonos), melyek 28 %-a veszélyeztetett, sebezhető vagy már kihalt (FAO, DAD-IS, http://www.fao.org/3/CA0121EN/ca0121en.pdf). Ezekből az adatokból látható, hogy a baromfi fajták jelentős része valamilyen kockázati kategóriába sorolható. Így megfelelő védelmi stratégiákra és aktív cselekvésre van szükség, hogy a jelenleg negatív trend lassíthatóvá, majd a jövőben stabillá váljon. Az őshonos házityúk és egyéb baromfi fajták genetikai információjának megőrzése kiemelkedően fontos a mezőgazdasági biodiverzitás fenntartása szempontjából. Az így tárolt allél variációk (pl.: rezisztencia, stressz tűrés, előnyös termelési paraméterek stb.) alapanyagai lehetnek a jövő keresztezési stratégiáinak (Wang et al., 2017).

Az ősivarsejtek szélesebb körű kísérleti felhasználása 2012-ben kezdődött, amikor van der Lavoir és munkatársai először hoztak létre olyan tenyésztő oldatot, melyben a sejtek osztódása és fenntartása hosszú távon biztosított volt (Van De Lavoir et al., 2012). Ez alapján nem meglepő, hogy a FAO 2012-ben publikált állati eredetű genetikai minták kriokonzervációjával foglalkozó irányelvei (FAO Guidelines 2012) még csak elméleti szinten foglalkoznak az ősivarsejteken alapuló génmegőrzés lehetőségeivel. Ami meglepőbb, hogy az időközben eltelt években sem jelent meg a FAO részéről hivatalos ajánlás és általános protokoll a témában. Így munkám során célom a magyar őshonos házityúk fajták ősivarsejt alapú génbankjának létrehozásán túl egy olyan általánosan ajánlható protokoll volt, mellyel egyszerűen, de hatékonyan lehet házityúk ősivarsejteket izolálni, tenyészteni, mélyhűteni és tesztelni. A közelmúltban számos kutatócsoport ért el sikereket őshonos házityúk fajták ősivarsejtjeivel kapcsolatos vizsgálatokban, illetve többen hoztak létre őshonos egyedeket az ősivarsejtek injektálásán alapuló módszerrel (Nakamura et al., 2010; Rikimaru et al., 2011; Tonus et al., 2016; Wang et al., 2017; Yu et al., 2019).

Nakamura és munkatársai a Gifujidori őshonos japán fajta embrióiból vettek vért, melyből gradiens centrifugálással tisztították az ősivarsejteket. A tisztított sejteket ivarmeghatározás után hím- és nőivarú csoportokba osztották és további tenyésztés nélkül hat hónapig mélyhűtötték. A felolvasztott sejteket sikeresen injektálták vissza két recipiens White Leghorn fajta (24HS, ST) ivar azonos embrióiba. Mindkét recipiens vonal esetében keltek ki bizonyítottan ivarszervi kiméra egyedek, melyeket egymással keresztezve az ST fajta esetében donor eredetű utódokat is kaptak (6,0 %) (Nakamura et al., 2010).

Rikimaru és munkatársai a Hinai-dori őshonos japán fajta 6 napos embrionális ivarszerveiből izoláltak ősivarsejteket. Az ivarszerv szövet emésztése után mikrokapilláris segítségével egyenként gyűjtöttek össze 50-100 ősivarsejtet melyeket X-es stádiumú (E-G&K) embriók szubgerminális üregébe, illetve HH12-13 stádiumú embriók dorzális aortájába injektáltak. A X-es stádiumú embriók esetén alacsonyabb embrió túlélést tapasztaltak, mint az aortába történő injektálásnál (12,5 % vs. 80,0 %). A hímivarú feltételezett ivarszervi kiméra egyedeket tojó Hinai-dori egyedekkel visszakeresztezve csak az aortába injektált recipiens egyedekkel kaptak donor eredetű utódokat (8,1 %), melyeket a fenotípus vizsgálaton felül mikroszatellit marker analízis segítségével is visszaigazoltak (Rikimaru et al., 2011).

