



Az ivart kialakító tényezők vizsgálata afrikai harcsán
(*Clarias gariepinus*)

Doktori (PhD) értekezés

DOI: 10.54598/005290

Balogh Réka Enikő

Gödöllő

2024

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és
Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

témavezető: Dr. Kovács Balázs
tudományos főmunkatárs
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Molekuláris Ökológia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1. BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉSEK	6
3. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. Ivardetermináció halaknál	7
3.2. Ivari markerek halaknál	13
3.3. Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszere	15
3.4. A halak ivari differenciálódása	18
3.5. A vizsgált gének áttekintése	20
3.5.1. <i>sox9</i>	20
3.5.2. <i>sox3</i>	22
3.5.3. <i>foxl2</i>	23
3.5.4. <i>vasa</i>	24
3.5.5. <i>amhr2</i>	26
3.5.6. <i>mark2</i>	26
3.5.7. <i>pten</i>	27
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	28
4.1. Afrikai harcsa kísérleti állomány	28
4.1.1. Magyar állomány RAS (recirkulációs akvakultúrák) rendszerben	28
4.1.1.1. Az anyaállomány eredete.....	28
4.1.1.2. Keresztezési séma és az állomány tartása.....	28
4.1.1.3. Szaporítás és előnevelés	30
4.1.2. Magyar állomány átfolyóvízes rendszerben	30
4.1.2.1. Keresztezési séma és az állomány tartása.....	30
4.1.2.2. Szaporítás és előnevelés	32
4.1.3. Vietnámi állomány vizsgálata	33
4.2. Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszerének vizsgálata	33
4.2.1. A CgaY1 marker validálása.....	33
4.2.2. A fenotípusos ivar ellenőrzése.....	33
4.2.3. Molekuláris ivarmeghatározás.....	34
4.2.4. A hőmérséklet ivarra gyakorolt hatásának vizsgálata	35
4.2.5. A CgaY1 validálásából származó adatok kiértékelése	36
4.2.6. Mások által ivarhoz kötöttnek leírt markerek vizsgálata	37
4.2.7. Ivarhoz kötött SNP markerek izolálása ddRAD szekvenálás segítségével	38

4.2.7.1.	Mintavétel és -előkészítés	38
4.2.7.2.	ddRAD könyvtár készítés Illumina szekvenáláshoz	38
4.2.7.3.	A ddRAD szekvenálásból származó adatok kiértékelése.....	39
4.3.	Ivaronkénti génexpresszió vizsgálata	40
4.3.1.	Mintavétel.....	40
4.3.2.	Minta előkészítés	40
4.3.3.	<i>In silico</i> analízis.....	41
4.3.4.	qPCR optimalizálás (standard curve analízis)	42
4.3.5.	Referencia gén kiválasztása a real-time PCR vizsgálatokhoz	42
4.3.6.	Real-time PCR vizsgálatok.....	42
4.3.7.	Statisztikai értékelés	43
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	44
5.1.	Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszere	44
5.1.1.	CgaY1 marker validálásának eredményei	44
5.1.2.	A hőmérséklet ivarra gyakorolt hatásának eredményei.....	46
5.1.3.	Mások által ivarhoz kötöttnek nyilvánított markerek vizsgálatának eredményei...	46
5.1.4.	Ivarhoz kötött SNP markerek eredményei.....	47
5.2.	Egyes jelölt gének expressziós mintázatának eredményei a két ivarban.....	56
5.2.1.	A petefészkek differenciálódásában szerepet játszó gének (<i>sox9b</i> , <i>foxl2</i>)	56
5.2.2.	A here differenciálódásában szerepet játszó gének (<i>sox3</i> , <i>amhr2</i> , <i>pten</i> , <i>mark2</i>)....	59
5.2.3.	Az ivari őscsírasejtekben kifejeződő <i>vasa</i> gén expressziójának analízise.....	64
5.2.4.	Az ivaronkénti expressziós mintázat eredményeinek összefoglalása.....	65
6.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	66
6.1.	Az afrikai harcsa genetikai ivardeterminációs rendszere.....	66
6.2.	A hőmérséklet afrikai harcsa ivarára gyakorolt esetleges hatásának vizsgálata	68
6.3.	Az ivaronkénti génexpresszió analízise az afrikai harcsa korai fejlődése során	69
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	72
8.	ÖSSZEFOGLALÁS	73
9.	SUMMARY.....	75
10.	M1 IRODALOMJEGYZÉK	77
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	109

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

11-KT	<i>11-ketotestosterone</i> - 11-ketotesztoszteron
11-β-hsd	<i>11-β-hydroxysteroid-dehydrogenase</i> - 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz
<i>actb</i>	<i>β actin</i> - β aktin
<i>add3</i>	<i>Adducin 3</i> - Adducin 3
AFLP	<i>Amlified Fragment Length Polimorphism</i> - Amplifikált fragmentum hossz-polimorfizmus
<i>amh</i>	<i>Anti-Müllerian hormone</i> - Anti-Müller hormon
<i>amhr2</i>	<i>Anti-Müllerian hormone receptor 2</i> - Anti-Müller hormon receptor 2
<i>amhY</i>	<i>Y chromosome-linked anti-Müllerian hormone</i> - Y kromoszómához kapcsolt anti-Müller hormon
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i> - Molekuláris varianciaanalízis
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> - Csont morfogenetikus fehérje
Ct	<i>Cycle threshold</i> - A ciklusszám küszöbértéke
<i>cyp19</i>	<i>Cytochrome P450 gene family 19</i> - Citokróm P450 géncsalád
DArT	<i>Diversity Arrays Technology</i>
<i>dctn4</i>	<i>Dynactin Subunit 4 gene</i>
ddRAD	<i>Double-digest restriction-site associated DNA</i> - Kétszeresen emésztett restrikciós helyhez kötődő DNS
<i>dmrt</i>	<i>Doublesex and Mab-3 related transcription factor gene</i>
<i>dmy</i>	<i>DM-domain gene on the Y chromosome gene</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> - Deoxinukleotid-trifoszfát
<i>dtna</i>	<i>Dystrobrevin alpha</i>
E2	<i>17β-estradiol</i> - 17 β -ösztadiol
<i>ef1a</i>	<i>Elongation factor 1a</i> - Elongációs faktor 1a
ESD	<i>Environmental sex determination</i> - Környezeti ivardetermináció
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> - Az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdálkodási Szervezete
<i>foxl2</i>	<i>Forkhead box L2 gene</i>
<i>gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> - Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz

GDF	<i>growth and differentiation factors</i> – Növekedési és differenciációs faktorok
gnrh3	<i>Gonadotropin-releasing hormone gene 3</i> - Gonadotropin felszabadító hormon 3 gén
GSD	<i>Genetic sex determination</i> - Genetikai ivardetermináció
GO	<i>Gene ontology</i> - Génontológia
gsdfY	<i>Gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome</i>
gucd1	<i>Guanylyl Cyclase Domain Containing 1</i>
HMG	<i>High mobility group</i>
LHRHa	<i>Luteinizing Hormone - Releasing Hormone analogue</i> - Luteinizáló hormon serkentő hormon analóg
MAPs	<i>Microtubule-associated proteins</i> - Mikrotubulushoz kötődő proteinek
mark2	<i>Microtubule Affinity Regulating Kinase 2</i>
mRNS	<i>Messenger RNA</i> - hírvivő RNS
MSD gene	<i>Master sex-determining gene</i> – ivardetermináló mestergén
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i> - Nemzeti Biotechnológia Információs Központ (USA)
OD	<i>Optical density</i> - Optikai sűrűség
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> – Mendeli öröklődés emberben adatbázis
pcdh2ab3	<i>Protocadherin 2 alpha b 3</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Polimeráz láncreakció
pfpdz1	<i>PDZ domain-containing gene in Pelteobagrus fulvidraco</i>
PGC	<i>Primordial germ cells</i> - Primordiális őscsírasejtek
pten	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> - Foszfatáz és tenzin homológ
RAD	<i>Restriction site associated DNA</i> - Restrikciós helyhez kapcsolódó DNS
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> - Véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS
RAS	<i>Recirculated aquaculture system</i> - Recirkulációs akvakultúrás rendszer
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
rpl13	<i>Ribosomal Protein L13</i> - Riboszómális fehérje L13
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i> - Ismert szekvenciájú amplifikált régió
SD	<i>Sex determination</i> - Ivardetermináció

<i>sdY</i>	<i>Sexually dimorphic region on the Y chromosome</i>
SGP	<i>Somatic gonadal precursor</i> - A szomatikus ivarszerv prekursor sejtje
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - Egy pontos nukleotid polimorfizmus
SOX	<i>SRY-related HMG box</i>
SRY	<i>Sex-determining region on Y chromosome</i> - Ivardetermináló régió az Y kromoszómán
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> - Egyszerű szekvencia ismétlődés
T	<i>Testosterone</i> - Tesztoszteron
Taq polimeráz	A <i>Thermophilus aquaticus</i> -ból izolált hőstabil polimeráz enzim
TE	<i>Temperature effect</i> - Hőmérsékleti hatás
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i> – Transzformáló növekedési faktor β
TSD	<i>Temperature-dependent sex determination</i> - Hőmérséklettől függő ivardetermináció
<i>wnt4</i>	<i>Wnt Family Member 4</i>

1. BEVEZETÉS

A népesség növekedésével járó élelmezési problémák megoldása korunk egyik legnagyobb kihívása, melynek elérésében az akvakultúra biztosította élelmiszertermelésnek hatalmas szerepe lehet. Az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdálkodási Szervezete (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) adatai alapján a vízi szervezetek feldolgozásából származó élelmiszertermelés az 1950-es évek óta növekvő tendenciát mutat, 2020-ra elérte az évi 178 millió tonnát. Ennek a mennyiségnek a 49%-a (88 millió tonna) akvakultúrás termelésből és 51%-a (90 millió tonna) természetesvízi fogásból származik. Megemlítendő ugyanakkor, hogy a természetesvízi fogás mennyisége már az 1970-es, 80-as években lassuló ütemű növekedést mutatott, a 90-es évek óta pedig inkább stagnál, melynek hátterében feltehetően antropogén hatások (túlhalászat, környezetszennyezés, élőhely degradáció) állnak. A dinamikusan fejlődő akvakultúra ágazat az egyre növekvő élelmiszerigény kielégítésére a természetesvízi fogásoknál fenntarthatóbb megoldást kínál.

Az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus* BURCHELL, 1822) a *Siluriformes* rendbe, a *Clariidae* családba tartozó, Afrikában, Törökország déli részén, Libanonban, Szíriában, Izraelben és Jordániában őshonos halfaj. Könnyen kontrollálható szaporodása és magas környezeti toleranciája miatt akvakultúrás termelésre rendkívül alkalmas, emiatt napjainkra a világ számos országában, Afrikán kívül Európában (Magyarország, Hollandia, Olaszország), Ázsiában (Kína, India, Thaiföld) és Dél-Amerikában (Brazília) is tenyésztik. Betegségekkal szemben ellenálló, a vízminőségre viszonylag érzéketlen. Másodlagos légzőszervének köszönhetően a légköri oxigént is képes hasznosítani, emiatt nagy telepítési sűrűséggel (700-1000 kg/m³) tartható, emiatt tenyésztése során magas hozam érhető el (HAVASI, 2014). Növekedési erély és takarmányértékesítés szempontjából kimagasló, 0,9-1,3-as takarmányegyüttható mellett körülbelül 5-6 hónap alatt eléri a piaci (1,2-1,5kg) méretet (RADICS, 1990). A hímek növekedési erélye és táphasznosítása (HENKEN ET AL., 1987), valamint filé kihozatala (FAO, 2010) is meghaladja a nőstényekét, így termelési szempontból, sok más gazdaságilag fontos halfajhoz hasonlóan, előnyös lenne egyivarú termelési populációt létrehozni. Egyivarú populációk termelése során a gazdaságilag fontos paraméterek javulása mellett egyéb előnyöket is leírtak: sok halfajnál megfigyelték például a szexuális viselkedés következtében kialakuló agresszió csökkenését, valamint az állomány szétnövésének és ezáltal a kannibalizmus jelenségének csökkenését (BEARDMORE ET AL., 2001). Emellett nem elhanyagolható szempont, hogy idegenhonos fajok esetén az egyivarú populációkból

esetlegesen a természetes vizekbe kiszabaduló egyedek nem képesek szaporodóképes állományt létre hozni.

A monoszex állományok kialakítása érdekében végzett bármilyen ivar manipulációs eljáráshoz elengedhetetlen az adott faj ivardeterminációs mechanizmusának, ivari fejlődésének részletes ismerete. Az afrikai harcsa Magyarországon a ponty után a legnagyobb mennyiségben termelt halfaj, termelése világszinten meghaladja a 200.000 tonnát (FAO, 2010). Kiemelt gazdasági jelentősége ellenére még ivardeterminációs mechanizmusáról is ellentmondásos eredményekkel rendelkezünk (GALBUSERA ET AL., 2000; LIU ET AL., 1996; NGUYEN ET AL., 2021a; OZOUF-COSTAZ ET AL., 1990; VÁRADI ET AL., 1999), az ivarhoz kötött gének korai expressziós mintázatait pedig ivaronként még nem vizsgálták. Annak ellenére, hogy a tejesek előnyösebb gazdaságilag fontos fenotípusos tulajdonságokkal rendelkeznek, jelenlegi tudásunk szerint nem léteznek egyivarú termelési állományok sem. Bizonyos szerzők szerint (SANTI ET AL., 2016; SANTI ET AL., 2017) az afrikai harcsa genetikai ivardeterminációját környezeti hatások felülírhatják, az ivadékokat magasabb hőmérsékleten nevelve egyes családokban akár 100%-os hím ivararány is elérhető, mely termelési szempontból hasznos lehet.

Az afrikai harcsát először az 1980-as években importálták Magyarországra Hollandiából, kutatási célból, ugyanis biológiai kutatásokra is széles körben alkalmazzák (RADICS ET AL., 1994). Jelentőségét mutatja, hogy az 1980-as évek óta az afrikai harcsával kapcsolatos publikációk száma évről-évre nő: 2022-ben az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázis alapján 78 afrikai harcsával kapcsolatos cikk jelent meg. Az ivardetermináció, illetve az ivari fejlődés molekuláris vizsgálata egy modell állaton, nagyban hozzájárulhat a gerincesekre jellemző folyamatok megértéséhez is. Emellett, a hőmérséklet hatása az ivari fejlődésre sok hal és hüllő faj szempontjából fontos lehet, hiszen vizeink melegedése a globális felmelegedés hatására az egész élővilágot érinti.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásom fő célja az afrikai harcsa ivardeterminációs mechanizmusának, illetve korai ivari fejlődésének feltárása volt. Specifikus célokként a következőket tűztem ki magam elé:

1. A kutatócsoportunk elődjében izolált hím-specifikus CgaY1 marker többgenerációs validálását magyarországi és vietnámi afrikai harcsa állományokon.
2. Néhány, mások által izolált „mérsékelten ivarhoz kötött” ivari marker tesztelését.
3. A mások által javasolt hőmérséklet-okozta ivarátfordítás jelenségének vizsgálatát magyarországi afrikai harcsa állományokon.
4. Új, ivarhoz kötött SNP markerek izolálását nagy áteresztőképességű szekvenálással.
5. A korai, ivari fejlődésben szerepet játszó gének kifejeződésének ivaronkénti vizsgálatát a fejben és a törzsben, az ivari differenciálódás kezdetének térbeli és időbeli pontosítása érdekében.

3. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Ivardetermináció halaknál

Az ivari fejlődés az ivardetermináció (SD, sex determination) és az ivari differenciálódás folyamatait foglalja magába. Az ivardetermináció meghatározza, hogy egy adott organizmus a hím vagy a női nemi differenciálódás útját fogja-e követni, az ivari differenciálódás során pedig olyan molekuláris és sejtes folyamatok zajlanak le, amelyek révén a bipotenciális gonád herévé vagy petefészekké fejlődik (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002). Ivardeterminációs mechanizmus alapján beszélhetünk genetikai (GSD, genetic sex determination) és környezeti (ESD, environmental sex determination) ivardeterminációról (ANGELOPOULOU ET AL., 2012; VALENZUELA ET AL., 2003). GSD esetén az ivar már a megtermékenyítés pillanatában eldől és az ivarok közti különbséget egy vagy több kisebb-nagyobb genotípusos különbség határozza meg. A genotípusos különbségek alapján beszélhetünk egy lókuszos, poligénes, illetve ivari kromoszómális ivardeterminációs rendszerekről (RAMOS & ANTUNES, 2022). A legősibb ivardeterminációs mechanizmus a poligénes szabályozás, amikor az ivart a genomban elszórtan elhelyezkedő több, kisebb-nagyobb szakasz együttesen alakítja ki (SCHARTL ET AL., 2023). Ha ezek egy kromoszómára vagy kromoszómapárra rendeződnek az evolúció során, akkor beszélünk kromoszómális ivardeterminációról, ilyenkor vagy a női (ZW) vagy a hím (XY) ivar rendelkezik különböző, azaz heterogametikus ivari kromoszómákkal. Léteznek dóziszfüggő (XX/XO vagy ZZ/ZO), illetve több ivari kromoszómából álló (például XX/XY₁Y₂) rendszerek is (PENMAN & PIFERRER, 2008).

Az emlősök összes fajára általánosan jellemző ivardeterminációs mechanizmus a hím heterogametikus kromoszómális (XX/XY), míg madaraknál a női heterogametikus (ZZ/ZW) rendszer (BAKLOUSHINSKAYA, 2009; GRAVES, 2014). Emlősök esetén, az elkülönült hím ivari kromoszómán (Y) található ivardetermináló gén, az SRY (Sex-determining region on Y chromosome) alakítja ki a hím ivart (BERTA ET AL., 1990; SINCLAIR ET AL., 1990), az X kromoszómák számától függetlenül, XXY kromoszómával rendelkező egyedeknél is (JACOBS & STRONG, 1959; WELSHONS & RUSSELL, 1959). A madarakra azonban máig nem sikerült egy általános, női ivart determináló gént találni a W kromoszómán, emiatt feltételezik, hogy a Z kromoszómán található DMRT1 dózisz-függő módon alakítja ki a hím ivart (GRAVES, 2014).

A halak csoportja ivari szabályozás szempontjából rendkívül változatos, közeli rokon fajoknál is találhatunk különböző ivardeterminációs rendszereket. A vizsgált halfajok túlnyomó többsége nem rendelkezik elkülönült ivari kromoszómákkal. Ezekben az esetekben kariológiai vizsgálattal nem lehet az ivardeterminációs mechanizmust feltárni (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002). A halak között a gonokronisztikus (váltivarú) fajok mellett találunk hermafrodita fajokat is.

A GSD és az ESD előfordulhat keverten is, azaz a genetikai tényezők által meghatározott ivart különböző környezeti hatások (például egyedsűrűség, oxigénhiányos környezet, pH, szociális státusz és nem utolsó sorban a hőmérséklet) felülírhatják (BAROILLER ET AL., 2009a). A hőmérséklet hatását az ivardeterminációra ez idáig több, mint 50 csontoshalfaj esetében írták le, azonban ezek ritkán rendelkeznek tisztán hőmérséklet által meghatározott ivardeterminációval (TSD, temperature-dependent sex determination), leggyakrabban a genetikai szabályozás és a hőmérséklet együttes hatása figyelhető meg (GSD+TE, genetic sex determination + temperature effect) (OSPINA-ÁLVAREZ & PIFERRER, 2008).

A rendkívüli változatosság, mely a halak SD mechanizmusára, főként az elsődleges ivardetermináló faktorokra jellemző, valószínűsíti, hogy az ivar determinációjáért felelős mechanizmusok a gerincesek evolúciója során többször kialakultak (GRAVES, 2008; GRAVES & PEICHEL, 2010). Az afrikai sügereknél (*Cichlidae* család) például 14 egymástól függetlenül fejlődő ivarmeghatározó lókuszt 12 különböző kromoszómán található (GAMMERDINGER & KOCHER, 2018). Emellett létezik egy feltételezés, miszerint az elsődleges ivardetermináló faktorok többségében lentől felfelé („bottom-up”), azaz az ivardeterminációs kaszkád későbbi (downstream) elemeiből alakultak ki (ADOLFI ET AL., 2021; WILKINS, 1995).