Tonus és munkatársai két őshonos belga fajtán (Walloon Herve és Ardennes) végeztek vizsgálatokat. A vért HH13-18 stádiumú embriókból gyűjtötték és fajtánként összekeverték, majd BRL (Buffalo Rat Liver) táplálósejt réteget tartalmazó tenyésztő rendszerben több, mint egy évig fenntartották. A sejtvonalak *in vitro* jellemzésére különböző ősivar- és őssejt specifikus markereket (*CVH, CDH, cDAZL, SOX2, cPOUV* és *NANOG*), illetve

immunfestést (anti-SSEA-1) alkalmaztak, továbbá sikeresen mélyhűtötték a kapott sejtvonalakat. A hosszú távú fenntartás és a nőivarú sejtek számára kevésbé optimális tápoldat összetételnek köszönhetően a sejtvonalaik csak hímivarú sejteket tartalmaztak (habár kezdetben kevert ivarú sejtekből indultak ki). A létrehozott sejtvonalak jelenlétét visszaigazolták recipiens embriók ivarszervében, de donor eredetű utódokat nem hoztak létre (Tonus et al., 2016).

Wang és munkatársai az őshonos kínai Guangxi sárga-tollú fajtából származó ősivarsejtek *in vitro* jellemzését és megőrzését tűzték ki célul. A kísérletek során az embriókból vett vérmintákat keverték, majd táplálósejteket (BRL) tartalmazó médiumban tenyésztették a sejteket. Összesen 3 stabil ősivarsejt tenyészetet kaptak, melyek hímivarúnak bizonyultak az ivarmeghatározás során. Sejtvonalaik átlagos duplikációs ideje (DT) 49 óra volt. Az alapított sejtvonalak *in vitro* vizsgálatát ősivarsejt-specifikus gének (*CVH, CDH, cDAZL, NANOG és cPOUV*) expressziójának ellenőrzésével és immunhisztokémiai festésekkel (anti-SSEA-1, anti-EMA-1) végezték. A sejtek vándorlóképességének vizsgálatához az ősivarsejteket egy GFP-t tartalmazó piggyBac transzpozon vektorral transzformálták. A jelölt sejteket recipiens embriókba injektálták, majd a sejtek jelenlétét sikeresen mutatták ki 7 napos embriókban, naposcsibékben, valamint ivarérett kakasok ondójában is. Donor eredetű utódokat nem hoztak létre.

Yu és munkatársai a kínai Meiling fajtával értek el sikereket. Ez a fajta nagy népszerűségnek örvend az ízletes húsa és kiváló adaptációs képességei miatt, azonban tiszta állományai veszélyben vannak, így szükséges a fajta genetikai megőrzése. A kutatók HH13-15 stádiumú embriókból vettek vért, majd az azonos ivarú mintákat keverték. A kevert vérből gradiens centrifugálás segítségével tisztították az ősivarsejteket, majd perjódsavas festéssel (PAS), anti-SSEA-1 immunhisztokémiával és a *cGAPDH, cDAZL, NANOG, cPOUV* gének expressziójának vizsgálatával igazolták az ősivarsejt jelleget. Ezt követően *in vivo* fluorescens festékkel jelölték az ősivarsejteket, majd recipiens embriók ivarszervében visszaigazolták a beépülést. Utolsó lépésként ivarszerv kimérákat hoztak létre, majd 4 ivarérett recipiens kakast kereszteztek donor fajtából származó tyúkokkal. A tesztkeresztezés során 12,6 % donor eredetű utódot kaptak.

A bemutatott vizsgálatokban legtöbbször nem sejtvonalakat használtak, csak ősivarsejteket. Ahol sejtvonalakat használtak fel, ott általában táplálósejt réteg segítségével tenyésztették a sejteket, vagy csak hímivarú sejtvonalakat tudtak fenntartani és felhasználni. Eddig csak Woodcock és munkatársai alkalmaztak táplálósejt mentes tenyésztési technikát és mindkét ivarból származó egyedi ősivarsejt vonalakat őshonos házityúk fajták esetében (Woodcock et al., 2019). Ők azonban recipiensként génmódosított egyedeket használtak fel, ami nagyban növeli a donor eredetű egyedek előállításának hatékonyságát, azonban az Európai Unió jelenlegi szabályozása mellett ennek széleskörű gyakorlati alkalmazása nem lehetséges.

A fent bemutatott ősivarsejtekkel kapcsolatos alap- és alkalmazott kutatás és a módszerek fejlesztése nagyrészt házityúk fajon zajlik, azonban az elmúlt években már történtek törekvések a vadmadár fajokon való alkalmazhatóság növelésére is.

Kang és munkatársai például 7 napos fácán (*Phasianus colchicus*) embriók ivarszerveiből izoláltak ősivarsejteket egy mágneses sejtválogató eljárás segítségével, majd 2,5 napos házityúk embriók keringésébe injektálták az így tisztított sejteket. A feltételezett ivarszerv kimérákat ivarérésig nevelték, majd a kakasok ondójával mesterséges termékenyítést végeztek fácán tojókon. A donor ősivarsejt eredetű utódok aránya 17,5 % volt (Seok et al., 2008). Ezt követően Tirawattanawanich és munkatársai hamvas fácán (*Lophura diardi*) és bankivatyúk (*Gallus gallus*) ősivarsejtek *in vitro* fenntartását tűzték ki célul táplálósejtek segítségével. Mindkét faj esetében japán fürj táplálósejteket alkalmaztak, segítségükkel 21 napon (hamvas fácán), illetve 3 hónapon (bankivatyúk) keresztül tudták tenyészetben tartani

és felszaporítani a gradiens centrifugálással tisztított ősivarsejteket. A sejtek minőségét perjódsav és anti-SSEA-1 festéssel igazolták vissza (Tirawattanawanich, 2012; Srihawong et al., 2016).

A galléros túzok (*Chlamydotis undulata*) állománya a világon az utóbbi 20 évben jelentősen csökkent, így ma a Vörös Listán a sebezhető kategóriában található. Wernery és munkatársai célul tűzték ki túzok egyedek előállítását az ősivarsejteken alapuló kiméra technológiával. Ez a vizsgálat jó példa arra, hogy a szükséges alapozó vizsgálatok után, hogyan lehet ősivarsejtekkel támogatni egy arra rászoruló vadon élő faj védelmi törekvéseit. A vizsgálat során hímivarú 8 napos túzok embriók ivarszerv szövetét gyűjtötték össze, majd a szövetből sejtszuszpenziót készítettek. Az ősivarsejteket is tartalmazó szuszpenziót hímivarú házityúk embriók keringésébe injektálták, majd kikeltették a tojásokat. Az injektált embriók ~25 %-a érte el az ivarérett kort, melyből 8 kakasról (5,7 %) bizonyították, hogy valóban ivarszerv kiméra. A kakasoktól gyűjtött spermát galléros túzok tojók mesterséges termékenyítésére használták fel, melyből 45 tojást kaptak, ezekből kettő volt termékeny és végül egy (2,2 %) egészséges hímivarú túzok fióka kelt ki. A vizsgálat a galléros túzok embriók feláldozásával járt, mely mindenképpen kerülendő egy Vörös Listás faj esetében, azonban rámutat, hogy vadon élő fajok esetén is lehetséges a módszer alkalmazása további fejlesztésekkel. Házityúk esetében számos vizsgálatban gyűjtöttek ősivarsejt izolálásra alkalmas embrionális vérmintákat az embriók feláldozása nélkül, így a módszer adaptálása más fajok esetében is lehetségesnek tűnik. (Wernery et al., 2010).

Láthatjuk, hogy sokan és sok különböző fajtán, fajon értek már el eredményeket, ennek ellenére úgy gondolom, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredmények egyediek, mert tudomásom szerint ez az első vizsgálat, amelyben egy egész régió őshonos házityúk fajtáinak ősivarsejt alapú genetikai megőrzése megvalósult, továbbá mindkét ivarból származó egyedi sejtvonalakat sikerült fenntartani táplálósejt mentes tenyésztési technikával.