Az előbbieket alapján látható, hogy a csontoshalakban nem találunk egy általános ivardeterminációs mechanizmust, emiatt ismereteink a halak genetikai ivarmeghatározására vonatkozóan a mai napig rendkívül limitáltak, még olyan fajok esetén is, amelyek a legegyszerűbb monofaktoriális GSD rendszerrel rendelkeznek (**1. táblázat**). Napjainkig csak néhány ivardetermináló „mestergént” (MSD, master sex-determining) írtak le csontoshalaknál: elsőként a *dmy*-t japán medakában (*Oryzias latipes*), mely valószínűleg a *dmrt1* (DM-related transcription factor 1) autoszómális génből keletkezett egy genom duplikáció során (MATSUDA ET AL., 2002). A DMRT a transzkripció faktorok egy olyan családja, melyek egy erősen konzervált DNS-kötő doménnel, az úgynevezett DM doménnel rendelkeznek, nagyszámú célgén transzkripcióját szabályozzák és képesek mind aktivációra, mind represszióra (KOPP, 2012). Későbbi kutatások során több, DM doménnel rendelkező transzkripció faktor is

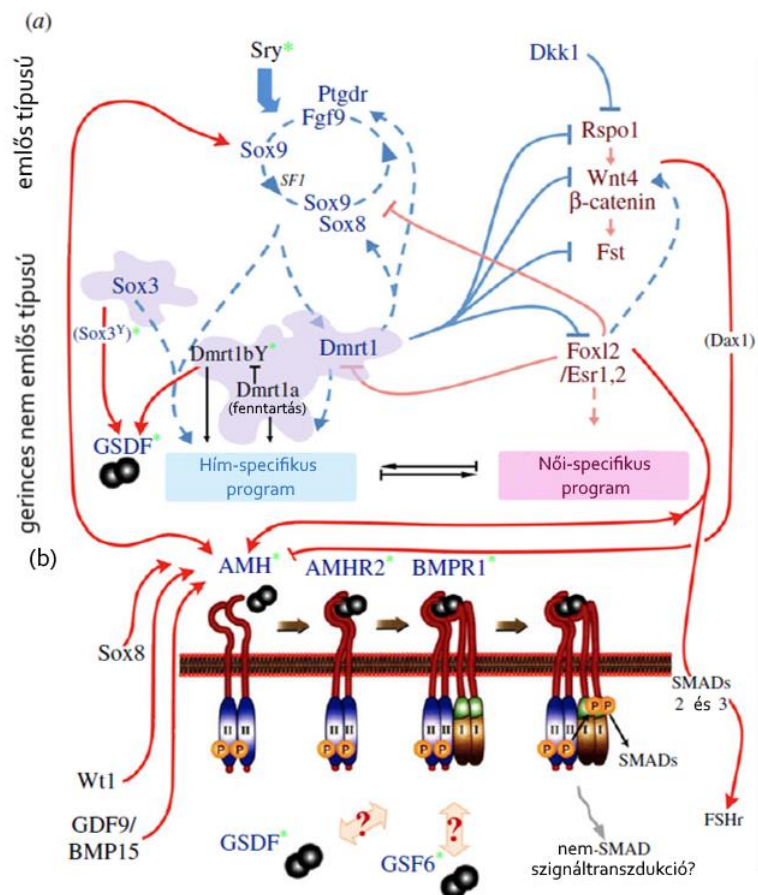
azonosítottak, mint MSD gént a csontoshalak körében, például a *dmy*-t *Oryzias curvinotus* (TANAKA ET AL., 2007) vagy a *dmrt1*-t *Cynoglossus semilaevis* (CHEN ET AL., 2014) fajokban.

A DMRT család mellett más transzkripció faktorok is betölthetik az MSD gén szerepét, ilyen például a *sox3* *Oryzias dancena* (TAKEHANA ET AL., 2014), a *sox2* *Scophthalmus maximus* (MARTÍNEZ ET AL., 2021) vagy az *sdY* *Oncorhynchus mykiss* (YANO ET AL., 2012) fajokban. A Yano és munkatársai által leírt *sdY* (sexually dimorphic on the Y chromosome) transzkripció faktor érdekes módon az *irf9* (interferon regulatory factor 9) génnel mutat homológiát, melyet más fajokban az interferonokra adott immunválasz szabályozásával kapcsolatban írtak le (FINK & GRANDVAUX, 2013). A SOX (Sry-related HMG box) géncsalád részletes leírását lásd 3.5.1 fejezetben. A *Gadus morhua* (KIRUBAKARAN ET AL., 2019) fajban leírt *zky* MSD gén egy, a cink-ujj proteinek családjába tartozó fehérjét kódol, melyek különböző DNS és RNS szálakhoz kötődő transzkripció faktorok. A fentiek közül néhány gén a rokon fajokban is hasonló funkciót lát el: például az *sdY* a lazacfélék tíz fájában az elsődleges jel az ivardetermináció folyamatában (YANO ET AL., 2013), ugyanakkor közeli rokon fajokban (lásd az *Oryzias* fajokban) is előfordulhat, hogy más-más faktor tölti be az SD gén szerepét.

A transzkripció faktorok mellett hormon receptorokat vagy szekréciós fehérjéket kódoló gének is lehetnek MSD gének. Ilyenek például a TGF- β szignáltranszdukciós út tagjai (1. ábra), melyek transzmembrán szerin-treonin kinázokon keresztül olyan intracelluláris folyamatokat indukálnak, melyek SMAD fehérjék (transzkripció faktorok) által szabályozzák a célgéneket (PAN ET AL., 2021). Szekvencia homológia alapján négy csoportra bonthatjuk őket: i) TGF- β *sensu stricto*; ii) csontmorfogenetikai fehérjék (BMPk, bone morphogenetic proteins); iii) aktivinek, inhibinek, növekedési és differenciálódási faktorok (GDF, growth and differentiation factors); és iv) távoli tagok.

Az utolsó (iv) csoportba tartozik az AMH (Anti-Müller hormon) szekréciós fehérje és ennek receptora az *amhr2* (anti-Müller hormon receptor 2). Az *amh* útvonal az emlősök hímjeiben nem az elsődleges ivardetermináló faktor, de szükséges a herék kialakulásához: a hím embrionális fejlődés során a Müller-cső regresszióját okozza (MULLEN ET AL., 2019). A valódi csontoshalak (*Teleostei*) nem rendelkeznek Müller-csővel, az *amh* gén több fajban, például *Odontesthes hatcheri* (HATTORI ET AL., 2012), *Oreochromis niloticus* (LI ET AL., 2015) és *Esox lucius* (PAN ET AL., 2019) fajokban tölti be az MSD szerepét. Ennek receptora, az *amhr2* *Perca flavescens* (FERON ET AL., 2020) fajban az elsődleges ivardetermináló faktor. *Takifugu rubripes* fajban (KAMIYA ET AL., 2012) az *amhr2*-ben található egyetlen misszensz egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) az elsődleges

ivardetermináló faktor, és ugyanezt a mechanizmust más *Takifugu* fajban is megfigyelték (DUAN ET AL., 2021). Az *amhr2* részletes leírását lásd a 3.5.5. fejezetben.



1. ábra: A TGF- β jelátviteli út, és az ahhoz kapcsolódó, az ivar kialakításában szerepet játszó gének sematikus ábrája [forrás: (PAN ET AL., 2021)]

A BMP (ii) és GDF (iii) faktorok emlősökben az ivarsejtek specifikációjához és az ivarsejtképződéshez szükségesek. Csontoshalaknál azonban több ilyen faktor ivardetermináló hatását bizonyították: MSD gén a GDF6 homológja két fajban is, feltételezhetően konvergens evolúció következtében: a *gdf6b* *Astynax mexicanus* (IMARAZENE ET AL., 2021) és a *gdf6y* *Nothobranchius furzeri* (REICHWALD ET AL., 2015) fajokban, valamint a *bmpr1bby*, a BMP I. típusú receptor egy változata *Clupea harengus* (RAFATI ET AL., 2020) fajban.

A TGF- β jelátviteli út egy másik tagjának, a *gsdf* génnek (gonadal soma-derived factor) az Y specifikus homológja két, egymástól rendszertanilag távol álló, XX/XY ivardeterminációs rendszerrel rendelkező fajban, az *Oryzias luzonensis*-ben (MYOSHO ET AL., 2012) és *Anoplopoma fimbria*-ban (HERPIN ET AL., 2021) is bizonyítottan az MSD gén. A *gsdf* gén sok egyéb halfajban fontos szerepet játszik a hím ivari fejlődésben (GAUTIER ET AL., 2011), *Oryzias*

latipes és *Oryzias dancena* fajokban az MSD gén (*dmy* és *sox3*) közvetlen hatása alatt áll (ZHANG ET AL., 2016).

Összességében megállapítható, hogy a legtöbb ezek közül a mestergének közül a halakra jellemző genom duplikáció során keletkezett (HEULE ET AL., 2014; SCHARTL, 2004; VOLFF ET AL., 2007), bár néhány esetben az allél változatok diverzifikációja révén (HERPIN ET AL., 2021; KAMIYA ET AL., 2012) is kialakulhatnak. Az MSD gének különböző transzkripciósfaktorokat (MATSUDA ET AL., 2002; VOLFF ET AL., 2007), szekréciós fehérjéket (HATTORI ET AL., 2012; MYOSHO ET AL., 2012) és hormon receptorokat kódolnak (KAMIYA ET AL., 2012), melyek közül sok a TGF- β jelátviteli út tagja. Emellett jól látható, hogy az utóbbi időben ugrásszerűen nőtt a felfedezett SD gének száma: az utóbbi négy évben több gént írtak le, mint a korábbi években összesen, mely valószínűleg a nagy áteresztőképességű technológiák fejlődésének köszönhető. Az MSD gének meghatározása történhet ivarhoz kötött markerek segítségével, melyek az ivarhoz kötött régió pontosítását segítik, illetve az ivardetermináció időpontjában végzett transzkriptóma vizsgálattal. Az MSD gének összefoglalását lásd az **1. táblázatban**.

A *Siluriformes* rendbe tartozó fajok között napjainkig egyetlen bizonyítottan MSD funkciót betöltő gént publikáltak, a *bcar1*-et *Ictalurus punctatus*-ban (BAO ET AL., 2019). Emellett új-generációs szekvenálás és transzkriptóma analízis segítségével néhány fajban leírták a feltételezhető MSD gént, mint például a *ptf1aY*-t *Leiocassis longirostris* fajban (YE ET AL., 2023), az *amhr2* hím specifikus duplikátumát, az *amhr2by*-t a *Pangasiidae* családban (WEN ET AL., 2022) és az *amhr2Y*-t *Silurus asotus* fajban (ZHENG ET AL., 2023), valamint 16 lehetséges gént *Pseudobagrus ussuriensis* (ZHU ET AL., 2022) fajban. A fenti potenciális gének elsődleges ivardetermináló funkciójának bizonyítása ezekben a fajokban azonban még további vizsgálatokat igényel.

Előbbieken túl nem tisztázott még az ivardeterminációs faktorok elsődleges megnyilvánulásának a helye sem. Gerinceseknél régóta ismert, hogy megfigyelhetőek ivaronkénti különbségek az agyban, melyek különböző viselkedési és élettani különbségek kialakításában vesznek részt (GORSKI, 1985). Nem világos azonban, hogy az agyban megfigyelhető ivaronkénti különbségek az ivarszervből származó faktorok hatására alakulnak ki, vagy fordítva (RAJENDIRAN ET AL., 2021; SENTHILKUMARAN ET AL., 2015). A feltételezhetően poligénes ivardeterminációs mechanizmussal rendelkező zebradánióban (*Danio rerio*) például az agyban kifejeződő *gnrh3* gén kiütése szignifikánsan magasabb hím ivararányt okozott (FENG ET AL., 2020), mely az agyi ivardetermináció jelenségét valószínűsíti.

1. táblázat: A monofaktoriális genetikai ivardetermináló rendszerrel rendelkező csontos halak ivardetermináló „mestergénjei” (MSD)

Faj	Rend	MSD gén	Ivardeterminációs rendszer	Molekuláris funkció	Jelátviteli út	Referencia
<i>Odontesthes hatcheri</i>	<i>Atheriniformes</i>	<i>amhy</i>	XX/XY	szekréciós fehérje	TGF- β	HATTORI 2012
<i>Oryzias latipes</i>	<i>Beloniformes</i>	<i>dmy</i>	XX/XY	transzkripció faktor		MATSUDA 2002, NANDA 2002
<i>Oryzias luzonensis</i>	<i>Beloniformes</i>	<i>gsdf</i>	XX/XY	szekréciós fehérje	TGF- β	MYOSHO 2012
<i>Oryzias dancena</i>	<i>Beloniformes</i>	<i>sox3</i>	XX/XY	transzkripció faktor		TAKEHANA 2014
<i>Sariola</i> fajok	<i>Carangiformes</i>	<i>hsd17b1</i>	ZZ/ZW	szekréciós fehérje	TGF- β	KOYAMA 2019
<i>Astynax mexicanus</i>	<i>Characiformes</i>	<i>gdf6b</i>	XX/XY+B	szekréciós fehérje	TGF- β	IMARAZENE 2021
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Cichliformes</i>	<i>amhy</i>	XX/XY	szekréciós fehérje	TGF- β	LI 2015
<i>Clupea harengus</i>	<i>Clupeiformes</i>	<i>bmpr1bby</i>	XX/XY	hormon receptor	TGF- β	RAFATI 2020
<i>Nothobranchius furzeri</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>gdf6y</i>	XX/XY	szekréciós fehérje	TGF- β	REICHWALD 2015
<i>Esox lucius</i>	<i>Esociformes</i>	<i>amhy</i>	XX/XY	szekréciós fehérje	TGF- β	PAN 2019
<i>Gadus morhua</i>	<i>Gadiformes</i>	<i>zky</i>	XX/XY	transzkripció faktor		KIRUBAKARAN 2019
<i>Plecoglossus altivelis</i>	<i>Osmeriformes</i>	<i>amhr2by</i>	XX/XY	hormon receptor	TGF- β	NAKAMOTO 2021
<i>Perca flavescens</i>	<i>Perciformes</i>	<i>amhr2by</i>	XX/XY	hormon receptor	TGF- β	FERON 2020
<i>Sebastes schlegelii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>amhy</i>	XX/XY	szekréciós fehérje	TGF- β	SONG 2021
<i>Anoplopoma fimbria</i>	<i>Perciformes</i>	<i>gsdf</i>	XX/XY	szekréciós fehérje	TGF- β	HERPIN 2021
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	<i>Pleuronectiformes</i>	<i>dmrt1</i>	ZZ/ZW + TE	transzkripció faktor		CHEN 2014
<i>Scophthalmus maximus</i>	<i>Pleuronectiformes</i>	<i>sox2</i>	ZZ/ZW	transzkripció faktor		MARTÍNEZ 2021
Salmoniformes fajok	<i>Salmoniformes</i>	<i>sdY</i>	XX/XY	transzkripció faktor		YANO 2012
<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>bcar1</i>	XX/XY	szekréciós fehérje		BAO 2019
<i>Takifugu rubripes</i>	<i>Tetraodontiformes</i>	<i>amhr2</i>	XX/XY	hormon receptor	TGF- β	KAMIYA 2012
<i>Takifugu obscurus</i>	<i>Tetraodontiformes</i>	<i>amhr2</i>	XX/XY	hormon receptor	TGF- β	DUAN 2021

3.2. Ivari markerek halaknál

A halak ivardeterminációs mechanizmusára jellemző sokféleség szükségessé teszi az ivari markerek alkalmazását. Az ivar-specifikus DNS markerek lehetnek AFLP [Amplified Fragment Length Polymorphism (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999)], RAPD [Random Amplified Polymorphic DNA (HADRYN ET AL., 1992)], RFLP [Restriction Fragment Length Polymorphism (TANKSLEY ET AL., 1989)], SCAR [Sequence Characterized Amplified Region (KIRAN ET AL., 2010)], SSR [Simple Sequence Repeat (POWELL ET AL., 1996)] vagy SNP [Single Nucleotide Polymorphism (GUPTA ET AL., 2001)] markerek. Több halfajból, köztük 11 harcsa fajból izoláltak ivar-specifikus DNS markereket (**2. táblázat**), melyek sokféle területen alkalmazhatóak. Az ivari markerek gyakorlati alkalmazásuk mellett lehetővé teszik az ivardeterminációs mechanizmus feltárását, valamint az ivardetermináló régió helyének meghatározását a genomban.

A *Pelteobagrus fulvidraco* fajból izolált két SCAR markert például sikeresen alkalmazták hím egyivarú populációk létrehozásához, ami az akvakultúras termelés szempontjából rendkívül kedvező, mivel ennél a fajnál a tejesek kétszer akkora nőnek, mint az ikrások (WANG ET AL., 2009). *Pimephales promelas* fajban egy AFLP marker segítségével detektálták a hormon kezelés hatására történő ivarátfordulást tudományos kísérletek ellenőrzésére (OLMSTEAD ET AL., 2011). Emellett az ivar-specifikus markerek sokszor nagyobb megbízhatósággal alkalmazhatóak az ivar meghatározására, mint a fenotípusos jegyek alapján történő ivarmeghatározás. *Oncorhynchus mykiss* bizonyos vonalaiban például egy SCAR marker 92-100%-os megbízhatósággal működött az ivar meghatározásában (FELIP ET AL., 2005), *Ictalurus punctatus* fajban pedig a külső jegyek alapján történő ivarmeghatározás csak 70%-ban, míg egy ivar-specifikus mikroszatellit marker (AUEST0678) 100%-ban alkalmas volt az ivarok elkülönítésére (NINWICHIAN ET AL., 2012).

Kutatócsoportunk elődjében izoláltak afrikai harcsából egy hím-specifikus DNS markert (CgaY1, NCBI génbanki azonosító: AF332597) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analízis segítségével a Szarvas Fish Kft. állományából származó, „poolozott” tejes és ikrás DNS mintákon (KOVÁCS ET AL., 2001). A CgaY1 markert megszekvenálták, egy szülőpár keresztezéséből származó 179 egyeden validálták és SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) markerré alakították, mely lehetővé teszi a molekuláris ivarmeghatározást már zigóta kortól, az ivari dimorfizmus fenotípusos jegyeinek megjelenése előtt.

2. táblázat: A *Siluriformes* rend fajaiból izolált ivar-specifikus DNS markerek [forrás: (BALOGH ET AL., 2023), az azóta publikált ivar-specifikus markerekkel kiegészítve]

Faj	Család	A marker típusa	Ivari kromoszóma rendszer	Markerek száma	Lókuszt-specifikus marker	Hatékonyság	Validálás (egyedek száma)	Több generációs tesztelés	Referencia
<i>Clarias gariepinus</i>	<i>Clariidae</i>	RAPD	XX/XY	2	Igen	100% 95%	Igen (179)	Nem	(KOVÁCS ET AL., 2001)
<i>Clarias gariepinus</i>	<i>Clariidae</i>	SCAR	XX/XY	1*	Igen	96,4%	Igen (630)	Igen	(BALOGH ET AL., 2023)
<i>Clarias gariepinus</i>	<i>Clariidae</i>	PA & SNP	XX/XY és ZZ/ZW	41 & 25	Nem	Nincs adat	Nem	Nem	(NGUYEN ET AL., 2021a)
<i>Clarias fuscus</i>	<i>Clariidae</i>	SNP	XX/XY	5	Igen	100%	Igen (84)	Nem	(LIN ET AL., 2022)
<i>Clarias macrocephalus</i>	<i>Clariidae</i>	PA & SNP	XX/XY	17 & 7	Igen	100%	Igen (30)	Nem	(NGUYEN ET AL., 2021b)
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	<i>Bagridae</i>	AFLP	XX/XY	6	Igen	100%	Igen (577)	Nem	(WANG ET AL., 2009)
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	<i>Bagridae</i>	AFLP	XX/XY	3	Igen	100%	Igen (80)	Nem	(DAN ET AL., 2013)
<i>Pelteobagrus vachelli</i>	<i>Bagridae</i>	SNP	XX/XY	12	Igen	100%	Nem	Nem	(ZHANG ET AL., 2020)
<i>Pseudobagrus ussuriensis</i>	<i>Bagridae</i>	Microszat.	XX/XY	1	Igen	100%	Igen (185)	Nem	(ZHU ET AL., 2018)
<i>Hemibagrus wyckioides</i>	<i>Bagridae</i>	2b-RAD-tags/SNP	XX/XY	67	Nem	44,2-85,7%	Nem	Nem	(ZHOU ET AL., 2021)
<i>Leiocassis longirostris</i>	<i>Bagridae</i>	2b-RAD-tags	XX/XY	1	Igen	100%	Igen (230)	Nem	(DAI ET AL., 2022)
<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>Ictaluridae</i>	Microszat. & SNP/SCAR	XX/XY	25	Igen	100%	Igen (80)	Nem	(NINWICHIAN ET AL., 2012)
<i>Silurus asotus</i>	<i>Siluridae</i>	SCAR	XX/XY	3	Igen	91,78%	Igen (106)	Nem	(XIE ET AL., 2023)
<i>Silurus lanzhouensis</i>	<i>Siluridae</i>	2b-RAD-tags/SNP	XX/XY	3	Igen	100%	Igen (76)	Igen**	(WANG ET AL., 2021)
<i>Silurus meridionalis</i>	<i>Siluridae</i>	k-mer	XX/XY	8	Igen	100%	Igen (165)	Nem	(ZHENG ET AL., 2020)

* Kovács és munkatársai által izolált CgaY1 marker

** Két generáción tesztelve

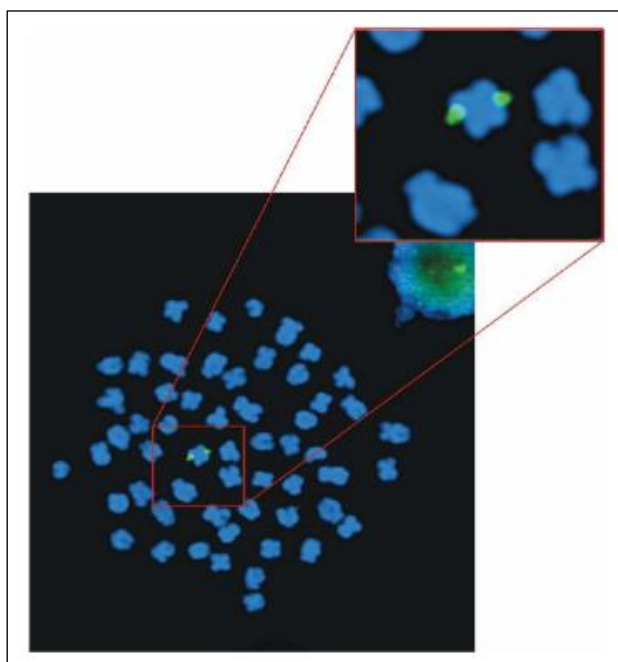
3.3. Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszere

Az afrikai harcsa (**2. ábra**) gonkronisztikus (váltivarú) faj. Ivardeterminációs rendszerét több kutatócsoport is vizsgálta, azonban ellentmondásos eredményeket kaptak. Néhányan női heterogametikus (ZZ/ZW) ivardeterminációs rendszert feltételeztek kariológiai vizsgálat, valamint a gynogenetikus utódok ivararánya alapján (OZOUF-COSTAZ ET AL., 1990; VÁRADI ET AL., 1999), mások viszont hím heterogametikus (XX/XY) mechanizmust írtak le gynogenezissel, illetve önmegtermékenyítéssel létrehozott utódok ivararánya alapján (GALBUSERA ET AL., 2000; LIU ET AL., 1996). Egy nemrég megjelent publikációban (NGUYEN ET AL., 2021a) a kétféle ivardeterminációs rendszer együttes jelenlétét írták le a faj ázsiai populációjában, mivel mind hím, mind női ivarhoz mérsékelten kötött ivari (moderately sex-linked) markereket izoláltak. A 41 hím és 25 női DNS markert DArT (Diversity Arrays Technology) technológia segítségével izolálták, mely az egész genomra kiterjedő, előzetes szekvencia információt nem igénylő, hibridizációt tartalmazó eljárás. A technológia során a genomi DNS-t restrikciós enzimekkel emésztik, speciális fragmenseket kapcsolnak hozzájuk, majd ezeket egy microarray felületére hibridizálják és detektálják a fluoreszcens jelet (JACCOUD ET AL., 2001). A vizsgálathoz 30 Thaiföldről származó egyedet használtak fel (**2. táblázat**).