A dolgozatban bemutatott őshonos magyar fajtákra adaptált sejttenyésztési technika előnye, hogy segítségével sikerült nőivarú ősivarsejt vonalakat alapítani és fenntartani minden fajta esetében, valamint ezekből is (a hím vonalakhoz hasonlóan) ivarszerv kimérákat és végül donor eredetű utódokat létrehozni. A tenyésztési módszer további előnye, hogy nem használ tápláló sejteket, így egyrészt a tápoldat pontosabban reprodukálható, másrészt egyszerűbb és gyorsabb a folyamat. Hat őshonos magyar fajtából izoláltam ősivarsejteket és alapítottam sejtvonalakat. Az átlagos sejtvonal alapítási ráta 42,0 % volt, mely hasonló a más kutatócsoportok által kapott vizsgálati eredményekhez (Vantress heritage fajta: 40-56 %; Fehér leghorn fajta: 49-82 %) (Nandi et al., 2016; Woodcock et al., 2019). Az alapított sejtvonalak pozitív festődést mutattak őssejt- és ősivarsejt-specifikus ellenanyagokkal (anti-SSEA-1, anti-DAZL és anti-CVH), továbbá kifejeztek őssejt- és ősivarsejt-specifikus géneket (*CVH*, *cPOUV*), mely eredmények bizonyítják, hogy a tenyésztés során hosszú távon fenntartott sejtek valóban ősivarsejtek. Donor eredetű utódokat 4,1 %-os hatékonysággal sikerült létrehoznom, mely hasonló a korábbi kutatások során közölt értékekhez (Gifujidori fajta: 6,0 %; Hinai-dori fajta: 8,1 %; Meiling fajta: 12,6 %) (Nakamura et al., 2010; Rikimaru et al., 2011, 2014; Miyahara et al., 2014; Yu et al., 2019). A dolgozatban bemutatott *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján nagy biztonsággal állítható, hogy az ajánlott protokollok alkalmazásával génmegőrzésre alkalmas ősivarsejt génbanki minták állíthatók elő, melyekkel visszanyerhető a megőrizni kívánt őshonos vagy gazdaságilag fontos házityúk fajta.

4.1. Javaslatok

Az ősivarsejtek tárolásán keresztül megvalósított génbanki megőrzés az irodalmi adatok és saját vizsgálataim alapján is értékes részét képezheti a jövő faj és fajtavédelmi programjainak. A sperma és ivarszerv-szövet mélyhűtéssel együtt egy olyan génbanki gyűjtemény hozható létre az adott fajtából, mely segítségével a jövőben nagy hatékonysággal lesz visszanyerhető a megőrizni kívánt fajta mindkét ivara. A házityúk esetében az ősivarsejtek kinyerésének, tenyésztésének, mélyhűtésének és minőség ellenőrzésének módszerei a különböző fajták esetén is jó eredményeket hoztak (jelen dolgozat eredményei alapján is), így minimális adaptálással bevethetők a gyakorlatban. Más fajok esetében azonban szükséges a hosszú távú tenyésztéshez használni kívánt tápoldat komponenseinek optimalizálása, esetleg új összetételű médiumok, új izolálási módszerek kidolgozása. Ez a feladat igen bonyolult is lehet, mert fel kell hozzá térképezni az adott faj ősivarsejtjeire jellemző jelátviteli útvonalakat. Jelenleg véleményem szerint ez az egyik terület, aminek a fejlesztése mindenképpen szükséges, mert a megőrzési módszer kulcseleme a fajspecifikus tápoldat, melyben a sejtek osztódása optimális sebességű, és képesek megőrizni ősivarsejt jellegüket (nem differenciálódnak tovább). A megőrzési folyamatot a recipiens oldaláról vizsgálva pedig fontos lenne olyan univerzális recipiensek keresése, illetve létrehozása, melyek akár vad madárfajok esetében is képesek a donor ősivarsejtek befogadására. További kívánatos tulajdonság lenne, hogy a recipiens embriók ivarszervében ne legyenek saját ivarsejtek (vagy csak csökkentett darabszámban), ezzel jelentősen növelve a folyamat hatékonyságát. Ezek nem egyszerű feladatok, de a közelmúltban a DDX knock-out házityúk és az interspecifikus steril hibridek példája bíztató első lépéseknek tekinthetők. Javaslom tehát a terület kutatói számára a dolgozatban tárgyalt módszer kiterjesztését minden arra érdemes őshonos, veszélyeztetett vagy gazdaságilag fontos házityúk fajtára, illetve egyéb fajok bevonását és a házityúkon már bevált módszerek adaptálását. Ezzel a megközelítéssel a jövőben jóval védettebbé válhatnak a jelenleg csak *in vivo* megőrzés alatt álló értékes baromfi fajok és fajták, illetve egyéb veszélyeztetett madárfajok.