2. ábra: Afrikai harcsa sötét és világos színű változatai.

A kutatócsoportunk elődjében, afrikai harcsából izolált CgaY1 hím-specifikus DNS markert (KOVÁCS ET AL., 2001) egy együttműködés keretében Catherine Ozouf-Costaz hibridizációs kromoszóma vizsgálat (fluoreszcens *in situ* hibridizáció) segítségével csak a hím afrikai harcsa kromoszómakészlet egyetlen metacentrikus kromoszómáján (annak mindkét karján, ugyanabban a pozícióban) mutatta ki; sem a hím ivar homológ kromoszómáján, sem az ikrás kromoszómakészletben nem detektálták (3. ábra). A fenti eredmények a hím heterogametikus (XX/XY) ivardeterminációs rendszer jelenlétét támasztják alá a faj magyarországi populációiban.



3. ábra: Afrikai harcsán (tejes) végzett fluoreszcens kromoszóma hibridizáció a CgaY1 hím-specifikus DNS markerrel [forrás: (KOVÁCS, 2004)]

Korábbi kísérletek (SANTI ET AL., 2016; SANTI ET AL., 2017) során vizsgálták az afrikai harcsa hőmérséklet hatására történő ivarátfordulásának lehetőségét is. Santi és munkatársai holland állományokból származó populációkon 100% hím ivararányt is elértek 36 °C-os vízhőmérsékleten tartott családokban, ezek alapján feltételezték, hogy a genetikai ivarmeghatározás környezeti hatással felülírható. A hőmérséklet hatására történő ivarátfordulás kritikus szenzitív időszakát, amikor a legnagyobb hím ivararány elérhető, a kikelést követő 6-8. nap között határozták meg. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy nagy családonkénti eltéréseket tapasztaltak az ivararányokban, mely erős szülői hatásra utal a hőmérsékletre adott válasz

tekintetében. A hőmérséklet hatására történő ivarátfordulást nem bizonyították molekuláris módszerekkel, csupán az állomány ivararánya alapján következtettek a jelenségre.

Egy későbbi vizsgálat során (SANTI ET AL., 2019) a magas hőmérsékleti (36 °C) kezelést követően mérték a három legfontosabb szteroid hormon (17 β -ösztradiol E2, tesztoszteron T, 11-ketotesztesztoszteron 11-KT) mennyiségét, és néhány gén (*foxl2*, *cyp19a1b*, *dmrt1*) hírvivő RNS-ének (mRNS) mennyiségét is. Molekuláris ivarmeghatározást nem alkalmaztak, azonban fenotípus alapján 64 és 100% közötti hím ivararányt figyeltek meg a 36 °C-os hőmérsékleten nevelt csoportokban. A szteroid hormonok mennyiségében nem tapasztaltak eltérést a hőkezelt és a kontroll csoportok között, sem a kezelés alatt, sem azt követően. A megtermékenyített ikrák vizsgálatakor viszont azt találták, hogy azokban a csoportokban, ahol a hőkezelés magasabb hím ivararányt eredményezett, a 11-KT mennyisége is magasabb volt. Ezek alapján feltételezték, hogy a szteroid hormonok afrikai harcsában nem játszanak szerepet az ivarátfordulás folyamatában, azonban a korai, feltételezhetően anyai eredetű hormonok összefüggést mutatnak az ivarátfordulás képességével. A *cyp19a1b* és a *dmrt1* mRNS mennyisége nem mutatott különbséget a hőkezelt és a kontroll (28 °C) csoportok között, a *foxl2* mRNS pedig a korai fejlődési stádiumokban (14 napos korig) nem volt kimutatható. A magasabb hím ivararányú (100% körüli) hőkezelt csoportokban viszont magasabb *dmrt1* és alacsonyabb *cyp19a1b* mRNS mennyiséget detektáltak az agyban, mint az alacsonyabb hím ivararányú (60% körüli) hőkezelt csoportokban. Ennek alapján feltételezték, hogy a jelenség molekuláris hátterében ezen gének állhatnak, valamint, hogy az ivarátfordulás mechanizmusának kezdete az agyból származó jelekre vezethető vissza. Megjegyzendő azonban, hogy a magasabb hím ivararány a vizsgált mintákban önmagában is magyarázatul szolgálhat a magasabb *dmrt1* és alacsonyabb *cyp19a1b* mRNS mennyiségre egy vizsgálati csoportban.

Nemrég publikálták egy afrikai harcsa teljes genom szekvenciáját egy nem lektorált „preprint” publikációk számára fenntartott online repozitóriumban, mely a későbbi kutatások számára alapul szolgálhat (NGUINKAL ET AL., 2023). A vizsgálathoz egy ivarérett példányból származó izom, máj és here szöveteket használtak. A leolvasott szekvenciákat (read-eket) négyféle platform felhasználásával generálták: Oxford Nanopore (ONT) hosszú read, PacBio nagy megbízhatóságú (high-fidelity, HiFi) szekvenciák, Illumina rövid paired-end (a DNS fragment mindkét végét meghatározták) read és Hi-C read (kromatinhoz kötődő szekvenciák, amelyek az illesztési hibák korrigálását segítik). A szekvenálás mélysége 80x-os volt. A szekvenciákat sikerült kromoszóma szinten (28 kromoszóma) összeilleszteniük és az elsődleges (Prim) összeillesztett genomon (assembly) túl két haplotípust (Hap1 és Hap2) is

közzé tettek. Vizsgálták a kutatócsoportunk elődjében izolált CgaY1 markert is: a Hap1, és a Prim assembly 24-es kromoszómájára sikerült ráilleszteniük azt, ezzel szemben a Hap2 assembly-n nem találtak szignifikáns egyezést. A fenti eredményekből arra következtettek, hogy a Hap1 a tejes, a Hap2 pedig az ikrás haplotípust reprezentálja. A Prim genom mérete 969,72 Mb, a két haplotípus között viszont szignifikáns méret különbséget (18Mb) találtak, amit az eltérő méretű ivari kromoszómával magyaráztak (972,60 Mb Hap1 és 954,24 Mb Hap2). Az illesztett genomok mérete alapján ZZ/ZW ivardeterminációs rendszert javasoltak, de az ivari kromoszómák jellemzését nem végezték el. Nguinkal és munkatársai a CgaY1 markeren kívül egy másik, szintén a kutatócsoportunk elődjében izolált (KOVÁCS ET AL., 2001) hím-specifikus markert, a CgaY2-t (AF332598; 458 bp) is megpróbálták mindhárom összerakott genomra (assembly) ráilleszteni, azonban a CgaY2 markerrel nem sikerült egyezést találniuk egyik illesztett genomban sem.

A genom annotálása során 25.655 proteint kódoló gént prediktáltak, melynek vizsgálataik alapján több mint fele (13.809) genom duplikáció által keletkezett. Kutatócsoportunk is végzett teljes genom szekvenálást afrikai harcsán és a szekvenciák illesztését is elvégezték, az annotálás pedig folyamatban van (nem publikált adat).

3.4. A halak ivari differenciálódása

Gonokronisztikus fajok esetén ivari differenciálódás alatt azt a folyamatot értjük, amikor a bipotenciális ivarszerv herévé vagy petefészekké fejlődik. Yamamoto kétféle gonokronisztikus típust különített el (YAMAMOTO, 1969). Az első típus az úgynevezett „nem differenciálódott” váltivarú fajok, melyre példa az európai angolna [*Anguilla anguilla* (COLOMBO & GRANDI, 1996)] vagy a zebradánió (LUZIO ET AL., 2021; ORBAN ET AL., 2009; TAKAHASHI, 1977). Ezeknél a fajoknál a bipotenciális gonádból az egyedek többségében a fejlődés kezdeti szakaszában petefészekszerű szerv alakul ki, mely később a halak felében eltűnik, szomatikus sejtek jelennek meg benne és herévé alakul. A második típusba az úgynevezett „differenciálódott” váltivarú fajok tartoznak, melyeknél a bipotenciális ivarszervből a here vagy petefészkek egyenes úton fejlődik, interszexuális egyedek elszórtan sem fordulnak elő és a csontshalak viszonylag kevés faja tartozik ide (YAMAMOTO, 1969).

Az ivari differenciálódást megelőzően az ivarsejteket primordiális ősesírasejteknek (PGC, primordial germ cell) nevezzük, melyek az embrionális fejlődés során szomatikus sejtekből alakulnak ki és elvándorolnak az ivari redő területére. A PGC-k általános tulajdonsága, mely az állatvilágban széleskörben jellemző, hogy gömbölyű alakjuk van, aktív

mozgásra képesek és rendelkeznek egy speciális sejtalkotóval (nuage), mely egy membránnal nem határolt elektrondenz, RNS és fehérjetartalmú sejtalkotó (SNEE & MACDONALD, 2004). A nuage-ban található, csontoshalakra jellemző ivarsejt specifikus RNS-kötő fehérjék a Vasa, a Nanos és a Tudor (NISHIMURA & TANAKA, 2014). A PGC-k vándorlása a különböző állatsoportokban különböző fejlődő szöveteken keresztül történik, de bizonyos migrációt irányító mechanizmusok az állatok között konzerváltak. A vándorlást gyakran a receptor tirozin kináz útvonal szabályozza, de különböző külső faktorokat, például kemokineket is igényel, melyek a vándorlás irányát határozzák meg (BARTON ET AL., 2016; RICHARDSON & LEHMANN, 2010).

A vándorlást irányító bonyolult mechanizmusok során, ha például valamelyik környezeti grádiens nincs jelen, a PGC-k polaritása nem megfelelő vagy valamely, a migrációhoz elengedhetetlen génben mutáció keletkezik, a PGC-k vándorlása nem tud megfelelően lejátszódni (ANDERSON ET AL., 1999; LO ET AL., 2011). Ez negatív hatással lehet az ivarszerv kialakulására, és ezen keresztül az egyed termékenységére is.

A vándorlás végeztével a PGC-kból, szomatikus sejtekből (SGP, somatic gonadal precursor) és intersticiális sejtekből kialakul az ivarszerv, mely más-más időpontokban és módon történik a különböző fajoknál. Japán medakában és nílusi tilápiában (*Oreochromis niloticus*) is különbségeket találunk, annak ellenére, hogy mindkettő differenciálódott gonokronisztikus faj. Tilápiában például, ahol négy nappal a termékenyítést követően történik a kikelés, a PGC-k körülbelül három nappal a kikelést követően érik el az ivarszerv kezdeménye, a primordium területét. Nyolc napos korban jelenik meg az első ivari dimorfizmus a gonádban: ikrásokban megkezdődik egy nagyarányú sejtosztódás az ivarsejtekben, mely tejeseiben csak tizenöt napos korban figyelhető meg. Az ivari differenciálódás a szomatikus szövetekben 20-25 nappal kikelést követően kezdődik a petefészek üreg és az ondóvezető kialakulásával. A petefészekben a meiózis 25-30 nappal, míg a spermatogenezis 50-70 nappal a kikelést követően kezdődik meg. Ezzel szemben japán medakában az ivari primordium 6-8 nappal a termékenyítést követően, már a kikelést megelőzően kialakul. A differenciálódás már 20 napos korban megfigyelhető a szomatikus szövetekben, de a petefészek üreg csak 30-40 napos korban alakul ki. A spermatogenezis 40-50 napos korban kezdődik. Fentiek alapján látható, hogy fajonként és ivaronként is találunk különbségeket az ivari differenciálódás idejében (SIEGFRIED, 2010).

Megemlítendő ugyanakkor a fenti két faj közötti hasonlóság is. Mindkét esetben a PGC-k nagyobb arányú proliferációja az első ivaronkénti különbség, melyet pár nappal később követ a testi szövetek átalakulása. Ez a jelenség egyéb fajokra, például zebradánióra is jellemző (YE

ET AL., 2019). Zebradánióban amellet, hogy nagyobb mennyiségű PGC-t figyeltek meg ikrásokban az ivari differenciálódás kezdetén, bizonyították is ennek közvetlen hatását az ivarra, a *dead end* protein elcsendesítésével, mely alacsonyabb PGC mennyiséget és ezáltal nagyobb arányú tejes fenotípust eredményezett (TZUNG ET AL., 2015).

Afrikai harcsán a korábbi kutatások során 50 napos kort követően tudtak ivarmeghatározást végezni az ivarszervek morfológiai vizsgálatával (RAGHUVÉER & SENTHILKUMARAN, 2010a; SRIDEVI & SENTHILKUMARAN, 2011). Egyes szerzők szerint afrikai harcsában az ivarszervek differenciálódása ikrásoknál 20, míg tejeseknél 42 nappal a kikelést követően kezdődik meg (BUDD ET AL., 2015), míg mások szerint ikrásoknál 28 nappal a kikelést követően megfigyelhető a petefészek üreg és benne a PGC-k, mint az első fenotípusos ivari jelleg. A herék legkorábban 42 napos korban ismerhetők fel szövettani képen fogazott szélükről, valamint a spermatogóniumok és Leydig sejtek jelenlétéről (VAN DEN HURK ET AL., 1989).

A csontoshalak csoportjában az ivari differenciálódás során sokféle gén szerepet játszik, ezek részletes feltárása további kutatásokat igényelne, ugyanakkor valószínűnek tűnik, hogy bár a folyamatot rendkívül változatos gének indítják be a különböző taxonokban, a kaszkád további lépései sok hasonlóságot mutatnak (HERPIN & SCHARTL, 2011). A herék kialakulásához szükséges és legtöbbet kutatott gének az *amh* (anti-Müllerian hormone), a *dmrt* (Doublesex and Mab-3 related transcription factor) és a *sox* (SRY-related HMG box) géncsalád tagjai (HERPIN & SCHARTL, 2011; HU ET AL., 2021). A petefészek differenciálódásában leírtak többek között a *foxl2*, *cyp19*, *wnt4*, *rspo1* és a *ctnnb1* szerepét (NISHIMURA & TANAKA, 2014).

3.5. A vizsgált gének áttekintése

Vizsgálataim célja az ivardetermináció kezdetének és helyének pontosítása volt, ezért olyan gének kifejeződését vizsgáltam, melyek az irodalmi adatok alapján más fajok korai ivarfejlődésében szerepet játszanak. Emellet vizsgáltam olyan géneket is (*mark2*, *pten*), melyek szekvencia illesztéses eredményeim alapján (lásd 4.3.3) a CgaY1 hím-specifikus marker közelében helyezkedhetnek el a genomban.

3.5.1. *sox9*

A SOX géncsalád (SRY-related HMG box) nevét a SRY fehérje (Sex-determining region on Y chromosome) után kapta. Tagjai olyan transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek

egy DNS felismerő doménnel, úgynevezett HMG (high mobility group) doménnel rendelkeznek. A HMG domén a DNS kis árkához kötődve, a DNS-t meghajlítva egyéb transzkripciós faktorok kötődését segíti elő, azonban néhányuk [pl. *sox9* (SRY-box transcription factor 9)] van transzaktiváló doménje is.

A SOX9 gén kifejeződését emlősökben az SRY gén expressziója indukálja, mely az ivardeterminációért felelős mestergén. Az SRY hatására a SOX9 az SF1 transzkripciós faktorral együtt egyéb enzimek mellett az AMH (Anti-Müller hormon) gén expresszióját idézi elő, melynek hatására a bipotenciális ivarszervből here fejlődik (KOOPMAN, 1999; VINING ET AL., 2021). A valódi csontoshalak (*Teleostei*) néhány fajában a csoportra jellemző genom duplikáció miatt a *sox9* génnek két ortológja is megtalálható, a *sox9a* és a *sox9b* (KOBAYASHI ET AL., 2008; NAKAMURA ET AL., 2008; QI-YAN ET AL., 2007; RODRÍGUEZ-MARÍ ET AL., 2005). Japán medakában a *sox9b* az ivarszerv differenciálódása során mindkét nemből a csírasejteket körülvevő sejtcsoportban fejeződik ki, melyekből később a Sertoli és a granulóza sejtek alakulnak ki (NAKAMURA ET AL., 2008). Ponty (*Cyprinus carpio*) fajban végzett kísérletek során *sox9b* expressziót figyeltek meg a kifejlett agyban és herében is (QI-YAN ET AL., 2007). Nílusi tilápiában a *sox9a* szintén az ivarsejteket határoló sejtekben fejeződött ki a korai fejlődési stádiumokban, ivarérett halaknál azonban ivar-specifikus expressziót figyeltek meg: *sox9a* hírvivő RNS (mRNS) csak a herében volt kimutatható (KOBAYASHI ET AL., 2008). Zebradánióban már az ivarszervek differenciálódását megelőzően, 17 nappal a termékenyítést követően megfigyelték a *sox9a* kifejeződését. Ugyanebben a fajban, későbbi fejlődési stádiumban (31 nappal a termékenyítést követően) a *sox9a* mRNS a herében, a *sox9b* pedig a petefészekben volt kimutatható (RODRÍGUEZ-MARÍ ET AL., 2005).

A *Siluriformes* rendbe tartozó békaharcsa (*Clarias batrachus*) ivarérett egyedeiben vizsgálták a *sox9* gén expresszióját és azt találták, hogy a *sox9a* az agyban és a herében, a *sox9b* pedig az agyban és a petefészekben fejeződik ki erősebben (BHAT ET AL., 2016a). Afrikai harcsából is sikeresen izolálták a *sox9* mindkét izoformáját, a *sox9a*-t és *sox9b*-t (RAGHUVÉER & SENTHILKUMARAN, 2010b). Raghuveer és munkatársai a *sox9* cDNS-ek filogenetikai vizsgálata során azt találták, hogy az afrikai harcsa *sox9b* szekvenciája a ponty és a zebradánió *sox9b* génjével mutatott szoros rokonságot. Ivarérett afrikai harcsákat vizsgálva génkifejeződés tekintetében a békaharcsához és a zebradánióhoz hasonló mintázatot kaptak, magas *sox9a* expressziót detektáltak az agyban és a herében, míg a *sox9b* az agyban és a petefészekben fejeződött ki erősebben. Egy későbbi kutatásban (RAGHUVÉER ET AL., 2011) vizsgálták a *sox9* génnek korai kifejeződését is afrikai harcsában, azonban az ivaronkénti génexpressziós különbségeket molekuláris ivarmeghatározás nélkül csak 50 napos kor után, a gonádok szöveti

differentiálódását követően vizsgálták. A vizsgálat során a *sox9b* mRNS-ét már 30-40 nappal a kikelést követően kimutatták a bipotenciális ivarszervben, a *sox9a* pedig 50 napos kor után jelent meg a herében.

3.5.2. *sox3*

Szintén a SOX géncsaládba tartozik a *sox3* (SRY-box transcription factor 3) transzkripciós faktor. A SOX3 emlősök esetén az X kromoszómán helyezkedik el, feltételezhetően az SRY őse, az agyban és a gonádokban fejeződik ki, és a neurogenesisben, valamint az ivari differenciálódásban játszik szerepet (ROGERS ET AL., 2013; WEISS ET AL., 2003). A csontoshalak körében zebradánióban (DEE ET AL., 2008; GOU ET AL., 2018a; GOU ET AL., 2018b) és *Paramisgurnus dabryanus* (XIA ET AL., 2018) fajban megfigyelték, hogy a *sox3* az emlősökhöz hasonlóan a neurogenesisben vesz részt, azonban sok egyéb halfaj esetében leírták az ivari differenciálódásban és az ivarszerv fejlődésében játszott fontos szerepét.

Japán medakában például *sox3* expressziót figyelték meg már 2 sejtes embrió állapottól kezdve, mely arra enged következtetni, hogy a korai *sox3* mRNS anyai eredetű. Kifejlett halaknál magas expressziót detektáltak a központi idegrendszerben, az agyban, a szemben és mindkét ivarszervben (PU ET AL., 2022). A közeli rokon *Oryzias dancena* fajban egy, az Y kromoszómán elhelyezkedő cisz reguláló elem a *sox3* gén magasabb expresszióját váltotta ki, melynek hatására a bipotenciális gonádból here fejlődött (TAKEHANA ET AL., 2014). Takehana és munkatársai mind funkcióvesztéses, mind funkciónyeréses mutánsokkal alátámasztották, hogy *O. dancena* fajban a *sox3* kulcsszerepet játszik a hím ivardeterminációban. Protogin hermafrodita fajoknál azonban, mint például a *Epinephelus coioides* a *sox3* inkább az oogenesisben játszik szerepet (YAO ET AL., 2007).