5. KIEMELT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témakörében megjelent impakt faktoros tudományos szakcikkek:

- **Lázár, B.**, Molnár, M., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M. J., Gócza, E., Patakiné Várkonyi, E. (2020): Successful cryopreservation and regeneration of a Partridge coloured Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. **POULTRY SCIENCE** *jelenleg bírálat 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 REPORT**, doi: 10.1038/s41598-019-50763-3. **D1, IF:4,585**
- Tóth Roland, **Lázár Bence**, Tokodyné Szabadi Nikolett, Patakiné Várkonyi Eszter, Gócza Elen (2019): Őshonos magyar tyúkfajták, mint lehetséges univerzális recipiensek az ősivarsejt alapú génmegőrzésben. **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA** 141/439-447. **Q4, IF: 0,143**
- Anand*, M., **Lázár*, B**., Tóth, R., Páll, E., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Homolya, L., Hegyi, Z., Hidas, A., Gócza, E. (2018): Enhancement the chicken primordial germ cell in vitro maintenance using automated cell image analyser. **ACTA VETERINARIA HUNGARICA** 66(4): 518–529. **Q2, IF:1.042**
- **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., PMID: 30123283, **STEM CELLS INTERNATIONAL**. **Q2, IF: 3.989**
- Sztán, N., **Lázár, B.**, Bodzsár, N., Végi, B., Liptói, K., Pain, B., Patakiné Várkonyi, E. (2017): Successful chimera production in the Hungarian goose (*Anser anser domestica*) by intracardiac injection of blastodermal cells in 3-day-old embryos. **REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT**. doi: 10.1071/RD16289. **Q1, IF: 2.656**

Az értekezés témakörében íródott könyvfejezetek:

- Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E., **Lázár, B**. (2017): **Génmegőrzés embrionális sejtek segítségével.** In: Szalay István (szerk.) Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében: Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből. 214 p. Budapest; Gödöllő: Haszonállat-génmegőrzési Központ, 2017, pp.64-80. (ISBN 978-963-286-729-8)
- Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E., **Lázár, B**., Sztán, N, (2017): **Mindkét ivar megőrzése embrionális sejtek segítségével különböző baromfifajokban.** In: Szalay István (szerk.) Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében: Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből. 214p. Budapest; Gödöllő: Haszonállat-génmegőrzési Központ, 2017, pp.113-122. (ISBN 978-963-286-729-8)

Az értekezés témakörében megjelent nem impakt faktoros tudományos szakcikkek:

- **Lázár, B** (2018): Comparison of the MicroRNA Expression Profiles of Male and Female Avian Primordial Germ Cell Lines. (short report), **Innovative Management of Animal Genetic Resources Newsletter**, 2018/4. pp. 5.
- Molnár, M., **Lázár, B.,** 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. **Innovative Management of Animal Genetic Resources Newsletter,** 2019/7. pp. 8-9.

Az értekezés témakörében tartott előadások:

- **Lazar, B**., Toth R., Anand, M., Sztan, N., Molnar, M., Vegi, B., Drobnyak, A., Eszter Patakine Varkony, E., Gocza, E. (2018): Successful biobanking of an indigenous chicken breed with cryopreserved primordial germ cell lines. ***Poultry Science Association 2nd Latin American Scientific Conference***, Sao Paulo, Brazil, 2018.11.06 - 2018.11.08., absztrakt, előadás angolul #31 (Lázár Bence, előadói külön díj)
- **Lázár Bence** (2018): Őshonos házityúk fajtáink génmegőrzése ősivarsejtek felhasználásával. ***GÉNNET-21, „A Kárpát-medencei őshonos haszonállatfajok, -fajták és -ökotípusok XXI. századi génbanki stratégiájának tudományos megalapozása és fejlesztése***", szakmai tanácskozás, Gödöllő, HáGK, 2018. június 7., magyar nyelvű előadás
- **Lázár, B**., Tóth, R., Nagy, A., Anand, M., Liptói, K., Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E. (2017): Primordial germ cell-based biobanking of Hungarian indigenous chicken breeds. Poultry Science 96:(E Suppl.1.) p62 (IF: 1.908). ***Poultry Science Association 106th Annual Meeting***, Orlando, USA, 2017.07.17 -2017.07.20. (World' s Poultry Science Association) OP-166, absztrakt, előadás (Lázár Bence)
- **Lázár, B**., Tóth, R., Anand, M., Nagy, A., Liptói, K., Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E (2016): Házityúk ősivarsejtek izolálása, in vitro fenntartása és mélyhűtéses tárolása a génmegőrzés szolgálatában. ***Alternatív biotechnológiai módszerek bevezetése a magyar in vitro baromfi- és nyúl génbank fejlesztése céljából***. Záró konferencia, 2016.06.30., Gödöllő, HáGK, előadás (Lázár Bence)
- **Lázár, B.**, Südy, Á., Németh, K., Bontovics, B., Gócza, E. (2015): Examination the expression of pluripotency related genes in the gonads and primordial germ cells of the chicken. ***EMBO Workshop: Embryonic – Extraembryonic Interfaces***, Göttingen, 6-9 May 2015, poszter, absztrakt, rövid előadás (Lázár Bence)