A *Siluriformes* rendbe tartozó fajok közül a *sox3* expresszióját békaharcsa esetében vizsgálták, és azt találták, hogy a *sox3* a 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11- β -hsd) enzimet kódoló gén promóteréhez kötődve annak transzkripcióját, ezáltal pedig a 11-ketotesztoszteron (11-KT) hormon termelését szabályozza, így a herék kialakulásában és funkciójuk betöltésében játszik szerepet (RAJAKUMAR & SENTHILKUMARAN, 2014; RAJAKUMAR & SENTHILKUMARAN, 2016).

Afrikai harcsában Raghuveer és munkatársai (2011) azt találták, hogy a *sox3* már korai fejlődési stádiumban kimutatható volt a bipotenciális gonádban, majd 50 napos kortól expressziója a tejeseekben magasabb, 200 és 300 napos korban pedig szignifikánsan magasabb volt az ikrásokhoz képest.

3.5.3. *foxl2*

A FOXL2 (forkhead box protein L2) gén emlős nőtényekben már igen korai fejlődési stádiumban megjelenik az ivari redőben és a petefészek fenntartásában játszik szerepet (SCHMIDT ET AL., 2004; UHLENHAUT ET AL., 2009). Egér modellen kizárták annak lehetőségét, hogy női ivardetermináló faktor lenne (BARON ET AL., 2005; WILHELM ET AL., 2007), de kiemelt szerepe van a szaporodásbiológiai folyamatokban: a petefészek fenntartásán túl a hipotalamusz FSH (follikulusz stimuláló hormon) termelésében is részt vesz (CORPUZ ET AL., 2010; JUSTICE ET AL., 2011).

Az emlős modellek mellett több halfaj esetében is leírták a *foxl2* gén szerepét a női ivar kialakításában: nílusi tilápiában például csak a petefészekben detektáltak *foxl2* mRNS-t, herében nem (WANG ET AL., 2004), emellett ikrás genotípusú (XX) *foxl2*^{-/-} mutánsok esetén ivarátfordulást figyeltek meg (ZHANG ET AL., 2017). A *foxl2* génről átíródó fehérje az aromatáz (P450) enzimet kódoló gén transzkripcióját serkenti, mely a tesztoszteron (T) 17β-ösztradiollá (E2) alakítását végzi. Több, hőmérséklet-általi ivarátfordításra érzékeny halfajnál (*Oreochromis niloticus*, *Paralichthys olivaceus*) leírták, hogy magas hőmérséklet hatására mind a *foxl2*, mind az aromatázt kódoló *cyp19* gén expressziója magas hőmérsékleten alacsonyabb, mely hím fenotípust eredményez (BAROILLER ET AL., 2009b; D'COTTA ET AL., 2001).

A csontos halak több fájában, például *Oncorhynchus mykiss* (BARON ET AL., 2004), *Dicentrarchus labrax* (CRESPO ET AL., 2013), *Gobiocypris rarus* fajokban (JIANG ET AL., 2011) és zebradánióban (YANG ET AL., 2017) a *foxl2* gén két paralógját, a *foxl2a*-t és *foxl2b*-t is leírták. *Oncorhynchus mykiss* fajban mindkét paralóg a petefészek érésében játszik szerepet és az expressziós vizsgálatok alapján kifejeződésük szoros korrelációt mutat az aromatáz enzim mennyiségével (BARON ET AL., 2004). Zebradánióban létrehozott *foxl2a*^{-/-} és *foxl2b*^{-/-} mutánsokban a kezdeti petefészek differenciálódás és oocyta fejlődés nem volt akadályozott, de kifejlett halak esetén *foxl2a*^{-/-}/*foxl2b*^{-/-} dupla mutáns ikrásokban ivarátfordulást figyeltek meg és feltételezték a *foxl2b* domináns szerepét a petefészek fenntartásában (YANG ET AL., 2017). A *foxl2* filogenetikai analízise alapján Crespo és munkatársai feltételezték, hogy a két *foxl2* paralóg egy, a csontos halakra jellemző genom duplikációnál korábbi genom duplikáció során keletkezett, és míg a *foxl2a* a legtöbb gerinces fajban megmaradt, addig a *foxl2b* a tetrapódák között többször eltűnt. Előbbiek alapján javasolták a *foxl2a* és *foxl2b* átnevezését *foxl2* és *foxl3* génre. *Dicentrarchus labrax* fajon végzett vizsgálataik azt mutatták, hogy a *foxl2a/foxl2* mRNS mennyisége a petefészekben, a *foxl2b/foxl3* pedig a herében változott szignifikánsan a szaporodási ciklus alatt (CRESPO ET AL., 2013).

A *Siluriformes* rendbe tartozó fajok közül a *foxl2* gén kifejeződését *Silurus meridionalis* fajban vizsgálták és azt találták, hogy 65 nappal a kikelést követően a *foxl2* mRNS csak az agyban, az agyalapi mirigyben, a kopolytúban és a gonádokban volt kimutatható, a legmagasabb értéket a petefészek mutatta. Aromatáz inhibitor (fadrozol) és ösztrogén receptor antagonist (tamoxifen) kezelés hatására a *foxl2* expressziója csökkent az agyban és a gonádban, míg ösztadiol (E2) kezelés után nőtt. A fenti eredményekből arra következtettek, hogy a *foxl2* gén az agy-agyalapi mirigy-ivarszerv szabályozási útvonalon a hormon szintetizáló enzimeket szabályozza (LIU ET AL., 2007). *Hemibagrus wykioides* fajon végzett vizsgálatok során szintén azt találták, hogy a *foxl2* a női ivarhoz kötött (WEI ET AL., 2023). A *Clarias* fajok közül *C. fuscus*ban magas *foxl2* expressziót találtak a petefészekben az ivarszer differenciálódása előtt (DENG ET AL., 2015). A békaharcsából izolált *foxl2* gén 91%-os homológiát mutatott az afrikai harcsáéval és ivarérett halakat vizsgálva kifejeződése magasabb volt a nőstény agyban, agyalapi mirigyben és a petefészekben a hímekhez viszonyítva (BHAT ET AL., 2016b).

Afrikai harcsán a *foxl2* kifejeződését 50 napos kort követően vizsgálták az ivarszervekben ivaronként, korábbi fejlődési stádiumokban pedig a bipotenciális gonádban. Raghuveer és munkatársai a *foxl2* mRNS mennyiségét az agyban nem vizsgálták, az ivarszerv vizsgálata során pedig azt találták, hogy a *foxl2* kismértékben emelkedett már 20-30 nappal a kikelést követően, 50 napos kortól pedig szignifikánsan magasabb volt a petefészekben (RAGHUVEER ET AL., 2011).

3.5.4. *vasa*

A VASA (DDX4) gén olyan fehérjét kódol, mely a „DEAD-box” RNS helikázok csoportjába tartozik, emlősökben csak a vándorló primordiális őscsírsejtekben (PGC, primordial germ cell), az ivari redő területén és a felnőtt ivarsejtekben (spermatocitákban és fejlett oocytákban) fejeződik ki (CASTRILLON ET AL., 2000), emiatt alkalmas marker a PGC-k kimutatására.

Az emlősökhöz hasonlóan, a sugarasúszójú halak több fájában *vasa* expressziót figyeltek meg a PGC-kben vándorlás és osztódás során (HUANG ET AL., 2014; KNAUT ET AL., 2000; KOBAYASHI ET AL., 2000; SHINOMIYA ET AL., 2000), illetve ivarérett egyedek ivarszervében (WU ET AL., 2014). Bizonyos fajokban, például *Ctenopharyngodon idella*-ban a *vasa* transzkriptek már 2 sejtes állapottól kezdve kimutathatóak, ami arra utal, hogy anyai eredetű RNS van jelen a fejlődés kezdeti szakaszában (LI ET AL., 2010). *Cynoglossus semilaevis* fajban a *vasa* gén kifejeződésének vizsgálata során azt találták, hogy a PGC-k vándorlása elején

a tejésekben, a vándorlás végén az ikrásokban volt magasabb az mRNS mennyisége, mindkét ivarban csökkenő tendenciával, mely az anyai eredetű *vasa* degradációjára utal. Ezzel ellentétben az ivarszerv differenciálódása során kezdetben az ikrások, később a tejések rendelkeztek magasabb értékkel, mindkét ivarban növekvő tendenciával (HUANG ET AL., 2014).

A *Siluriformes* rendbe tartozó fajok közül a *vasa* expresszióját *Rhamdia quelen* fajban vizsgálták, ahol korai fejlődési stádiumban feltehetően anyai eredetű és csak a PGC-kben kimutatható *vasa* mRNS-t figyeltek meg (RICCI ET AL., 2018). *Pangasianodon hypophthalmus* *vasa* génjére tervezett antiszensz próba segítségével *in situ* hibridizációval vizsgálták a PGC-k vándorlását (DUANGKAEW ET AL., 2019) és azt találták, hogy 10 nappal a kikelést követően a PGC-k már az ivari redő területén találhatók. Ebben a fajban az ivari redő 15 napos korban alakult ki, a testi sejtek 20 napos korban zárták körbe a PGC-ket, melyek proliferációja 25 nappal a kikelést követően kezdődött meg.

Afrikai harcsa gonádból is izolálták a *vasa* gént kódoló szekvenciát és kimutatták, hogy felnőtt halakban csak az ivarszervben fejeződik ki. A fiatal állatok teljes testéből izolált RNS és a felnőtt ivarszerv vizsgálata azt mutatta, hogy 0-12-órával a kikelést követően stabil, majd ezt követően 12 óráig csökkenő a *vasa* transzkriptek mennyisége, mely valószínűleg anyai eredetű. Később, 10-20 napos korban kezdett a *vasa* mennyisége ismét emelkedni és 50-100 napos korban érte el a csúcsát (RAGHUVeer & SENTHILKUMARAN, 2010a).

3.5.5. *amhr2*

Az *amh* (anti-Müller hormon) a TGF- β útvonal tagja. Emlősökben az embrionális fejlődés során hímeiben a Müller-cső regresszióját okozza, mely nőstényekben a későbbiekben a petevezetékké alakul. Hímeiben a Sertolli sejtekben, nőstényekben a granulóza sejtekben fejeződik ki. Az *amh* egy szerin-treonin kináz receptorhoz, az *amhr2*-höz kötődve indukálja Müller-cső regresszióját, mely emlősök esetén a Müller-cső mezenchimájában található (MULLEN & BEHRINGER, 2014; MULLEN ET AL., 2019).

A valódi csontoshalak az állkapcsos gerincesek egyetlen csoportja, mely nem rendelkezik Müller-csővel, azonban az *amh/amhr2* szignáltranszdukciós útvonal a halak sok fajában fontos szerepet játszik az ivari fejlődés szempontjából. Az útvonal az evolúciós szempontból ősi taxonokban a primordiális őscsírasejtek túlélését és proliferációját szabályozza (ADOLFI ET AL., 2019). Több halfajban, például japán medakában, nílusi tilápiában és farkassügérben megfigyelték az *amh*, valamint az *amhr2* mRNS-ek magasabb mennyiségét tejeseiben, mint ikrásokban (IJIRI ET AL., 2008; KLÜVER ET AL., 2007; MORINAGA ET AL., 2007). Japán medakában (MORINAGA ET AL., 2007) *amhr2* funkcióvesztéses mutánsokban a primordiális őscsírasejtek túlzott proliferációját és az XY genotípusú egyedek felében ikrás irányba történő ivarátfordulást figyeltek meg. *Paralichthys olivaceus* fajban, mely XX/XY genetikai ivardeterminációs mechanizmussal rendelkezik, de magas hőmérséklet hatására hím ivar irányába történő ivarátfordulás figyelhető meg, mind a tejeseiben, mind az az ivarátfordulás időszakában magasabb *amh* mennyiséget figyeltek meg. *Amhr2* funkcióvesztéses mutánsokban pedig medakához hasonlóan ikrás irányba történő ivarátfordulást írtak le (YAMAGUCHI & KITANO, 2023). A zebradánió nem rendelkezik *amhr2* receptorral, de *amh* hormonnal igen. *Amh* géncsendesített mutánson végzett kísérletek alapján leírták, hogy az *amh* 2-es típusú receptora nélkül is képes az ivarsejtek proliferációjának ésérésének szabályozására (YAN ET AL., 2019).

A *Siluriformes* rendbe tartozó fajok közül két esetben is leírták az *amhr2* Y-specifikus duplikátumát, mint potenciális ivardetermináló gént: az *amhr2by*-t a *Pangasiidae* családban (WEN ET AL., 2022) és az *amhr2Y*-t *Silurus asotus* fajban (ZHENG ET AL., 2023). Tudomásom szerint az *amhr2* mRNS-ek mennyiségét harcsaféléken még nem vizsgálták.

3.5.6. *mark2*

A MARK2 (Microtubule Affinity Regulating Kinase 2) a MARK fehérje családba tartozik, mely fehérjék egyéb, mikrotubulushoz asszociált proteinek (MAPs), például a tau, MAP2 vagy MAP4 foszforilációját végzik a mikrotubulus-kötő doménjükön, ezáltal ezek

disszociációját, valamint emelkedett mikrotubulus dinamikát eredményeznek (DREWES ET AL., 1997). A MARK2 egy szerin-treonin kináz. Emberekben többféle celluláris folyamatban szerepet játszik, például az Alzheimer-kór kialakulásában (GU ET AL., 2013), DNS javító folyamatokban, illetve tüdőrák esetén a rosszindulatú fenotípus elősegítésében (HUBAUX ET AL., 2015).

A sugarasúszójú halak közül zebradánióban bizonyították tauopátiás modell vonal segítségével, ahol a tau fehérje túlzott mértékben jelen van és a mikrotubulusokhoz kötődve a mitokondriumokhoz történő transzportot akadályozza, hogy a MARK2 túlexpresszállása segíti a tauopátiás fenotípus megszüntetését (PLUCIŃSKA ET AL., 2012). A *mark2* hatását az ivari fejlődésre tudomásom szerint még semmilyen halfajnál nem írták le.

3.5.7. *pten*

A PTEN (foszfatáz és tenzin homológ) tumorszupresszor gén egy foszfatáz enzimet kódol, amely a sejtek osztódását gátolja, emlősökben fontos szerepet játszik a programozott sejthalállal kapcsolatos funkcióban, a sejtek vándorlásában, nélkülözhetetlen az embrionális fejlődéshez (CHU & TARNAWSKI, 2004; YIN & SHEN, 2008). Egér modellen és sejt kultúrában vizsgáltak olyan primordiális őscsírasejteket (PGC), melyeknél a PTEN génben PGC specifikus deléciót idéztek elő (KIMURA ET AL., 2003). A kísérlet egereken tumort okozott, sejt kultúrában pedig megfigyelték, hogy a PGC-k PTEN hiányában magasabb proliferációval rendelkeznek és hajlamosak pluripotens embrionális csírasejt kolóniát létrehozni.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Afrikai harcsa kísérleti állomány

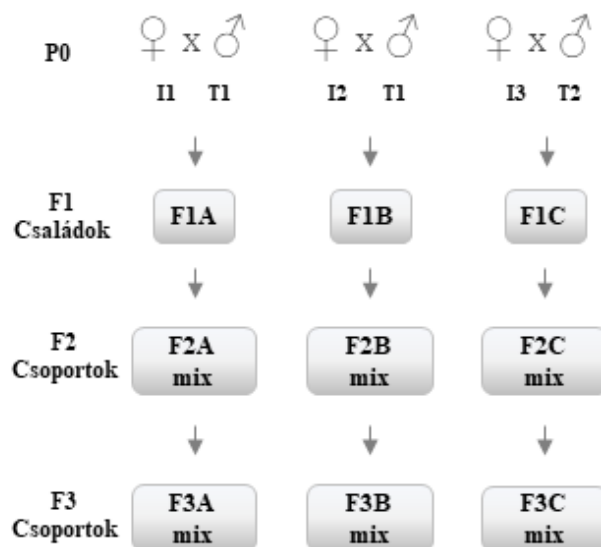
4.1.1. Magyar állomány RAS (recirkulációs akvakultúrás) rendszerben

4.1.1.1. Az anyaállomány eredete

A tenyészállomány (P0) öt egyedből állt (12-24 hónapos halak, 2430 ± 1000 g átlagos testtömeg), melyek három különböző telephelyről származtak. Magyarországon elsőként a Szarvas Fish Kft. alakított ki tenyésztési céllal afrikai harcsa állományt a 80-as évek közepén, Szarvason (GPS: $46^{\circ}52'0.0''$ N $20^{\circ}33'0.0''$ E), a Wageningen Egyetem (Hollandia) tenyészállományából származó 200 egyedből (RADICS ET AL., 1994). Ezt követően többször frissítették az állományt európai, elsősorban holland származású egyedekkel. A kísérletemben használt egyik P0 egyed a Jászkiséri Halas Kft. (GPS: $47^{\circ}28'51.0''$ N $22^{\circ}15'22.3''$ E) állományából származott, melyet Szarvasról vásárolt halak keresztezéséből alakítottak ki (Borbély Gyula, személyes kommunikáció). Kettő P0 anyahal a Szarvas Fish Kft. tukai (GPS: $47^{\circ}44'31.3''$ N $22^{\circ}02'06.2''$ E) állományából származott, melyeket szintén a szarvasi állományból alakítottak ki 1993-ban és azóta attól elkülönítve tenyésztik őket (Radics Ferenc, személyes kommunikáció). Kettő P0 anyahal a V-95 Kft. nagyatádi (GPS: $47^{\circ}12'34.1''$ N $19^{\circ}22'25.5''$ E) telephelyéről származott, mely állományt a 2010-es években alakították ki különböző magyarországi, lengyelországi, romániai és olasz termelőktől vásárolt halakból (Boros Attila és Varju-Katona Milán, személyes kommunikáció).

4.1.1.2. Keresztezési séma és az állomány tartása

A P0 tenyészállomány minden egyedén molekuláris ivarmeghatározást végeztem a CgaY1 hím-specifikus markerrel (lásd 4.2.4 fejezet) és csak a fenotípusos ivarnak megfelelő ivari markerrel rendelkező egyedeket használtam a keresztezéshez. Az öt egyed szaporításával, egy tejes anyahalat kétszer felhasználva [Nagyatád ♀ (I1) x Tuka ♂ (T1), Jászkisér ♀ (I2) x Tuka ♂ (T1), Tuka ♀ (I3) x Nagyatád ♂ (T2)], három F1 családot hoztam létre (F1A, F1B, F1C család), melyeket három különböző medencében neveltem ivarérikig (kikelést követő 10. hónap, 1278 ± 517 g-os átlagos testtömeg; **4. ábra**). Az F1 generáción nem végeztem molekuláris ivarmeghatározást.



4. ábra: Keresztezési séma afrikai harcsa ivardeterminációs rendszerének vizsgálatához. Az anyaállomány (P0) 5 tenyészegyedből (ikrások- I1, I2, I3 és tejesek- T1, T2) állt. Az F1 generáció családait (F1A, F1B, F1C) és az F2 (F2A, B, C mix) és az F3 (F3A, B, C mix) generáció kevert csoportjait három medencében neveltem. Minden generációt 10-10 tenyészállat páros keresztezésével hoztam létre.

Az F2 generáció kialakítása során véletlenszerűen kiválasztottam a fenotípusos ivari jellegek (az ivari papilla formája) alapján mindhárom családból 10 tejes és 10 ikrás egyed, majd ezeket páros keresztezéssel szaporítottam, ezáltal mindhárom csoportban tíz családot hoztam létre. A tíz családból származó ikrátételt családonként egyenlő arányban kevertem és a kevert csoportokat (F2A mix, F2B mix, F2C mix) három medencében neveltem ivarérésig (kikelést követő 12. hónap, 1958 ± 726 g átlagos testtömeg). Ezt követően molekuláris ivarmeghatározást (lásd 4.2.4-es fejezet) és az egyedek túlaltatását követő boncoláskor eltávolított ivarszerv vizsgálatával fenotípusos ivarmeghatározást (lásd 4.2.3-as fejezet) végeztem. Az F1 családokat és az F2 csoportokat RAS rendszerben, 1 m^3 -es medencékben, 25°C -os vízhőmérsékleten, 16 órás világos és 8 órás sötét periódussal, óránként 80 literes vízcserevel tartottam.

Az F3 generáció létrehozásakor 10 tejes és 10 ikrás halat párosan szaporítottam mindhárom F2 csoportból (F2A Mix, F2B Mix és F2C Mix), csak olyan tenyészállatok felhasználásával, melyeknél a CgaY1 marker szerinti genotípusos és a fenotípusos ivar egyezett. A 10-10 páros keresztezésből származó utódokat csoportonként keverve (F3A Mix, F3B Mix és F3C Mix), három különböző medencében neveltem a kikelést követő 3. hónapig

(37 ± 21 g-os átlagos testtömeg), amikor is molekuláris (lásd 4.2.4) és fenotípusos (lásd 4.2.3) ivarmeghatározást végeztem. Az F3-as kevert csoportokat recirkulációs akvakultúrák (RAS) rendszerben, 12 literes polipropilén medencékben, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízhőmérsékleten, 16 órás világos és 8 órás sötét periódussal, óránként 80 literes vízcserével tartottam.

4.1.1.3. Szaporítás és előnevelés

A szaporítások az általános akvakultúrák gyakorlatnak megfelelően zajlottak: intramuszkuláris Ovopel [$20\text{ }\mu\text{g/kg}$ LHRHa (Luteinizáló hormon serkentő hormon analóg) és 25 mg/kg metaklopramid fiziológiás sóoldatban szuszpendálva, Interfish Kft., Budapest, Magyarország] hátizomba történő injektálásával. Ezt követően vízhőmérséklet függvényében, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, nagyjából 12 órával később, az ovuláló anyák lefejtésével kinyert ikrát *in vitro* fertilizációval termékenyítettem a tejesekből műteti úton eltávolított here gézlapon átnyomott szuszpenziójával. Ikrások esetében 1 kg testtömegre 1 ml , a tejesek esetében pedig 1 kg testtömegre $0,5\text{ ml}$ Ovopel szuszpenziót alkalmaztam.

Páros keresztezéssel 100 g ikrához $0,5\text{ ml}$ tejet mértem és rendszervíz segítségével, az ivartermékeket lassan kevergetve nagyjából 1 perc alatt termékenyítettem, majd a termékenyített ikrát duzzasztottam. Az ikra ragadosságának elvételére nem végeztem kezelést.

A termékenyített ikrát kikelésig ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on nagyjából 24 óráig) csoportonként keverve 7 literes Zuger edényben tartottam. A keltetést követően a lárvákat a szikzacskó felszívódása után (nagyjából 72 óra) 10 napig kizárólag élő sósók (*Artemia salina*) naupilus lárvájával (Ocean Nutrition, Essen, Belgium), 15 napig élő sósók és ivadéktáp keverékével *ad libitum*, majd később Perla Larva és Nutra Pro (Skretting, Stavanger, Norvégia) ivadéktáppal ettettem (a teljes testtömeg 10% -a a kísérlet kezdetén, fokozatosan csökkentve 3% -ig).

A lárvákat és az ivadékhalakat RAS rendszerben, 12 literes polipropilén medencékben, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízhőmérsékleten, 16 órás világos és 8 órás sötét periódussal, óránként 80 literes vízcserével tartottam.

4.1.2. Magyar állomány nevelése átfolyóvízes rendszerben

4.1.2.1. Keresztezési séma és az állomány tartása

Az tenyészállomány (P0) a nagyatádi V-95 Kft. halaiból került kiválasztásra (eredetét lásd 4.1.1). A telepen megmértük 1004 kifejlett egyed testhosszát ($71,6 \pm 7,1\text{ cm}$) és fejhosszát ($20,1 \pm 1,9\text{ cm}$), majd kiválasztottam a legalacsonyabb fejhossz-testhossz ($<0,27$) aránnyal

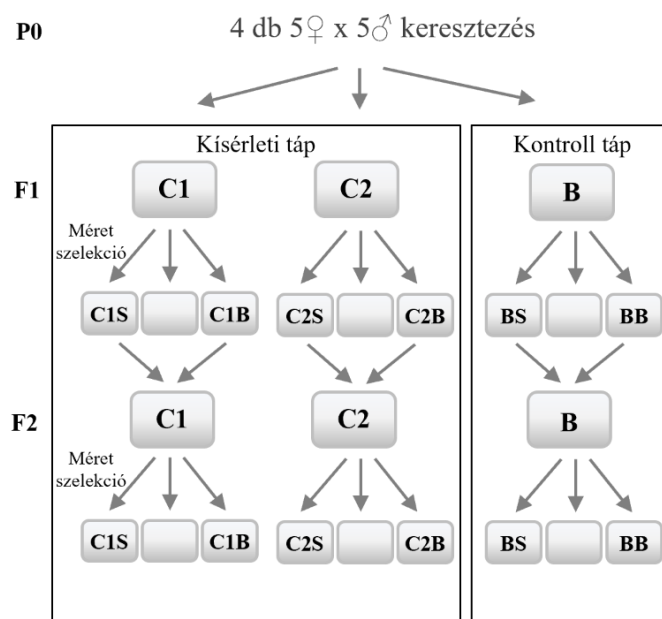
rendelkező tenyész jelöltek közül fenotípus alapján 202 egyed. Ezen egyedek közel felében ($n=96$) ellenőriztem a CgaY1 ivar-specifikus markert és azokat az egyedeket szaporítottam, melyeknél a genotípus és a fenotípus egyezett. Az F1-es generáció létrehozásához 16 ikrás és 18 tejes ivartermékét kevertem 4 db 5x5-ös csoportban, 4 ikrás és 2 tejes halat két csoportban is felhasználva. Egyedenként 60 g ikrához 1 ml tejet mértem, így összesen csoportonként 300 g ikrát termékenyítettem 5 ml tejjel. Rögzítettem az anyahalak testtömegét ($4,3 \pm 1,6$ kg), körméretét ($34,1 \pm 4,9$ cm), testhosszát ($73,6 \pm 8,8$ cm) és fejhosszát ($19,1 \pm 2,3$ cm).

Minden generációban (F1 és F2) két kísérleti (C1, C2) és egy kontroll (B) csoport került kialakításra, melyek kétféle tápot fogyasztottak: egy magasabb halliszt tartalmú (8,1%) kísérleti tápot (Claria Float, Aller Aqua, Christiansfeld, Dánia), valamint egy alacsonyabb halliszt tartalmú (6%) kontroll tápot (Bona Float, Aller Aqua, Christiansfeld, Dánia). Mindkét táp (4,5mm) azonos nyersfehérje (42%) és nyerszsír (12%) tartalommal rendelkezett.

Az F1-es generációban a három csoportot (F1 C1, F1 C2, F1 B) a kannibalizmus kiküszöbölésére méret szerint szétválogattam és mindhárom csoportból a legalacsonyabb (F1 C1S, F1 C2S, F1 BS) és legmagasabb (F1 C1B, F1 C2B, F1 BB) testtömeg értékekkel rendelkező halakat tartottam meg. Az F1 generációt 12 hónapos korig neveltem, majd minden csoportból a kis méretű ikrásokat ($n=10$) nagy méretű tejesekkel ($n=10$), a nagy méretű ikrásokat ($n=10$) pedig kis méretű tejesekkel ($n=10$) kereszteztem az F2 generáció létrehozására, az ivartermékeket 5x5-ös csoportokban keverve, csoportonként 500 g ikrá és 5 ml tej felhasználásával.

Az F2-es generáció csoportjait (F2 C1, F2 C2, F2 B) szintén hat különböző medencében, méret szerint szétválogatva tartottam. A kis méretű (F2 C1S, F2 C2S, F2 BS) és nagy méretű (F2 C1B, F2 C2B, F2 BB) halak nevelése külön történt ivarérett korig (7 hónappal a kikelést követően), amikor rögzítettem a testtömegüket (F2 C1S - 1454 ± 426 g, F2 C1 B - 2078 ± 387 g, F2 C2S - 1049 ± 284 g, F2 C2B - 1855 ± 333 g, F2 BS - 1355 ± 333 g, F2 BB - 1832 ± 338 g) és az ivarukat, valamint farokúszó mintát vettem ddRAD (kétszeresen emésztett restrikciós helyhez kötődő DNS - Double-digest restriction-site associated DNA) könyvtár készítéséhez.

A kísérleti állomány tartása az előnevelést követően (nagyjából 5 dkg-os átlagos testtömeg elérése után) a Bajcsihal Kft. kisbajcsi telephelyének (GPS $47^{\circ}45'08.9''$ N $17^{\circ}41'02.3''$ E) szabadtéri átfolyóvízes rendszerében, fél-üzemi körülmények között, 1800 literes medencékben, $23-24^{\circ}\text{C}$ -os víz hőmérsékleten történt. A keresztezési sémát a **5. ábra** szemlélteti.



5. ábra: Keresztezési séma átfolyóvízes rendszerben. Anyaállomány (P0) szaporításával előállított F1 utódokat három csoportra osztottam, melyből kettő kísérleti (C1, C2), egy pedig kontroll (B) táppal volt etetve. Mindhárom csoporton méret szelekciót végeztem és csak a legnagyobb (C1B, C2B, BB) és a legkisebb (C1S, C2S, BS) állatokat neveltem ivarérett korig, melyek keresztezésével (4 db 5x5-ös csoport) létrehoztam az F2 generációt. Az F2 utódokon méret szelekciót végeztem és a legkisebb és legnagyobb egyedektől genetikai mintát vettem (n=192) ddRAD könyvtár készítésére.

4.1.2.2. Szaporítás és előnevelés

A szaporítás és keltetés a Bajcshal Kft. kisbajcsi (GPS 4°°45'08.9' N 1°°41'02.3" E) telephelyén, az 4.1.1 fejezetben leírtak szerint történt, azonban Ovopel injektlás helyett ponty hipofízis alkalmazásával (3,0 mg ponty hipofízis/ 1,0 ml 0,9 %-os NaCl oldat/ testtömeg kg) és csak az ikrások oltásával. A termékenyítés során az ivartermékeket csoportonként 4 db 5x5-ös csoportban kevertem, majd a csoportonkénti termékenyített ikratételt 7 literes Zuger edényben (26-28 °C-on nagyjából 24 óráig) inkubáltam.

Az ivadékok előnevelése 200 literes, üvegszálból és gyantából készült, ívelt, átfolyóvízes vályúban történt, 26-28 °C-os víz hőmérsékleten, nagyjából 1 hónapig. Ezt követően az ivadékok 1 m³-es, kör alakú polipropilén kádakba kerültek, amíg elérték az 5 dkg-os átlagos testtömeget. A lárvák/ivadékok etetése a szikzacskó felszívódása után pár napig élő sórák (*Artemia salina*) naupilus lárvájával, majd Larviva prostart (Biomar, Martin, Szlovákia) ivadéktáppal történt.

4.1.3. A vietnámi állomány vizsgálata

Kísérleteimben megvizsgáltam a CgaY1 hím-specifikus marker alkalmazhatóságát Vietnámból származó afrikai harcsákon (n=61), melyek a magyar állományoktól genetikailag feltételezhetően távol állnak. A Vietnámból származó halak pontos eredete sajnos nem volt ismert számunkra.

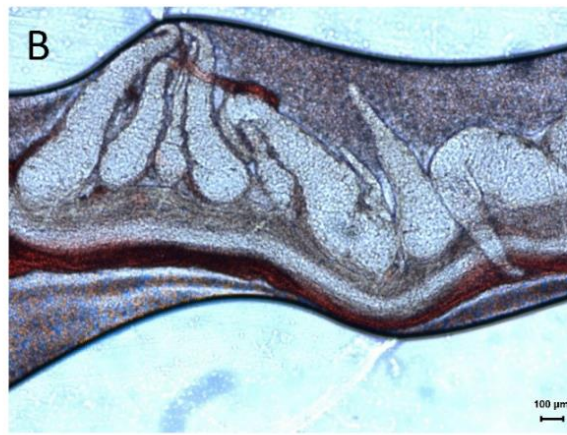
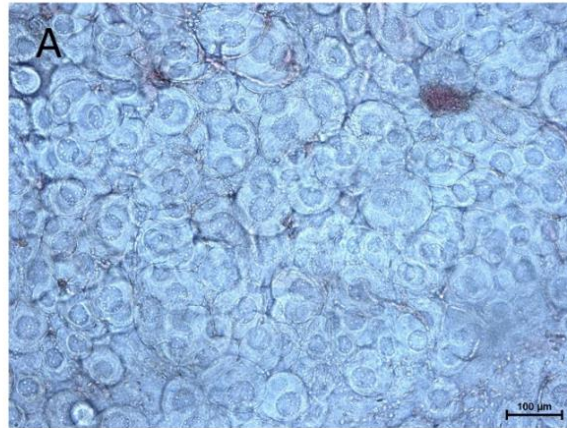
4.2. Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszerének vizsgálata

4.2.1. A CgaY1 marker validálása

A CgaY1 ivar-specifikus marker validálására a RAS rendszerben nevelt utódállományból (lásd 4.1.1) a P0 anyaállományt (5 egyed), három F2 csoportot (85, 86, 89 egyed) és három F3-as csoportot (50, 48, 93 egyed) használtam. Előbbiekén túl teszteltem a CgaY1 marker alkalmazhatóságát a magyar állományoktól genetikailag feltételezhetően távol álló, Vietnámból származó 61 halon (lásd 4.1.3). Minden egyed esetén összevettem a fenotípusos és a genetikai ivart. A vietnámi halak fenotípusos ivarmeghatározása az ivari papilla alakja, a magyar állomány P0 és F2 generációjának fenotípusos ivarmeghatározása pedig boncolást követően az ivarszerv morfológiai vizsgálata alapján történt. A fiatal állatok (magyar állomány F3 generációja) fenotípusos ivarát pedig egy módosított aceto-kármin festéssel, fénymikroszkóp segítségével (lásd 4.2.2) ellenőriztem. A molekuláris ivarmeghatározás a 4.2.3 fejezetben leírtak szerint történt.

4.2.2. A fenotípusos ivar ellenőrzése

A fenotípusos ivar ellenőrzéséhez az állatokat 2-Fenoxi-etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) segítségével túlaltattam, majd dekapitulációt követően *post mortem* eltávolítottam és tárgylemezre helyeztem az ivarszervüket. Egy módosított aceto-kármin (GUERRERO & SHELTON, 1974) festés segítségével (a jobb láthatóság érdekében indigó-kármint használtam kármin helyett) az ivarszerveket megfestettem, és morfológiájukat fénymikroszkóp (Leica M205 FA, Leica DFC 7000T kamera, Leica Application Suite X szoftver, Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország) alatt 40-100X nagyítással vizsgáltam (**6. ábra**).



6. ábra: Afrikai harcsa fenotípusos ivarmeghatározásának tipikus képei aceto-indigó kármin festéssel sztereomikroszkóp alatt (Leica M205FA, 40-100x nagyítással). (A) Petefészkek. (B) Here.

4.2.3. Molekuláris ivarmeghatározás

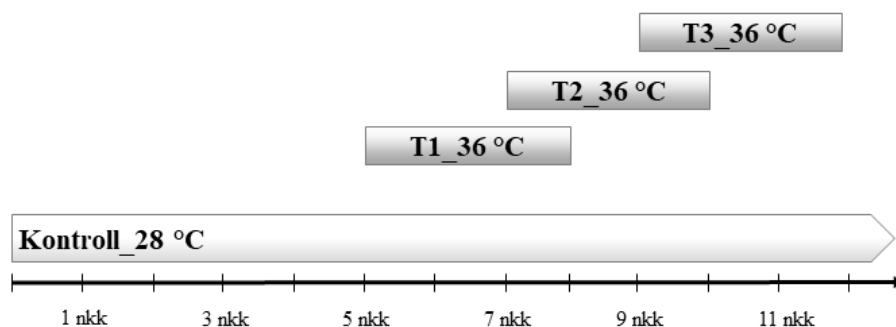
A CgaY1 ivar-specifikus marker ellenőrzéséhez minden vizsgált egyedből egy nagyjából 1 cm²-es farokúszó szövetet gyűjtöttem és 98%-os etanolban (Reanal, Budapest, Magyarország)

-20 C°-on tároltam felhasználásig. A DNS kinyerése egy gyors Chelex100 alapú technikával történt (WALSH ET AL., 1992). Egy duplex PCR reakció segítségével felszaporítottam a CgaY1 hím-specifikus fragmentet (1,1 kb), mely csak tejesekben amplifikálódik és egy rövidebb, kontroll fragmentet (486 bp), mely tejesekben és ikrásokban egyaránt amplifikálódik. Három primer szekvencia (Y1-1R, K1-1F, K1-1R) egy korábbi kutatásból (KOVÁCS, 2004) származott, kivéve egy, általam tervezett (Y1-6F) primert (a primer szekvenciákat lásd **mellékletek M2.**, a molekuláris ivarmeghatározás tipikus gélképét lásd **mellékletek M3.**).

A PCR reakciót optimalizáltam, a végső reakció összetétele a következő volt: 0,9X PCR Puffer (Promega, Madison, USA), 200-200 μ M mindegyik dNTP-ből (Thermo Scientific, Waltham, USA), 500-500 nM Y1-6F és Y1-1R primer, 30-30 nM K1-1F és K1-1R primer, 2mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1U Taq DNS polimeráz (Promega, Madison, USA) és a Chelex100 alapú technikával kinyert genomi DNS-ből nagyjából 20 ng-ot. A reakció körülményei: denaturáció 94 °C-on 2 percig, 30 ciklusban 94 °C 30 másodperc, 62,5 °C 1 perc, 72 °C 3 perc, majd egy végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 percig. A PCR reakciót háromszor 32-es blokkú ProFlex (Applied Biosystems, Waltham, USA) PCR gépben végeztem és az eredményeket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem 5 μ l PCR termék futtatásával 1,5%-os agaróz gélen [SeaKem LE, 1x TBE Puffer (890 mM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS), 890 mM Bórsav, 20 mM Etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA)], 0,5 μ g/ml etídium bromid, 5X Loading Dye és 5X GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA) felhasználásával, Consort Electrophoresis Power Supply E835 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gép segítségével.

4.2.4. A hőmérséklet ivarra gyakorolt hatásának vizsgálata

Santi és munkatársai (2016, 2017) eredményei alapján kialakítottam négy, egyenként 1000-1000 lárvából álló csoportot a 4.1.1. fejezetben leírt keresztezés F3 generációjának mindhárom csoportjából (F3A Mix, F3B Mix és F3C Mix), majd csoportonként hármat $36\pm 1^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten tartottam három különböző fejlődési stádiumban: 5-8 (T1), 7-10 (T2) és 9-12 (T3) nappal a kikelést követően, 72 órán keresztül. A negyediket, a kontroll csoportot $28\pm 1^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten neveltem, és ezt az állományt használtam a CgaY1 marker validálására (lásd 4.2.1) és az ivaronkénti génexpresszió vizsgálatára (lásd 4.3) is. A hőkezelés időtartamára a medencéket vízfürdőbe helyeztem. A víz hőmérséklete nagyjából 3 óra alatt érte el a kísérleti hőmérsékletet ($36\pm 1^\circ\text{C}$) és a kezelés végén, a vízfürdőből való eltávolítást követően körülbelül 24 óra alatt hűlt le ($28\pm 1^\circ\text{C}$). Az egyes medencék vízhőmérsékletét a teljes hőkezelés alatt RC-4 típusú (Elitech, Milpitas, USA) hőmérséklet-adatgyűjtő segítségével rögzítettem. A kilenc kísérleti csoportot (F3A Mix, F3B Mix és F3C Mix; mindegyikben T1, T2, T3 kezelés) a hőkezelések előtt és után, valamint a kontroll csoportokat (F3A Mix, F3B Mix és F3C Mix) a teljes időszak alatt csoportonként külön, 12 darab 12 literes medencében neveltem RAS rendszerben, 28°C -on, óránként 80 literes vízcserével (7. ábra).



7. ábra: Hőmérséklet általi ivarátfordítás vizsgálata magyar afrikai harcsa állományon. Négy csoportot alakítottam ki 4.1.1.2 fejezetben leírt keresztezés F3 generációjának mindhárom csoportjából (F3A, F3B, F3C mix). 3 csoportot magasabb (36 °C) hőmérsékleten tartottam három különböző fejlődési stádiumban (T1 – 5-8, T2 – 7-10, T3 - 9-12 nappal kikelést követően - nkk), míg a negyediket kontroll (28 °C) hőmérsékleten neveltem három hónapos korig.

Három hónappal a kikelést követően az ivararányok meghatározása céljából ellenőriztem az összes egyed (n=444) fenotípusos ivarát az ivarszervek kipreparálásával, majd egy módosított aceto-kármin festéssel, fénymikroszkóp alatt (lásd 4.2.2). Ezen felül 123, fenotípusa alapján teljes egyedet véletlenszerűen kiválasztva (24, 19, 80 hal a három keresztezésből) molekuláris ivarmeghatározást végeztem a CgaY1 marker segítségével (lásd 4.2.3) a genetikai ivar, illetve a potenciális ivarátfordulás ellenőrzésére.

4.2.5. A CgaY1 validálásából származó adatok kiértékelése

Minden egyed esetében összehasonlítottam a fenotípusos ivart a molekuláris ivarmeghatározás eredményeivel. A rekombináció gyakoriságából kiszámítottam a hím-specifikus CgaY1 marker és a feltételezett ivardetermináló régió közötti relatív genetikai távolságot (centiMorgan). Az 1:1 ivararánytól való eltérést a kontroll csoport minden generációjában, valamint a hőkezelt csoportokban mind a genotípusos, mind a fenotípusos ivar esetében teszteltem egymintás Z-próba segítségével, folytonossági korrekcióval, 5%-os szignifikancia szinttel, R szoftverrel (ver. 3.5) (R CORE, 2023).