Az értekezés témakörében bemutatott poszterek:

- **Lázár Bence**, Tóth Roland, Tokodyné Szabadi Nikolett, Molnár Mariann, Patakiné Várkonyi Eszter, Gócza Elen (2019): Ősivarsejtek in vitro jellemzése és embrionális lokalizációjának vizsgálata lúdban (Anser anser domestica). ***25. Szaporodásbiológiai Találkozó***, 2019.11.08-09, Balatonkenese, poszter (Lázár Bence)
- **Lázár Bence**, Tóth Roland, Tokodyné Szabadi Nikolett, Molnár Mariann, Patakiné Várkonyi Eszter, Gócza Elen (2019): Lúd (Anser anser domestica) ősivarsejtek izolálása és in vitro jellemzése. ***Sejt- Fejlődés és Őssejtbiológusok 2019. évi találkozója***, P18, p42, 2019.10.30, HGI (Haszonállat Génmegőrzési Intézet), Gödöllő, absztrakt, poszter (Lázár Bence)
- **Lazar, B.**, Toth, R., Anand, M., Molnar, M., Liptoi, K., Patakiné Várkonyi, E., Gocza, E. (2018): Germline chimera production from cryopreserved primordialgerm cell lines

of a Hungarian indigenous chicken breed. ***The XVth European Poultry Conference***, Dubrovnik, 2018.09.17 - 2018.09.21., absztrakt, poszter (Lázár Bence)

- **Lázár, B.**, Südy, Á., Németh, K., Bontovics, B., Gócza, E. (2015): Examination the expression of pluripotency related markers in the gonads and primordial germ cells of different types of chicken breeds, ***Hungarian Molecular Life Sciences Conference***, Eger, 27-29 March 2015, poszter, absztrakt (Lázár Bence)
- **Lázár B.,** Németh K., Südy Á., Bontovics B., Gócza E.: (2014): Characterization the developmental potential of cultured chicken primordial germ cells. Transgenic Research, 23(5): 848-849. (IF: 2.281), ***12th Transgenic Technology Meeting*** (TT2014), Edinburgh, Scotland, United Kingdom, 2014.10.06 - 2014.10.08., (P52) absztrakt, poszter (Lázár Bence)
- **Lázár Bence**, Südy Ágnes, Németh Kinga, Bontovics Babett, Gócza Elen (2014): Pluripotens markerek expressziójának vizsgálata házityúk embrió ivarlécében, illetve az ősivarsejtekben. ***20. Szaporodásbiológiai Találkozó***, A szaporodás egészségügytől a szaporodásbiológiai gondozásig, Herceghalom, 2014.11.07 - 2014.11.08, absztrakt, poszter (Lázár Bence)

Az értekezés témakörében megjelent magyar nyelvű ismeretterjesztő cikkek:

- Tóth, R., **Lázár, B.**, Gócza, E. (2018): A házityúk-ivarszerv kialakulásának érdekességei. Tyúkok, tojások, őssejtek. **TERMÉSZETTUDOMÁNYI KÖZLÖNY,** 149(11):498-504.
- **Lázár. B.,** Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E. (2016): Embriológiai vizsgálatok a genetikai sokféleségért. Madárles a tojásban. **ÉLET ÉS TUDOMÁNY**, LXXI. (3): 84-85.

Nem az értekezés témakörében megjelent impakt faktoros tudományos szakcikkek:

- Bontovics, B., Maraghechi, P., **Lázár, B**., Anand, M., Németh, K., Fábián, R., Jaromír Vašíček, J., Makarevich, A. V., Gócza, E. and Chrenek, P. (2020). The Effect of Dual Inhibition of Ras-MEK-ERK and GSK3β Pathways on Development of in Vitro Cultured Rabbit Embryos. **ZYGOTE**. doi: 10.1017/S0967199419000753 (**IF: 1.257**) (Q4)
- Fehérvári, P., **Lázár, B**., Palatitz, P., Solt, S., Nagy, A., Prommer, M., Nagy, K., & Harnos, A. (2014). Pre-Migration Roost Site use and Timing of Postnuptial Migration of Red-Footed Falcons (*Falco Vespertinus*) Revealed by Satellite Tracking, **ORNIS HUNGARICA**, 22(1), 36-47. doi: 10.2478/orhu-2014-0009 (**IF: 0.53**) (Q3)

Nem az értekezés témakörében megjelent nem impakt faktoros tudományos cikkek:

- Tokodyné, Szabadi Nikolett; Sima, Krisztina; Tóth, Roland; **Lázár, Bence**; Patakiné, Várkonyi Eszter; Liptói, Krisztina; Gócza, Elen (2020): Hőstressz hatására aktiválódó fiziológiai válaszok házityúkban, a hőháztartás fenntartása érdekében. **ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS TAKARMÁNYOZÁS** (0230-1814): 69/1 pp. 41-52., 12 p.
- Tokodyné, Szabadi Nikolett; Tóth, Roland; **Lázár, Bence**; Gócza, Elen (2020): Klímaváltozás káros hatásainak kivédése baromfiban. In: Bihari, Erika; Molnár, Dániel; Szikszai-Németh, Ketrin (szerk.) ***Tavaszi Szél - Spring Wind 2019***. I. kötet: Tanulmánykötet, Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége

(DOSZ), pp. 164-171. 8 p

- Anand, M., Tóth, R., Kidane, A., Nagy, A., **Lazar, B.,** Patakiné Várkonyi E., Liptói, K., Gócza, E. (2016): Examination the expression pattern of HSP70 heat shock protein in chicken PGCs and developing genital ridge. **ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGIES**, 49 (1), 78-82.
- Fehérvári, P., **Lázár, B.,** Palatitz, P., Solt, Sz., Kotymán, L., Harnos, A. (2011): Az időjárás hatásai a kék vércse (*Falco vespertinus*) fészekaljméretére. ***"Klíma-21" Füzetek***, 65, pp. 53-63.

6. IRODALOMJEGYZÉK

Bakst, M. R., and J. S. Dymo. 2013. Artificial Insemination in Poultry.in Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed. Lemma, A., ed.

Báldy, B. 1954. A baromfi tenyésztése. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Biszkup, F., and L. Beke. 1951. A magyaróvári sárga magyar tájfajta tyúk kitenyésztésének módszerei és eredményei. Agrártudomány III:461–467.

Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. Worlds. Poult. Sci. J. 63:213–222.

Burrows, W. H., and J. P. Quinn. 1935. A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl. Poult. Sci. 14:251–253.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (vers. 2.9.3). Www.Unil.Ch/Izea/Sofwares/Fstat.Html 149:507–526.

Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr, and R. J. G. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. Mol. Ecol. 7:1071–1075.

Kim, H., D. H. Kim, J. Y. Han, S. B. Choi, Y.-G. Ko, Y. J. Do, H.-H. Seong, and S. W. Kim. 2013. The Effect of Modified Cryopreservation Method on Viability of Frozen-thawed Primordial Germ Cell on the Korean Native Chicken (Ogye). J. Anim. Sci. Technol. 55:427–434.

Kong, L., L. Qiu, Q. Guo, Y. Chen, X. Zhang, B. Chen, Y. Zhang, and G. Chang. 2018. Long-term in vitro culture and preliminary establishment of chicken primordial germ cell lines. PLoS One 13:e0196459.

Van De Lavoir, M. C., E. J. Collarini, P. A. Leighton, J. Fesler, D. R. Lu, W. D. Harriman, T. S. Thiyagasundaram, and R. J. Etches. 2012. Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. PLoS One 7:e35664.

Van De Lavoir, M. C., J. H. Diamond, P. A. Leighton, C. Mather-Love, B. S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L. T. Hooi, T. M. Gessaro, S. E. Swanberg, M. E. Delany, and R. J. Etches. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. Nature 441:766–769.

Lázár, B., M. Anand, R. Tóth, E. P. Várkonyi, K. Liptói, and E. Gócza. 2018. Comparison of the MicroRNA expression profiles of male and female avian primordial germ cell lines. Stem Cells Int. 2018:1–17.

Lee, J. C. I., L. C. Tsai, P. Y. Hwa, C. L. Chan, A. Huang, S. C. Chin, L. C. Wang, J. T. Lin, A. Linacre, and H. M. Hsieh. 2010. A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. Mol. Cell. Probes 24:27–31.