4.2.6. A mások által ivarhoz kötöttnek leírt markerek vizsgálata

Néhány, nemrég publikált (NGUYEN ET AL., 2021a), „mérsékelten ivarhoz kötött” marker (‘moderately sex-associated markers’) felhasználhatóságát teszteltem a RAS rendszerben tartott keresztezés F2-es generációjából származó véletlenszerűen kiválasztott 8 tejes és 8 ikrás egyeden, melyek mindegyike a fenotípusos ivarának megfelelő duplex PCR mintázattal rendelkezett. A halak farokúszójából nagyjából 1 cm²-es szövet darabokat vágtam, melyeket 98%-os etanolban (Reanal, Budapest, Magyarország), -20 °C-on tároltam a DNS izolálásáig, mely E.Z.N.A Tissue DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, USA) felhasználásával történt a gyártó előírásai szerint. Az izolált DNS minőségét géldokumentációs rendszerben, UV fény alatt, a minőségét és a mennyiségét pedig NanoDrop One (Thermo Scientific, Waltham, USA) spektrofotométer segítségével ellenőriztem. Három „mérsékelten hím-asszociált” (*dtna*, *add3*, *gucd1*) és kettő „mérsékelten nőstény-asszociált” (*dctn4*, *pcdh2ab3*) lókuszt vizsgáltam. A termék szekvenciákat a BLAST szoftver nukleotid algoritmusával (blastn) összevettem a kutatócsoportunk által korábban megszekvenált afrikai harcsa genommal (nem publikált adat). A találatokat E<1 érték alatt tartottam szignifikánsnak. A Primer-BLAST szoftver felhasználásával 30-30 primer párt terveztem mind a négy marker határoló régiójára (maximum 100 bp távolságra mindkét irányban), melyek közül kiválasztottam azokat a legspecifikusabb párokat, melyek kizárólag a kívánt termékkel mutattak szignifikáns egyezést a genomban. A primer szekvenciák a **mellékletek M2.** számú táblázatában találhatóak. Az optimális reakció összetétel: 10X KCl-os Taq Puffer (Thermo Scientific, Waltham, USA), 200-200 µM mindegyik dNTP-ből (Thermo Scientific, Waltham, USA), 252 nM mindegyik primerből, 1,5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1U Taq DNS polimeráz (Promega, Madison, USA) és 100 ng genomi DNS. Az optimális reakció körülmények: denaturáció 95 °C-on 2 percig, 30 ciklusban 94 °C 30 másodperc, 55 °C 20 másodperc, 72 °C 1 perc, majd egy végső lánchosszabbítás 72 °C-on 10 percig. A PCR reakciókat ProFlex (Applied Biosystems, Waltham, USA) PCR gépben végeztem és a genom szekvenciából származó termékek várt hosszát (194 bp *dtna*, 204 bp *add3*, 226 bp *dctn4*, 195 bp *pcdh2ab3*) agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem az 4.2.3 fejezetben leírtak szerint.

4.2.7. Ivarhoz kötött SNP markerek izolálása ddRAD szekvenálás segítségével

4.2.7.1. Mintavétel és -előkészítés

A fenotípusos jegyekkel együtt öröklődő SNP markerek (Single Nucleotide Polymorphism) feltérképezésére ddRAD (double digest restriction-site associated DNA) szekvenálást végeztem. Az átfolyóvízes rendszerben tartott állomány egyedeiből egy nagyjából 1 cm²-es farokúszó szövetet gyűjtöttem és 98%-os etanolban (Reanal, Budapest, Magyarország)

-20 C°-on tároltam felhasználásig. A P0 anyahalak közül 34, az F2 generációból pedig összesen 158 egyedet kiválasztva elvégeztem a DNS izolálást hagyományos sós kicsapásos módszerrel (MILLER ET AL., 1988). Az izolált DNS-t nukleázmentes vízben oldottam vissza, minőségét pedig először géldokumentációs rendszerben, 1,5 %-os agaróz gélen UV fény alatt, majd mennyiségét és tisztaságát NanoDrop One (Thermo Scientific, Waltham, USA) spektrofotométer segítségével ellenőriztem. Csak azon mintákkal dolgoztam tovább, amelyek OD 260/280 mutatója 1,8 feletti értéket, OD 260/230 mutatója pedig 2,0-2,2 közötti értéket mutatott. Ezután a mintákat steril, nukleázmentes vízzel tízszeres térfogatra hígítottam, majd újabb minőség- és mennyiségellenőrzést végeztem Qubit dsDNA BR Assay Kit és Qubit 3.0 flourométer segítségével (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok).

4.2.7.2. ddRAD könyvtár készítése és Illumina-alapú szekvenálás

A megfelelő tisztaságú izolált DNS mintákból 200 ng-ot emésztettem PstI és MspI restrikciós enzimekkel (FastDigest restriction enzymes; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) a gyártó protokollja alapján, majd az emésztett fragmenteken méretszelekciót hajtottam végre KAPA PureBeads (Roche, Bázél, Svájc) segítségével a 150-300 bp közötti fragmentek kinyerésére. Az emésztett, méretszelektált DNS-eket kétszer átmostam 80%-os etanollal (Reanal, Budapest, Magyarország), beoldottam 10mM Tris [Trisz-(hidroximetil)-amino-metán, pH 8, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Németország] oldatba, majd mennyiségi meghatározást végeztem Qubit dsDNA HS Assay Kit felhasználásával Qubit 3.0 flourométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) és a mennyiségeket normalizáltam. T4 DNS ligáz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) segítségével 3 ng DNS fragmenthez kétszálú adaptereket (**mellékletek M4.**) ligáltam a gyártó protokollja alapján.

Az esetlegesen fennmaradó, nem kötött adapterek eliminálására a mintákat 0,8x KAPA PureBeads (Roche, Bázél, Svájc) segítségével tisztítottam, majd PCR reakcióval, NEBNext Multiplex Oligos for Illumina kit (Dual Index Set 1 és Dual Index Set 2 New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Egyesült Államok) és KAPA HiFi Hotstart Ready Mix (Roche, Bázél, Svájc) felhasználásával minden mintát egyedi azonosítóval (barcode) láttam el. A PCR reakció során 2-2 µl-t használtam az i5 és i7 primerekből 6 µl DNS-hez 20 µl végtérfogatban a következő hőprofilal: denaturáció 95 °C-on 3 percig, 17 ciklusban 95 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 72 °C 30 másodperc, majd egy végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 percig. A mintákat egyenlő koncentrációban (0,02 nM/minta) 'pooloztam', majd a 'poolozott' könyvtár (4 nM) minőségét és mennyiségét először High Sensitivity DNA1000 ScreenTape rendszer segítségével, 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok) géppel, majd Qubit dsDNA HS Assay Kit és Qubit 3.0 flourométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) ellenőriztem. A végleges, amplifikált könyvtárat 10 pM koncentrációra hígítottam. A szekvenálást a Xenovoa Kft. végezte Illumina NextSeq 500 genomszekvenáló platformon 2x150 bp leolvasási hosszal.

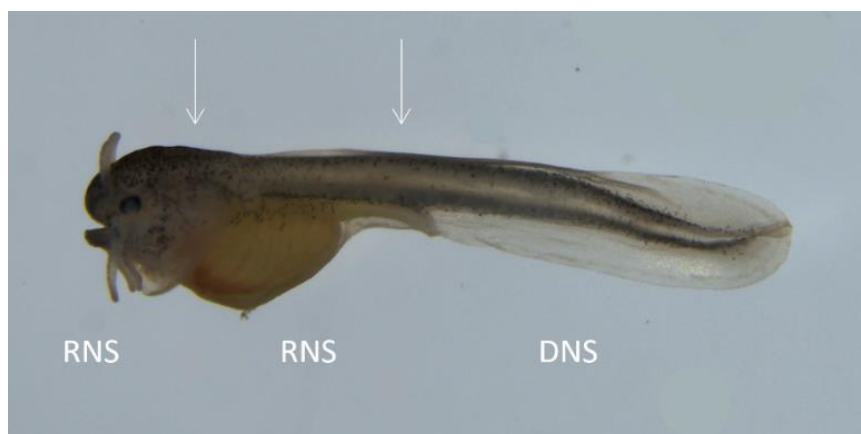
4.2.7.3. A ddRAD szekvenálásból származó adatok kiértékelése

Az adatok kiértékelését egy együttműködés keretében Julian Catchen (Department of Evolution, Ecology, and Behavior, University of Illinois, Urbana-Champaign, Urbana, IL) végezte el. A nyers szekvenciákat demultiplexálta és az adaptereket levágta. A 30-nál kisebb minőség értékkel (quality score) rendelkező, illetve a 200 bp-nál rövidebb fragmentek eltávolításra kerültek FastQ Toolkit (Illumina) segítségével. Az SNP markerek meghatározása Stacks software (CATCHEN ET AL., 2011; CATCHEN ET AL., 2013) segítségével történt. A markerek és az ivar közötti asszociációt nem parametrikus Fisher-féle egzakt próbával teszteltük és $p < 0,05$ értéknél fogadtuk el a két nominális változó közötti kapcsolatot szignifikánsnak. A Fisher-féle egzakt próbával esélyhányadost (OR, odds ratio) generáltunk, mely megadja annak az arányát, hogy (a mi esetünkben) az SNP marker és az ivardetermináló régió hányszor gyakrabban öröklődik kapcsoltnan, mint nem. A LOD (logarithm of the odds, az esély logaritmus) érték ennek tízes alapú logaritmus, a relatív valószínűség. Molekuláris varianciaanalízis (AMOVA, Analysis of Molecular Variance) segítségével vizsgáltuk az ivarhoz kötött genetikai varianciát, az eredményeket a legmagasabb fixációs index (F_{ST}) értékekre ($>0,07$) szűrtük.

4.3. Ivaronkénti génexpresszió vizsgálata

4.3.1. Mintavétel

Kísérleteimhez a RAS-ban nevelt állomány F3-as generációjából (F3A, F3B és F3C mix, kontroll csoportok) végeztem el a mintavételt 0-15 napos kor között minden nap, ezt követően 20, 25, 30 és 40 napos korban, fejlődési stádiumonként és csoportonként 15 egyedet felhasználva. Az állatokat fenoxietanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) segítségével túlaltattam, majd sztereomikroszkóp (Leica M205 FA, Leica DFC 7000T kamera, Leica Application Suite X softver, Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország) alatt, 40-100X nagyítással, szikével három részre vágtam őket (**8. ábra**). A fejből és törzsből származó mintákat ezt követően egy percen belül folyékony nitrogénbe helyeztem, majd -80°C-on tároltam RNS izolálásig. Az farokúszó szöveteket 98%-os etanolba (Reanal, Budapest, Magyarország) helyeztem, és -20 °C-on tároltam DNS izolálásáig.



8. ábra: Mintavétel korai fejlődési stádiumú afrikai harcsákból az ivaronkénti génexpresszió vizsgálatára sztereomikroszkóp (Leica M205) alatt. A farokúszóból DNS-t izoláltam, melyből molekuláris ivarmeghatározást végeztem a CgaY1 marker segítségével, a fejből és a törzsből pedig RNS-t izoláltam az ivaronkénti génexpresszió vizsgálatára real-time PCR segítségével.

4.3.2. A minták előkészítése

A farokúszó mintákból Chelex100 alapú technikával (WALSH ET AL., 1992) nyertem ki a DNS-t, majd a genetikai ivart a CgaY1 marker segítségével ellenőriztem az 4.2.4 fejezetben leírtak szerint. A fejből és a törzsből RNS-t izoláltam TRI Reagent (Molecular Research Center

Inc., Cincinnati, USA) segítségével a gyártó protokollja alapján. Az izolált RNS-t nukleázmentes vízben oldottam fel, majd az esetleges genomi DNS eltávolítására DNázI (Thermo Scientific, Waltham, USA) kezelést alkalmaztam. A DNáz kezelt RNS integritását, koncentrációját és tisztaságát 1,5 %-os agaróz gélelektroforézis és spektrofotométer (NanoDrop One, Thermo Scientific, Waltham, USA) segítségével vizsgáltam. Azon mintákat használtam fel a továbbiakban, amelyek OD 260/280 mutatója 2,0 feletti értékeket mutatott. 1000 ng RNS-ből random hexamer primer és reverz transzkriptáz enzim (Random Hexamer Primer, RevertAID Reverse Transcritase, Thermo Scientific, Waltham, USA) felhasználásával cDNS-t készítettem a gyártó protokollja alapján, amelyen qPCR vizsgálatokat végeztem.

4.3.3. *In silico* analízis

Korábbi, afrikai harcsán végzett kutatásokból (RAGHUVÉER & SENTHILKUMARAN, 2010a; RAGHUVÉER ET AL., 2011) származó primer szekvenciákat használtam azon gének esetében, melyeknél korai expressziót detektáltak (*vasa*, *foxl2*), illetve további ivarhoz kötött gének (*sox3*, *sox9*, *amhr2*) határoló régióira primereket terveztem a teljes afrikai harcsa transzkriptóma adatok alapján (nem publikált adat). Előbbiekén túl a CgaY1 ivar-specifikus markert tartalmazó hosszabb DNS szekvenciát (scaffoldot) BLAST algoritmus segítségével (blastn és blastx) illeszttem az NCBI adatbázisban megtalálható összes, sugarasúszójú halakból származó szekvenciára és az így talált gének (*pten*, *mark2*) korai expresszióját is vizsgáltam.

A primer tervezéshez a PerlPrimer szoftvert alkalmaztam, mely az mRNS, valamint gént tartalmazó DNS szekvencia megadásával az NCBI Spidey algoritmus segítségével meghatározza az exonhatárokat. Amennyiben lehetőség volt rá, a két primer tapadási helye exon-exon határra került az esetleges DNS kontamináció elkerülése végett. A PCR termékek hosszúságát 150-300 bázispár közötti hosszúságra, az oligonukleotidok ideális tapadási hőmérsékletét 60°C-ra állítottam be és a 3' végi „GC-clamp” opciót kiválasztottam a szoftverben. A tervezett primerek szekvenciáit a **mellékletek M5.** és **M6.** táblázata tartalmazza.

Ezt követően a PCR termékek szekvenciájára predikciót végeztem az uMelt szoftver (ver. 3.6.2 „Quartz”) segítségével a várható olvadási görbék hőmérsékletének és formájának meghatározására.

4.3.4. qPCR optimalizálás ('standard curve' analízis)

Minden primer pár esetében standard curve analízissel meghatároztam a PCR reakció hatásfokát. A tömény (1000ng) cDNS-ből öt pontos hígítási sort készítettem (1x, 2x, 4x, 8x, 16x) és minden ponton meghatároztam a küszöbérték ciklusszámot (Ct) kvantitatív real-time PCR készülékkel (Step One Plus Real-Time PCR Systems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok), három technikai ismétléssel. Kiszámítottam a különböző logaritmizált koncentrációkhoz tartozó Ct értékekre fektetett egyenes meredekségét és megállapítottam a reakció hatékonyságát az alábbi egyenlet szerint: $E = -1 + 10^{(-1/\text{meredekség})}$. Ezt követően addig változtattam a reakció összetételét, illetve a primer tapadási hőmérsékletét, amíg minden gén esetében 95-105% közötti hatékonyság értékeket értem el. A hatékonyság értékeket lásd a **mellékletek M5. és M6.** táblázatában.

A reakciókhoz 5X Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus-t (Solis Biodyne, Tartu, Észtország) használtam, génenként változó primer és cDNS mennyiségekkel, valamint tapadási hőmérséklettel (**mellékletek M5., M6.**), az alábbi hőprofillal: elődenaturáció 95 °C-on 12 percig, majd 45 ciklusban 95 °C 15 másodperc, primer tapadás 20 másodperc, 72 °C 20 másodperc. Az EvaGreen emissziós jelet minden ciklus extenzió-lépésének végén detektálta a készülék. A PCR reakciók specifitását, esetleges primer dimerek jelenlétét gélelektroforézis, valamint olvadási görbe (melt curve) analízis segítségével ellenőriztem 60-95 °C között, 0,3 fokonként emelve a hőmérsékletet, a fluoreszcens jelet minden emeléskor detektálva.

4.3.5. Referencia gén kiválasztása a real-time PCR vizsgálatokhoz

A megfelelő referencia gén kiválasztásához négyféle szövettípusban (kifejlett ikrás agy és ivarszerv, kifejlett tejcső agy és ivarszerv) vizsgáltam öt potenciális referencia gént (*ef1a*, *gapdh*, *rpl13*, *actb*, *18S*). A reakciók hatékonysága, a technikai szórás mértéke és a különböző szövettípusokban detektált Ct értékek kiegyenlítettsége alapján meghatároztam a vizsgálataimhoz legmegfelelőbb referencia gént (**mellékletek M6.**).

4.3.6. Real-time PCR vizsgálatok

A célgénnek (*vasa*, *foxl2*, *cyp19*, *sox3*, *sox9*, *pten*, *mark2*), valamint a választott referencia gén (*actb*) expresszióját vizsgáltam az optimalizálás során kialakított reakció összetételekkel és hőprofillal, kvantitatív real-time PCR készülékkel, a 4.3.4 fejezetben leírtak

szerint. Egy első kísérlet során négyféle csoportot (tejes, ikrás, fej, törzs) vizsgáltam 3 fejlődési stádiumban, 10, 15 és 25 nappal kikelést követően, 5-5 egyedből álló 'poolozott' mintán, 3 biológiai ismétléssel. Kontroll csoportként 5 hal teljes testét tartalmazó 'poolt' használtam, ivarmeghatározás nélkül, 6 biológiai ismétléssel. A négyféle csoportot (tejes, ikrás, fej, törzs) később, szintén 3 fejlődési stádiumban, 20, 30 és 40 nappal a kikelést követően, egyedi mintákon vizsgáltam, összesen 12 biológiai ismétléssel.

Minden minta esetében meghatároztam az átlagos küszöbérték ciklusszámot (C_t) 3 technikai ismétlés eredményeiből StepOne Plus (ver 2.2) szoftver (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) segítségével és minden mérés alkalmával beállítottam egy negatív kontrollt is primer páronként. A PCR reakciók specificitását, esetleges primer dimerek jelenlétét gélelektroforézis, illetve olvadási görbe analízis segítségével ellenőriztem.

4.3.7. Statisztikai analízis

A mintánkénti átlagos C_t értékekből (technikai ismétlések átlaga) kiszámítottam a delta C_t (ΔC_t), delta-delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) és RQ (relatív kvantifikáció; $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) értékeket Microsoft Excel szoftver segítségével (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Amennyiben a technikai ismétlések szórása magasabb volt 0,5-nél, megismételtem a mérést. Az egyedi mintákat és a 'poolozott' mintákat külön-külön hasonlítottam össze, majd az egyedi mintákból bioinformatikai úton alakítottam ki 3 'poolt' és mindent 'poolt' is összehasonlítottam. Az alacsony mintaelemszám ($n=3$ pool) miatt normál eloszlást nem feltételeztem, a biológiai csoportokat Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottam össze, Dunn-féle korrekcióval az elsőfajú hiba (α) alacsonyan tartására a többszörös összehasonlítás során, minden mintát a kontroll csoporthoz hasonlítva a génexpresszió legkorábbi megjelenésének detektálására. Előbbieken túl az egyes fejlődési stádiumokban, szövetenként, párosan is megvizsgáltam az ivaronkénti különbségeket (például 10 nappal a kikelés után ikrás-tejes fej). Ebben az esetben a csoportok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztem, és amennyiben mindkét vizsgálandó csoport normál eloszlást követett, t-próbát alkalmaztam, ellenkező esetben pedig nem parametrikus Mann-Whitney próbát. A statisztikai értékelés, illetve az eredmények ábrázolása GraphPad Prism szoftver (ver 7.0, GraphPad Software, San Diego) segítségével történt.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

5.1. Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszere

5.1.1. A CgaY1 marker validálásának eredményei

Munkám során elvégeztem egy, a kutatócsoportunk elődjében korábban izolált (KOVÁCS ET AL., 2001) hím-specifikus DNS marker (CgaY1) validálását három szülőpár keresztezéséből származó utódállomány F2-es és F3-as generációjának 451 egyedén, valamint leteszteltem a marker alkalmazhatóságát 61 Vietnámból származó egyedén is.

A CgaY1 marker több generációs validálása során a genotípusos (**mellékletek M3.**) és a fenotípusos (**7. ábra**) ivar az esetek 96,4%-ában egyezett. A megbízhatóság az F2 generációban 97,3% (95,3-98,8%), míg az F3 generáció csoportjaiban pedig 95,3% (94,6-96%) volt. Ezek az értékek összhangban vannak a más fajokban leírt és jellemzett ivar-specifikus DNS markerekkel [pl. *Pimephales promelas* F1 (100%), F2 (100%), random gyűjtött minták (96,7%), *Oncorhynchus mykiss* visszakeresztzett F2 generáció (95%), (*Ictalurus punctatus* x *I. furcatus*) x *I. punctatus*) visszakeresztzett F2 hibrid (100%) (FELIP ET AL., 2005; NINWICHIAN ET AL., 2011; OLMSTEAD ET AL., 2011)]. A 451 egyed vizsgálata során mindössze 16 esetben (3,5%) találtam eltérést a geno- és fenotípusos ivar között: öt fenotípusa alapján tejes egyedből nem sikerült felsokszorozni a hím-specifikus markert, míg 11 fenotípusosan ikrás egyedben viszont megjelent (**3. táblázat**). Az eltérések valódiságát megismételt PCR reakcióval igazoltam.

3. táblázat: A CgaY1 marker többgenerációs tesztelésének eredményei és az ivararányok

Csoportok	n	Rekombinációs esemény	Megbízhatóság (%)	CgaY1- pozitív tejesek	CgaY1- pozitív ikrások	Genotípusos ivararány (tejes %)	Fenotípusos ivararány (tejes %)
F2A mix	85	1	98,82	49/50	0/35	57,60	58,80
F2B mix	86	4	95,35	31/32	3/54	39,50	37,20
F2C mix	89	2	97,75	46/48	0/41	51,70	53,90
F3A mix	50	2	96,00	29/29	2/21	62,00	58,00
F3B mix	48	2	95,83	28/28	2/20	62,50	58,30
F3C mix	93	5	94,62	45/46	4/47	52,70	49,50
Összesen	451	16	96,40	228/233	11/218	54,33	52,62

A fenotípus és a genotípus között tapasztalt eltérések elvileg származhatnak ivaratfordulásból, azonban ennek valószínűsége csekély, mert minden egyed azonos körülmények között neveltem. Ezen felül, sem a fenotípusos, sem a genotípusos ivar esetében nem találtam szignifikáns eltérést ($p > 0,05$) az 1:1 ivarárányhoz képest egyik vizsgált csoportnál sem. Így az eltérések legvalószínűbb oka: rekombináció az ivari marker és az ivardeterminációs szakasz között. Ebben az esetben a rekombináció átlagos gyakorisága a 30-30 páros keresztezésből származó F2 és F3 generációban 2,69% és 4,51%. Így a genetikai távolság mértéke 2,69 cM (centiMorgan) és 4,51 cM közé becsülhető generációnként, átlagosan pedig 3,6 cM, mely arra utal, hogy a CgaY1 ivari marker és az ivardetermináló régió között szoros genetikai kapcsoltság áll fenn.

Ellenőriztem a CgaY1 marker alkalmazhatóságát 61 Vietnámból származó egyeden is, amelyek genetikailag feltehetően távol állnak az általunk vizsgált magyar állományoktól. A vietnámi állomány vizsgálata során nagyobb arányban (16,39%) találtam eltérést a fenotípus és a genotípus között: hat fenotípusa alapján teljes egyedből nem sikerült felszorozni a hím-specifikus DNS markert, ugyanakkor négy fenotípusosan ikrás egyedben megjelent a markerre jellemző fragment. A magasabb arányú eltérést magyarázhatja, hogy a vietnámi állomány fenotípusos ivarmeghatározása az ivari papilla alakja alapján történt, mely bizonytalanabb eredményt ad, azonban a tenyészállatok boncolására nem volt lehetőség. Mindemellett az ázsiai állomány egyedeit is 83,61%-os hatékonysággal tudtam szexálni a hím-specifikus marker segítségével, ez arra enged következtetni, hogy az XY ivardeterminációs rendszer széles körben jellemző erre a fajra.

Mindezek alapján megállapítható, hogy a CgaY1 marker jól alkalmazható mind a termelésben, mind a kutatásban. Alkalmas lehet korai fejlődési stádiumban végzett molekuláris ivarmeghatározásra hormonkezeléssel vagy genom manipulációval létrehozott egyivarú állományok kialakítása során, illetve a kutatásban többek között fejlődésbiológiai és ökotoxikológiai kísérletek során vagy genom térképezésnél.

Az irodalmi adatok alapján a CgaY1 az első olyan afrikai harcsán alkalmazott molekuláris marker, melyet több generációs keresztezésen is validáltak és a harcsalakúak rendjébe (*Siluriformes*) tartozó fajok között a második a Wang és munkatársai által nemrégiben *Silurus lanzhouensis* fajon validált marker után (WANG ET AL., 2021). A korábban izolált ivar-specifikus markerekkel kapott eredmények alapján az XX/XY ivardeterminációs rendszer tűnik a legelterjedtebbnek a *Siluriformes* rendbe tartozó fajok esetén (**2. táblázat**).

5.1.2. A hőmérséklet ivarra gyakorolt hatásának eredményei

Egy ivarhoz szorosan kötött marker, mint a CgaY1, lehetővé teszi a hőmérséklet hatására történő ivarátfordulás vizsgálatát is. Kísérleteimben a Santi és munkatársai (2016) által javasolt kritikus szenzitív periódusban 36 ± 1 °C-os vízhőmérsékleten kezeltem a kísérleti állomány F3 generációját (F3A Mix, F3B Mix, F3C Mix). A hőkezelt csoportokból 123 fenotípusa alapján teljes egyedet véletlenszerűen kiválasztottam és molekuláris ivarmeghatározást végeztem rajtuk a CgaY1 markerrel. Mindössze négy egyed (3,25%) esetében nem sikerült felsokszorozni a hím-specifikus fragmentet. Ez az arány nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporttól, ahol 191 vizsgált egyedből 9 esetben találtunk eltérést (4,71%) a fenotípus és genotípus között. A hőkezelt csoportok egyikében sem találtam statisztikailag szignifikáns eltérést a 1:1 fenotípusos ivararányhoz képest (44%, 53%, 44% volt a hímek aránya az F3A, B és C Mix kezelt csoportokban), és a hőkezelt csoportok ivararányát a kontroll csoportok ivararányához (58%, 58% és 50% a hímek aránya az F3A, B és C Mix kontroll csoportokban, lásd **3. táblázat**) viszonyítva sem figyeltem meg szignifikánsan magasabb hím ivararányt.

Eredményeim alapján nem történt a hőkezelés hatására ivarátfordulás az általunk vizsgált populációban. Megemlítendő ugyanakkor, hogy a GSD+TE ivardeterminációs rendszerrel rendelkező halaknál sok faj esetében megfigyeltek erős szülői hatást (BAROILLER ET AL., 2009b; SHEN & WANG, 2014), valamint hőmérsékletre érzékeny és nem érzékeny populációkat (VALENZUELA & LANCE, 2004). Emellett magas mortalitási rátát tapasztaltam a hőkezelt csoportokban: 90 nappal a kikelés után $82 \pm 3\%$ a kezelt, míg $51 \pm 5\%$ a kontroll csoportokban, valamint sok esetben figyeltem meg morfológiai elváltozásokat, mely a korábbi kísérletekben leírtakhoz hasonló (SANTI ET AL., 2016; SANTI ET AL., 2017). Előbbiek alapján feltételezem, hogy az egyivarú termelési populációk létrehozására alkalmazott hőmérséklet általi ivarátfordítás csak néhány állomány vagy család esetében alkalmazható és az általam vizsgált állományok ivarátfordítására nem alkalmas.

5.1.3. Mások által ivarhoz kötöttnek feltételezett markerek vizsgálatának eredményei

Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszerének vizsgálata során a korábbi kutatások ellentmondásos eredményeket mutattak, néhányan XX/XY, mások ZZ/ZW rendszert írtak le. Nemrég a két ivardeterminációs rendszer együttes jelenlétét valószínűsítették a faj ázsiai

populációiban. Vizsgálataim során megpróbáltam validálni néhány, nemrég publikált (NGUYEN ET AL., 2021a), „mérsékelten ivarhoz kötött” (‘moderately sex-linked’) markert: három hím ivarra jellemző (*gucd1*, *add3* és *dtna*) és két női ivarra jellemző (*dctn4* és *pcdh2ab3*) markert. A *gucd1* markert nem sikerült detektálnom a kutatócsoportunk által szekvenált afrikai harcsa genomban (nem publikált adat) BLAST szoftver segítségével. A másik négy marker esetében kizárólag egy szignifikáns egyezést találtam a genomban. A négy potenciális marker alkalmazhatóságát megvizsgáltam a RAS rendszerben nevelt állomány F2 generációjából származó 8 tejes és 8 ikrás állaton. Mind a négy PCR reakció esetén ugyanazt a markerenként eltérő méretű terméket figyeltük meg mindkét ivarban, mely az *in silico* számításoknak megfelelő mérettartományba esett (194 bp *dtna*, 204 bp *add3*, 226 bp *dctn4*, 195 bp *pcdh2ab3*; **mellékletek M7.**).

Megállapíthatjuk, hogy ezek a „mérsékelten ivarhoz kötött” markerek nem alkalmasak az általam vizsgált afrikai harcsa állományok molekuláris ivarmeghatározására. A női heterogametikus (ZZ/ZW) ivardeterminációs rendszer jelenlétét nem sikerült detektálnom a magyarországi állományokban, azonban a ZZ/ZW rendszer jelenlétének végleges kizárása további markerek vizsgálatát igényelné olyan ázsiai állományokból származó mintákon, ahol annak jelenlétét feltételezik. A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy az XX/XY és ZZ/ZW rendszer együttes jelenléte legfeljebb bizonyos populációkban fordulhat elő.

5.1.4. Az ivarhoz kötött SNP markerek vizsgálatának eredményei

Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszerének további elemzése érdekében egy új-generációs ddRAD szekvenálás segítségével SNP markereket izoláltam a teljes genomból. Az SNP markerek lehetővé teszik az ivarhoz kötött régiók vizsgálatát. Az ivardetermináló faktorról kapcsoltan öröklődő DNS markerek segítségével pontosítható az ivar kialakításában szerepet játszó régiók helyzete a genomban.

A nagy áteresztőképességű szekvenálás eredményeképp 69.344 ddRAD lókuszt sikerült azonosítani a vizsgált 95 ikrás és 97 tejes egyed genomjából. A további vizsgálatokhoz ezekből a lókuszból csak azok kerültek felhasználásra, amelyek mindkét ivarból legalább az egyedek 50%-ában jelen voltak, így összesen 20.841 lókuszt maradt, melyek átlagos hossza 204 bp volt. A lókuszból összesen 24.743 polimorf variáns (SNP, single nucleotide polymorphism, azaz egy pontos nukleotid polimorfizmus) volt megtalálható az ikrásokban és 24.020 a tejesekben. A privát allélok száma 1.811 volt az ikrásokban és 1.835 a tejesekben.

Molekuláris varianciaanalízis (AMOVA, Analysis of Molecular Variance) segítségével vizsgáltuk az ivarhoz kötött genetikai varianciát. A fixációs index (F_{ST}) átlagos értéke 0,0036 volt a tejesek és ikrások között. A magasabb ($> 0,07$) F_{ST} értékre szűrve, tizenkét SNP markert találtunk, melyek ivaronként összehasonlítva magas polimorfizmust mutattak. A két legmagasabb F_{ST} értékkel a hatodik (0,2592) és a tizenegyedik (0,1953) SNP markerek rendelkeztek. A tizenkét SNP marker tíz lókuszon helyezkedett el (a lókuszok szekvenciáit lásd **mellékletek M8.**), egy lókusz (8398) három SNP-t (3., 4., 5.) is tartalmazott (**4. táblázat**).

A legmagasabb OR és LOD értékkel, mely annak arányát, illetve relatív valószínűségét adja meg, hogy az SNP marker és az ivardetermináló régió hányszor gyakrabban öröklődik kapcsolatosan, mint nem, szintén a hatodik (16186. számú lókusz) és a tizenegyedik (39965. számú lókusz) SNP markerek rendelkeztek.

Nemrég megszekvenálták és összeállították az afrikai harcsa teljes genomját egy tejes egyedből (NGUINKAL ET AL., 2023; a részleteket lásd a 3.3. alfejezetben). A kutatócsoportunk elődjében izolált CgaY1 (AF332597; 2,6 kb) és CgaY2 (AF332598; 458 bp) hím-specifikus markereket (KOVÁCS ET AL., 2001) Nguinkal és munkatársai mindhárom összerakott genomra (assembly) megpróbálták ráilleszteni. A CgaY1-et a Prim és a Hap1 assembly-ben egyaránt a 24-es kromoszómán találták 99,14%-os egyezéssel, 96,5%-os lefedettséggel, ugyanakkor a Hap2-ben nem találtak egyezést. A CgaY2 markert nem sikerült a genomra illeszteniük. Fentiek alapján valószínűsítették, hogy a Hap1 assembly a tejes haplotípussal egyezik meg.

A ddRAD szekvenálás során kapott tizenkét SNP markert tartalmazó tíz lókuszt (**mellékletek M8.**) BLASTn algoritmus segítségével (megablast) megpróbáltam ráilleszteni a Nguinkal és munkatársai (2023) által megszekvenált Prim, Hap1 és Hap2 assembly-re (**5. táblázat**). A tíz lókuszból hetet, köztük a két legmagasabb F_{ST} és LOD értékekkel rendelkezőt (16186, 39965) és a három SNP markert tartalmazót (8398) is a Prim assembly 24-es kromoszómáján találtam meg. Az első SNP-t tartalmazó 5762-es lókusz kizárólag a Hap1 haplotípusra illeszkedett, a Hap2-re nem. A legmagasabb kapcsoltságot mutató hatodik SNP-t tartalmazó lókuszt (16186) a Hap2 assembly-re sikerült illesztenem (96,09%), azonban a három SNP-t tartalmazó lókusz (8398) nagyon magas egyezéssel (lefedettség 99%, egyezés 100%) illeszthető volt a Hap1 assembly 24-es kromoszómájára. Egy lókuszt (21558) egyáltalán nem sikerült detektálni egyik publikált assembly-ben sem, két másik lókuszt (7160, 21950) pedig a 15. és a 17. kromoszómán detektáltam, viszonylag alacsony lefedettséggel (91 és 92%).

4. táblázat: A ddRAD szekvenálás segítségével izolált SNP markerek jellemzése. A csoportonkénti allél gyakoriságok különbsége Fisher egzakt teszttel vizsgálva.

SNP	Lókuszt neve	Lókuszt hossza (bp)	p érték	OR*	CI**		LOD***	F _{ST} ****
1	5762	262	2,3230E-06	3,3119	2,0123	5,4510	0,5201	0,0788
2	7160	203	3,1385E-05	0,2855	0,1567	0,5200	0,5444	0,0710
3	8398	153	1,9100E-07	3,2230	2,0676	5,0241	0,5083	0,0775
4			3,5600E-07	3,1472	2,0214	4,8999	0,4979	0,0743
5			5,7700E-07	0,3107	0,1948	0,4954	0,5077	0,0709
6	16186	285	0,0000E+00	22,2174	9,1694	53,8326	1,3467	0,2592
7	21558	202	3,9300E-07	3,6680	2,2009	6,1129	0,5644	0,0964
8	21950	173	2,8366E-05	3,2067	1,8511	5,5551	0,5061	0,0763
9	26980	176	7,4652E-05	3,3619	1,8246	6,1946	0,5266	0,0772
10	29742	250	3,1386E-05	3,5000	1,9358	6,3282	0,5441	0,0837
11	39965	273	0,0000E+00	7,9259	4,2462	14,7944	0,8991	0,1953
12	40371	274	4,7987E-05	0,2400	0,1175	0,4903	0,6198	0,0742

* OR - esélyhányados

** CI - az esélyhányados konfidenciaintervalluma

*** LOD - logarithm of the odds (az esély logaritmus)

**** F_{ST} - a fixációs index értéke AMOVA analízissel

A Prim assembly-re illesztett hét lókuszból öt, köztük a két legerősebb kapcsoltságot mutató (16186, 39965) és a három SNP-t tartalmazó (8398) lókuszt egymás közelében, a 24. kromoszóma egy nagyjából 1,2 Mb hosszúságú szakaszán helyezkedett el (**9. ábra**). Ez a szakasz több, mint negyven fehérjét kódoló szekvenciát tartalmazott, köztük az androgén receptort (*ar*) kódoló gént is.

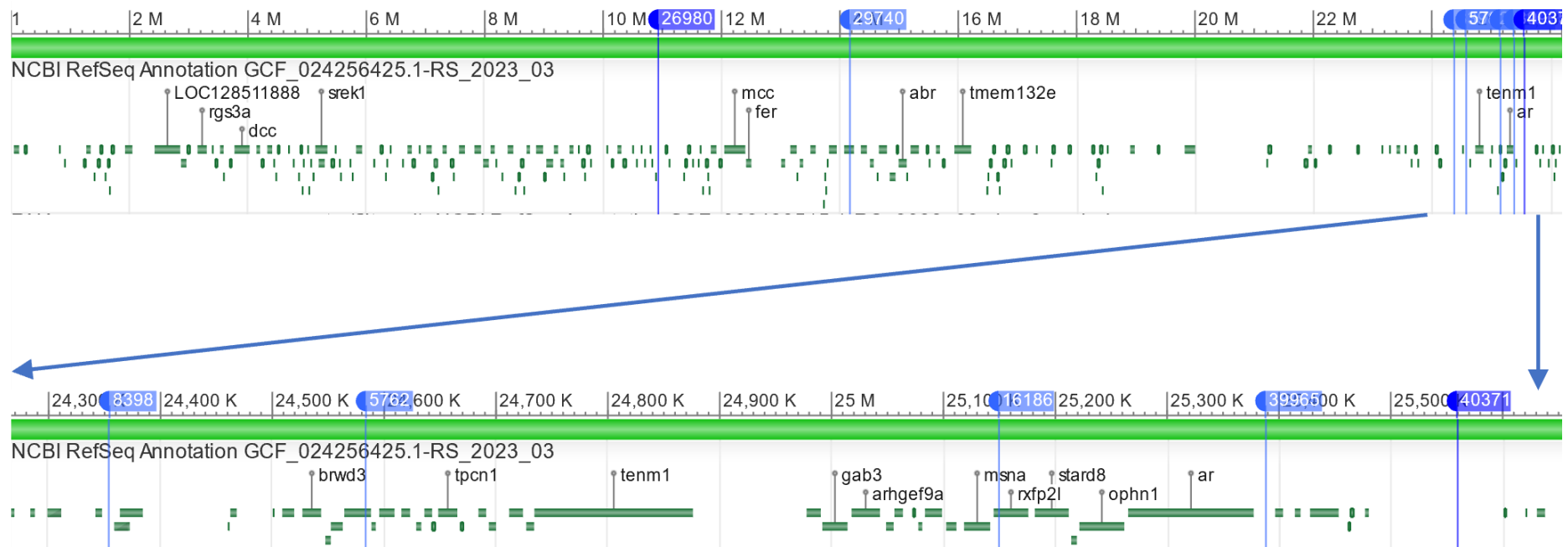
A 5762-es számú lókuszt Nguinkal és munkatársai (2023) annotálása alapján egy ATRX-szerű transzkripciós aktivátor (transcriptional regulator ATRX-like, Gene ID: 128512310) szekvenciájára sikerült illeszteni és az SNP marker a gén egyik exonján helyezkedett el. A gén terméke GO annotálása alapján humán vonalon DNS metilációs és javító folyamatokban, transzkripciós szabályozásban, valamint a Sertoli sejtek fejlődésében és a spermatogenezisben játszik szerepet. Az OMIM adatbázis alapján az ATRX gén emlős vonalon egy X kromoszómához kötött cink-ujj helikázt kódol (STAYTON ET AL., 1994; VILLARD ET AL., 1997), melynek mutációja mentális retardációt (GIBBONS ET AL., 1995; PICKETTS ET AL., 1996) és XY egyedekben ivarátfordulást (REARDON ET AL., 1995) okoz.

Az egyik legerősebben kapcsolt SNP marker (16186 lókuszt) pedig egy relaxin 2-es típusú receptor szerű (relaxin family peptide receptor 2 like, Gene ID: 128511954) gén intronján helyezkedik el. A relaxin 2-es típusú receptor (RXFP2) az OMIM adatbázis alapján az RXFP2 emlősökben egy G-fehérje kapcsolt transzmembrán receptort kódol (HSU ET AL., 2002). A receptor ligandja egerekben a relaxin-típusú peptidok közé tartozó inzulinszerű 3-as faktor (INSL3), amely a here Leydig-sejtjeiben fejeződik, a Wolff-vezeték fenntartását, a reprodukció szervek fenntartását és a here leszállását szabályozza (KUMAGAI ET AL., 2002), funkcióvesztéses egér mutánsokban steril fenotípust eredményezett és a here leszállását gátolta (OVERBEEK ET AL., 2001). Az RXFP2 a GO annotálás szerint zebrafishban hormonok indukálta jelátviteli mechanizmusokban vesz részt.

A fenti eredmények, miszerint Nguinkal és munkatársainak (2023) az általam validált CgaY1 markert, valamint a kutatásom során meghatározott ivarhoz köthető SNP-eket tartalmazó lókusztok nagy részét is az afrikai harcsa 24-es kromoszómájára sikerült illeszteni, arra engednek következtetni, hogy az ivar kialakításában elsődleges szerepet játszó régió és benne az ún. elsődleges kapcsoló a 24-es kromoszómán lehet. Ennek bizonyítása, illetve pontosítása azonban további kutatásokat igényelne.

5. táblázat: A ddRAD szekvenálás során izolált ivarhoz kötött SNP markereket tartalmazó lókuszok illesztésének (megablast) eredményei. Prim (GCA_024256425.1), Hap1 (GCA_024256435.1) és Hap2 (GCA_024256465.1) genom assembly-re illesztve.

SNP	Lókusz neve	Prim assembly			Hap1 assembly			Hap2 assembly		
		Kromoszóma száma	Lókusz lefedettsége	Egyezés	Kromoszóma száma	Lókusz lefedettsége	Egyezés	Kromoszóma száma	Lókusz lefedettsége	Egyezés
1	5762	24	100,00%	98,09%	24	100,00%	98,09%	-	-	-
2	7160	15	91,00%	97,81%	15	91,00%	100,00%	15	91,00%	97,81%
3										
4	8398	24	99,00%	100,00%	24	99,00%	100,00%	16	94,00%	94,37%
5										
6	16186	24	100,00%	96,09%	18	98,00%	90,94%	24	100,00%	96,09%
7	21558	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	21950	17	92,00%	99,37%	17	92,00%	99,37%	17	92,00%	99,37%
9	26980	24	90,00%	98,73%	24	90,00%	100,00%	24	90,00%	98,73%
10	29742	24	93,00%	97,83%	24	93,00%	99,57%	24	93,00%	97,83%
11	39965	24	100,00%	98,51%	24	92,00%	95,58%	24	100,00%	99,26%
12	40371	24	61,00%	97,59%	24	61,00%	97,59%	24	61,00%	98,80%



9. ábra: Az afrikai harcsa 24-es kromoszómájára illeszthető az ivarral szoros kapcsoltságot mutató tizenkét SNP markerből kilenc, melyek hét lókuszon helyezkednek el. Az SNP markereket tartalmazó lókusztok kézzel jelölve. Öt lókuszt egymás közelében, egy nagyjából 1200 kb hosszúságú szakaszra volt illeszthető. Az 5762-es lókuszt egy ATRX-szerű transzkripciós aktivátor szekvenciáján, az SNP marker annak egyik exonján, az 16186-os lókuszt pedig egy relaxin 2-es típusú receptor szerű gén szekvenciáján, az SNP marker annak egyik intronján helyezkedett el.