Macdonald, J., J. D. Glover, L. Taylor, H. M. Sang, and M. J. McGrew. 2010. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. PLoS One 5:e15518.

Miyahara, D., T. Mori, R. Makino, Y. Nakamura, I. Oishi, T. Ono, K. Nirasawa, T. Tagami, and H. Kagami. 2014. Culture Conditions for Maintain Propagation, Long-term Survival and Germline Transmission of Chicken Primordial Germ Cell-Like Cells. J. Poult. Sci. 51:87–95.

Naito, M., A. Tajima, T. Tagami, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1994. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. J. Reprod. Fertil. 102:321–325.

Nakamura, Y., F. Usui, D. Miyahara, T. Mori, T. Ono, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2010. 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). Reprod. Fertil. Dev. 22:1237–1246.

Nandi, S., J. Whyte, L. Taylor, A. Sherman, V. Nair, P. Kaiser, and M. J. Mcgrew. 2016. Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. Poult. Sci. 95:1905–1911.

Oishi, I., K. Yoshii, D. Miyahara, H. Kagami, and T. Tagami. 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. Sci. Rep. 6.

Pain, B., M. E. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut, and R. J. Etches. 1996. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. Development 122:2339–2348.

Rikimaru, K., N. Ito, Y. Nakamura, D. Takahashi, M. Ono, M. Komatsu, and K. Matsubara. 2011. Identification of germline chimeric chickens produced by transfer of primordial germ cells using a Hinai-dori-specific microsatellite marker. J. Poult. Sci. 48:281–291.

Rikimaru, K., Y. Nakamura, D. Takahashi, M. Komatsu, N. Ito, K. Matsubara, and T. Tagami. 2014. Production of Pure Hinai-dori with Normal Reproductive Capability from Transferred Primordial Germ Cells. J. Poult. Sci. 51:297–306.

Seok, J. K., W. C. Jin, Y. K. Sun, J. P. Kyung, M. K. Tae, M. L. Young, H. Kim, M. L. Jeong, and Y. H. Jae. 2008. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. Biol. Reprod. 79:931–937.

Srihawong, T., P. Teinlek, and C. Tirawattanawanich. 2016. Investigation of an In Vitro Culture System for Siamese Fireback Pheasant (Lophura diardi) Primordial Germ Cell. J. Kasetsart Vet. 26:70–82.

Szalay, I. 2015. Régi magyar baromfifajták a XXI. században (Old Hungarian Poultry in the 21th century). Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (Gallus domesticus). Theriogenology 40:509–519.

Tirawattanawanich, C. 2012. Conservation of Red Junglefowl Biodiversity by Primordial Germ Cell Cryopreservation .Pages 82–92 in The Proceeding of the Human-Chicken Multi-Relationships (HCMR) Symposium. Thailand.

Tonus, C., K. Cloquette, F. Ectors, J. Piret, L. Gillet, N. Antoine, D. Desmecht, A. Vanderplasschen, O. Waroux, and L. Grobet. 2016. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. Reprod. Fertil. Dev. 28:628–639.

Wang, L., M. J. Chen, D. Y. Chen, S. F. Peng, X. L. Zhou, Y. Y. Liao, X. G. Yang, H. Y. Xu, S. S. Lu, M. Zhang, K. H. Lu, and Y. Q. Lu. 2017. Derivation and characterization of primordial germ cells from Guangxi yellow-feather chickens. Poult. Sci. 96:1419–1425.

Wernery, U., C. Liu, V. Baskar, Z. Guerineche, K. A. Khazanehdari, S. Saleem, J. Kinne, R. Wernery, D. K. Griffin, and I. K. Chang. 2010. Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line houbara bustard offspring: Potential for repopulating an endangered species. PLoS One 5:e15824.

Whyte, J., J. D. Glover, M. Woodcock, J. Brzeszczynska, L. Taylor, A. Sherman, P. Kaiser, and M. J. McGrew. 2015. FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. Stem Cell Reports 5:1171–1182.

Woodcock, M. E., A. A. Gheyas, A. S. Mason, S. Nandi, L. Taylor, A. Sherman, J. Smith, D. W. Burt, R. Hawken, and M. J. McGrew. 2019. Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116:20930–20937.

Yu, F., Z. Zhu, X. Chen, J. Huang, R. Jia, and J. Pan. 2019. Isolation, characterization and germline chimera preparation of primordial germ cells from the Chinese Meiling chicken. Poult. Sci. 98:566–572.