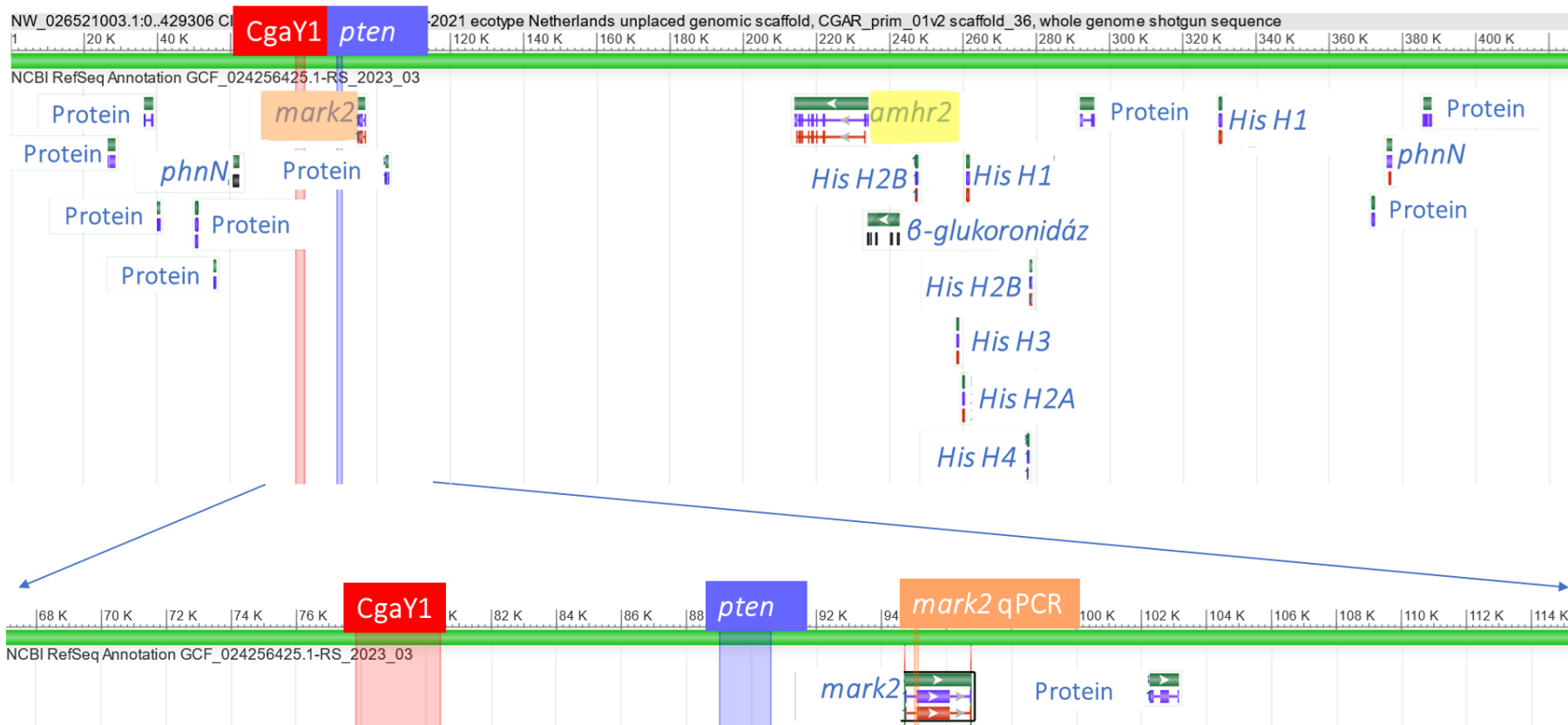
Érdekes módon, amikor BLAST elemzéssel a 2.582 bp hosszúságú hím-specifikus CgaY1 markert (AF332597.1) az NCBI adatbázisban közzétett Prim assembly-re (NC_071100.1) próbáltam ráilleszteni, azt a 36-os számú (NW_026521003.1), 460.213 bp hosszúságú, a genomban el nem helyezett szekvencián (scaffold) találtam meg 99%-os lefedettséggel és 97,2%-os egyezéssel (**mellékletek M9.**). Ugyanakkor - szemben a Nguinkal és munkatársai által közölt eredménnyel - a CgaY1 marker az én keresésemben egyáltalán nem mutatott szignifikáns egyezést a 24-es kromoszómával. A kutatócsoportunk által végzett korábbi teljes genom szekvenálásból származó szekvenciákra is sikerült ráillesztetnem a CgaY1 markert és azt szintén egy, a genomban el nem helyezett scaffold-on (scf484) találtam meg. Az általunk szekvenált scf484 (89.533 bp) scaffold a Prim assembly-re illesztve szintén magas egyezést mutatott a Nguinkal és munkatársai által közzétett 36-os scaffold-dal (**mellékletek M10.**). A génexpressziós vizsgálatokkal elemzett *pten* gén (lásd 5.2.2. fejezet) qPCR termék szekvenciáját, valamint a kutatócsoportunk által végzett genom annotálásból származó prediktált *pten* gén szekvenciát (**mellékletek M11.**) ugyanerre a 36-os scaffoldra sikerül nagy megbízhatósággal ráillesztenem. A *ptenb* gén-t, melynek szekvenciája jelentősen eltér a fentebb bemutatott *pten* génétől, mind Nguinkal és munkatársai (2003), mind pedig jómagam a 14-es kromoszómára térképeztük. A 24-es kromoszómára, valamint a 36-os el nem helyezett genomi régióra illesztett szekvenciák összefoglaló eredményeit lásd a **6. táblázatban**.

Eredményeim alapján elképzelhető, hogy a 24-es kromoszómán található az ivardetermináló régió, de valószínűnek tartom, hogy a 36-os el nem helyezett genomi szekvencia is fontos szerepet játszik a folyamatban. Lehetséges, hogy a 24-es kromoszóma az X, a 36-os scaffold pedig az Y ivari kromoszóma szekvenciájának egy része. Ez a több, mint 460 ezer bp hosszú 36-os scaffold az annotáció alapján huszonnegy fehérjekódoló gént tartalmaz, többek között hiszton fehérjét, valamint ribóz-foszfát foszfokináz fehérjét kódoló géneket (**10. ábra**). Emellett azonban tartalmazza a más fajokban MSD gén funkciót betöltő és a gerincesek ivari differenciálódásában fontos szerepet játszó, általam vizsgált *amhr2* gént, valamint *mark2* gént is (5.2.2 fejezet). Valószínűsíthető, hogy ezen gének (*pten*, *amhr2*, *mark2*) szerepet játszanak az afrikai harcsa ivarának kialakításában és kifejeződésük kapcsolatban áll egymással. Ezen kívül tartalmazza ez a scaffold kilenc eddig nem jellemzett fehérje génjét is. Ezek szekvenciáit az általunk prediktált *pten* szekvenciával (2.457 bp) illesztve egy esetben találtam egyezést a szekvenciánk 826 bp hosszú szakaszával, melyből egy kisebb, 428 bp hosszúságú szakasz magas, 98%-os szekvencia homológiát mutatott.

6. táblázat: A ddRAD szekvenálásból származó ivarhoz kötött lókuszok elhelyezkedése a 24-es kromoszómán és a CgaY1 marker, az általunk szekvenált azt tartalmazó scaffold (scf484), valamint a *pten* gén elhelyezkedése a mások által szekvenált 36-os scaffoldon (NW_026521003.1).

SNP	Lókusz neve	Lókusz hossza (bp)	Találat	Találat eleje (referencia bp)	Találat vége (referencia bp)	Illesztés hossza	Lefedettség	Egyezés
1	5762	262	24 kromoszóma	24.583.336	24.583.075	262	100,00%	98,09%
3								
4	8398	153	24 kromoszóma	24.354.063	24.353.916	148	99,00%	100,00%
5								
6	16186	285	24 kromoszóma	25.149.809	25.149.534	281	100,00%	96,09%
9	26980	176	24 kromoszóma	10.941.233	10.941.389	157	90,00%	98,73%
10	29742	250	24 kromoszóma	14.164.154	14.163.925	230	93,00%	97,83%
11	39965	273	24 kromoszóma	25.387.739	25.387.471	296	100,00%	98,51%
12	40371	274	24 kromoszóma	25.559.116	25.558.951	166	61,00%	97,59%
	<i>pten</i> TRINITY (saját predikció)	2347	NW_026521003.1	89.026	90.596	1593	100,00%	96,90%
	CgaY1 teljes szekvencia	2582	NW_026521003.1	77.846	80.436	2597	99,00%	97,30%
	scf 484 (saját genomról) *	89533	NW_026521003.1	8251	16.229	8114	97,00%	95,30%

* csak az első, legjobban illeszkedő szekvencia értéke



10. ábra: Az afrikai harcra 36-os számú el nem helyezett genomai régiójára (NW_026521003.1) illeszthető a CgaY1 marker, valamint a *pten*, az *amhr2* és a *mark2* gének is. A pirossal jelölt CgaY1 markert (AF332597), a kutatócsoportunk által annotált, *pten* gén szekvenciáját (kék) és az általam vizsgált, *amhr2* (citromsárga) és *mark2* (narancssárga) gén qPCR termékének szekvenciáját sikeresen illesztettem a régióra, mely tartalmazza a mások által annotált *mark2* és *amhr2* géneket, két ribóz-foszfát foszfokináz-szerű (*phnN*), egy β -glükoronidáz-szerű, néhány hiszton-szerű (*His H1*, *H2B*, stb.) és kilenc nem jellemzett fehérjét kódoló gén (az ábrán: Protein) szekvenciáját is.

5.2. Egyes jelölt gének expressziós mintázatának eredményei a két ivarban

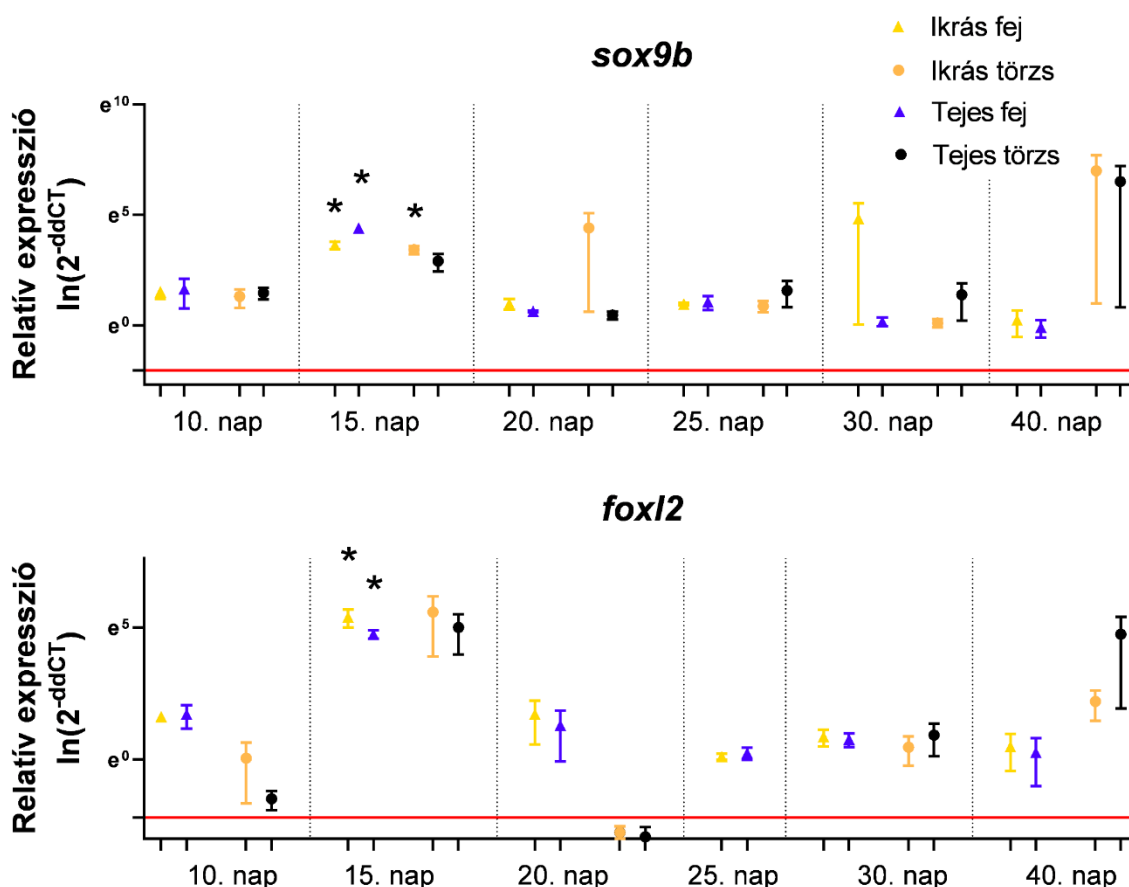
5.2.1. A petefészek differenciálódásában szerepet játszó gének (*sox9b*, *foxl2*)

Afrikai harcsán a korábbi kutatások során 50 napos kort követően tudtak ivarmeghatározást végezni az ivarszervek morfológiai vizsgálatával (RAGHUVÉER & SENTHILKUMARAN, 2010a; SRIDEVI & SENTHILKUMARAN, 2011), emiatt az ezt megelőző fejlődési stádiumokból nem rendelkezünk ivaronkénti génexpressziós adatokkal. A legtöbb ivarhoz kötött gén kifejeződését csak az ivarszervekben vizsgálták, más szövetekben, például az agyban nem (RAGHUVÉER ET AL., 2011). Az ivari differenciálódás kezdetének pontos időpontja nem ismert, de feltételezték, hogy ikrásokban előbb, 20 napos kor környékén, tejeseiben később, 40 napos kor körül kezdődik (BUDD ET AL., 2015; VAN DEN HURK ET AL., 1989). Ez a hipotézis hasonló a más fajokban (például medakában, tilápiában) megfigyelt eredményekkel, ahol az ivarszerv morfológiája korábban kezd kialakulni ikrásoknál (SIEGFRIED, 2010). A *Siluriformes* rendbe tartozó ázsiai cápaharcsa (*Pangasianodon hypophthalmus*) esetén az ivari redő 15 napos korban alakult ki és a testi sejtek 20 napos korban zárták körbe a primordiális csírasejteket, melyek proliferációja 25 nappal a kikelést követően kezdődött meg (DUANGKAEW ET AL., 2019).

Vizsgálataim során az irodalmi adatok alapján a petefészek differenciálódásában szerepet játszó gének (*sox9*, *foxl2*) kifejeződését viszonyítottam a kontroll csoporthoz (8 nappal a kikelést követően, vegyes ivar) az ivari differenciálódás kezdetének meghatározása érdekében. Mindkét vizsgált gén esetén megfigyeltem emelkedett expressziót 15 nappal a kikelést követően. Eredményeim alapján valószínűnek tartom, hogy az ivari differenciálódás ikrásoknál valamikor a kikelést követő 10. és 15. nap között kezdődhet **(11. ábra, mellékletek M12.)**.

A *Siluriformes* rendbe tartozó fajok közül mind békaharcsa, mind afrikai harcsa esetén a *sox9b* kifejeződése a női ivarra jellemző: ivarérett ikrásokban *sox9b* expressziót figyeltek meg az agyban és a petefészekben (BHAT ET AL., 2016a; RAGHUVÉER & SENTHILKUMARAN, 2010b). Egy a korai fejlődési stádiumra irányuló korábbi kutatás szerint, melyben az agyi expressziót nem, csak a bipotenciális gonád vizsgálatát végezték el molekuláris ivarmeghatározás nélkül, a *sox9b* legkorábban 30 nappal a kikelést követően volt kimutatható az ivarszervben (RAGHUVÉER ET AL., 2011). A *sox9b* gén vizsgálata során azt találtam, hogy a kontroll csoporthoz (8 nappal a kikelést követően, vegyes ivar) viszonyítva szignifikánsan magasabb expresszió figyelhető meg már 15 nappal a kikelést követően mind az ikrás, mind a tejes fejben,

valamint az ikrás törzsben. Későbbi fejlődési stádiumokban nem találtam szignifikáns eltérést, ugyanakkor 20 napos korban az ikrás törzsben, 30 napos korban pedig az ikrás fejben volt valamivel magasabb expresszió. Negyven napos korban nagyon magas expressziós értéket detektáltam mindkét ivar törzsében, azonban nagy szórás értékkel (11. ábra).

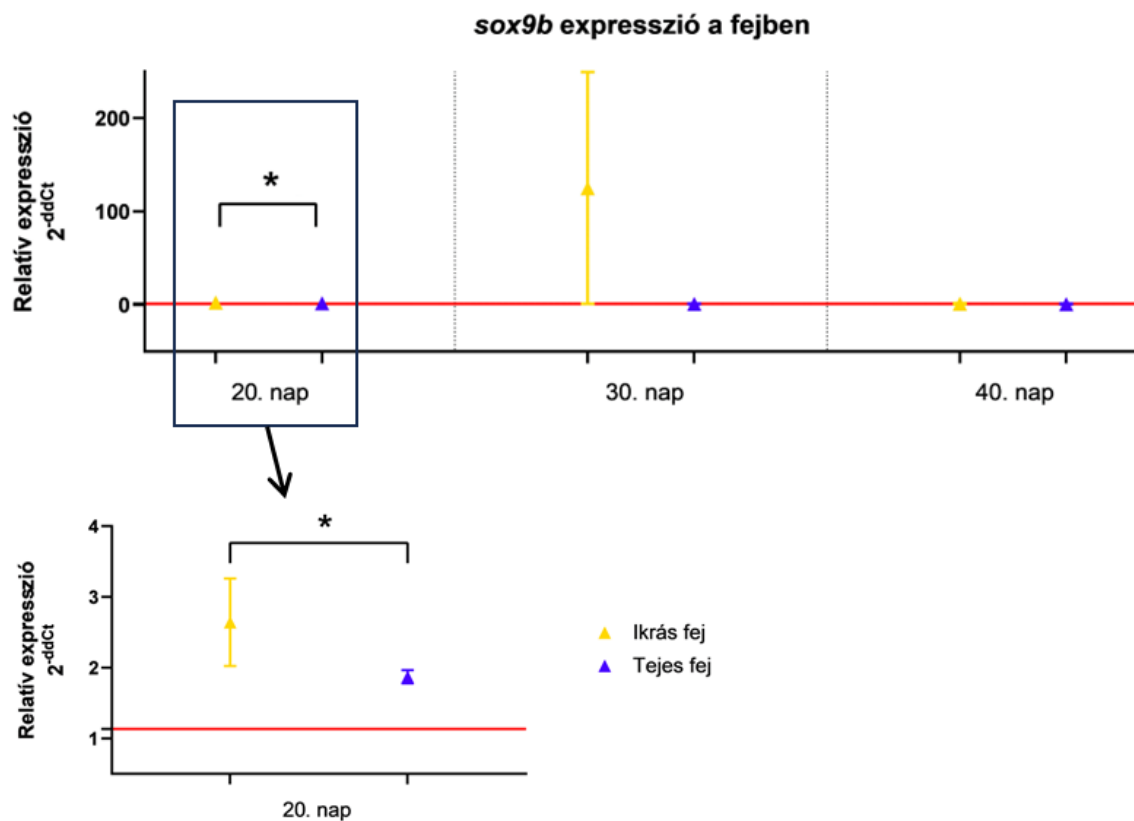


11. ábra: A női irányba ható gének (*sox9b*, *foxl2*) mRNS-ének a mennyisége már 15 napos korban megemelkedett. A relatív expresszió (2^{-ddCt}) átlaga és sztenderd hibája vizsgálati csoportonként (ikrás és tejes fej és törzs, 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően), linearizált skálán ábrázolva, a szignifikancia szintek ($p < 0,05$) a kontroll csoporthoz (vegyes ivar, teljes test, 8 nappal kikelést követően) viszonyítva. A kontroll csoportban mért érték ($2^{-ddCt} \sim 1$) piros vonallal van jelölve.

A *foxl2* gén a legtöbb vizsgált faj esetében a petefészek fenntartásában vesz részt (SCHMIDT ET AL., 2004; UHLENHAUT ET AL., 2009; WANG ET AL., 2004; ZHANG ET AL., 2017). Afrikai harcsában az érett ivarszerveket vizsgálva magasabb *foxl2* expressziót találtak a petefészekben 50 napos kort követően (RAGHUVÉER ET AL., 2011). *Silurus meridionalis* fajban és békaharcsában az ivarszerv mellett az agyban és az agyalapi mirigyben is kimutattak *foxl2* expressziót (BHAT ET AL., 2016a; LIU ET AL., 2007). Vizsgálataim során már 15 napos korban

szignifikánsan magasabb expressziót figyeltem meg mind az ikrás, mind a tejes fejben és a törzsben is megfigyelhető volt, hogy a *foxl2* mRNS mennyisége, bár nagy szórással és nem szignifikánsan, de magasabb a kontrollhoz képest **(11. ábra)**. Későbbi fejlődési stádiumokban, 40 napos korig nem volt detektálható eltérés. A korábbi irodalmi adatok alapján (RAGHUVÉER ET AL., 2011) feltételezhető, hogy a *foxl2* expressziója csak később, 40 napos kort követően kezdődik meg az ivarszervekben.

A két ivar közötti eltérést fejlődési stádiumonként és szövet típusonként egymáshoz viszonyítva a *sox9b* és a *foxl2* gének közül csak a *sox9b* expressziójában találtam szignifikáns különbséget: magasabb expressziót tapasztaltam az ikrás fejben a tejes fejhez képest 20 nappal a kikelést követően. 30 napos korban már nagyobb szórással, nem szignifikáns eredménnyel, de megfigyelhető volt, hogy az ikrások fejében még ebben a fejlődési stádiumban is magasabb a relatív expresszió értéke **(12. ábra)**.



12. ábra: A *sox9b* expresszió szintje szignifikánsan magasabb volt az ikrások fejében, mint a tejesekében. A relatív expresszió (2^{-ddCt}) átlaga és sztenderd hibája vizsgálati csoportonként (20, 30, 40 napos fej), a két ivar közötti eltérést fejlődési stádiumonként és szövet típusonként egymáshoz viszonyítva ($p < 0,05$), kontroll csoport (piros vonal)

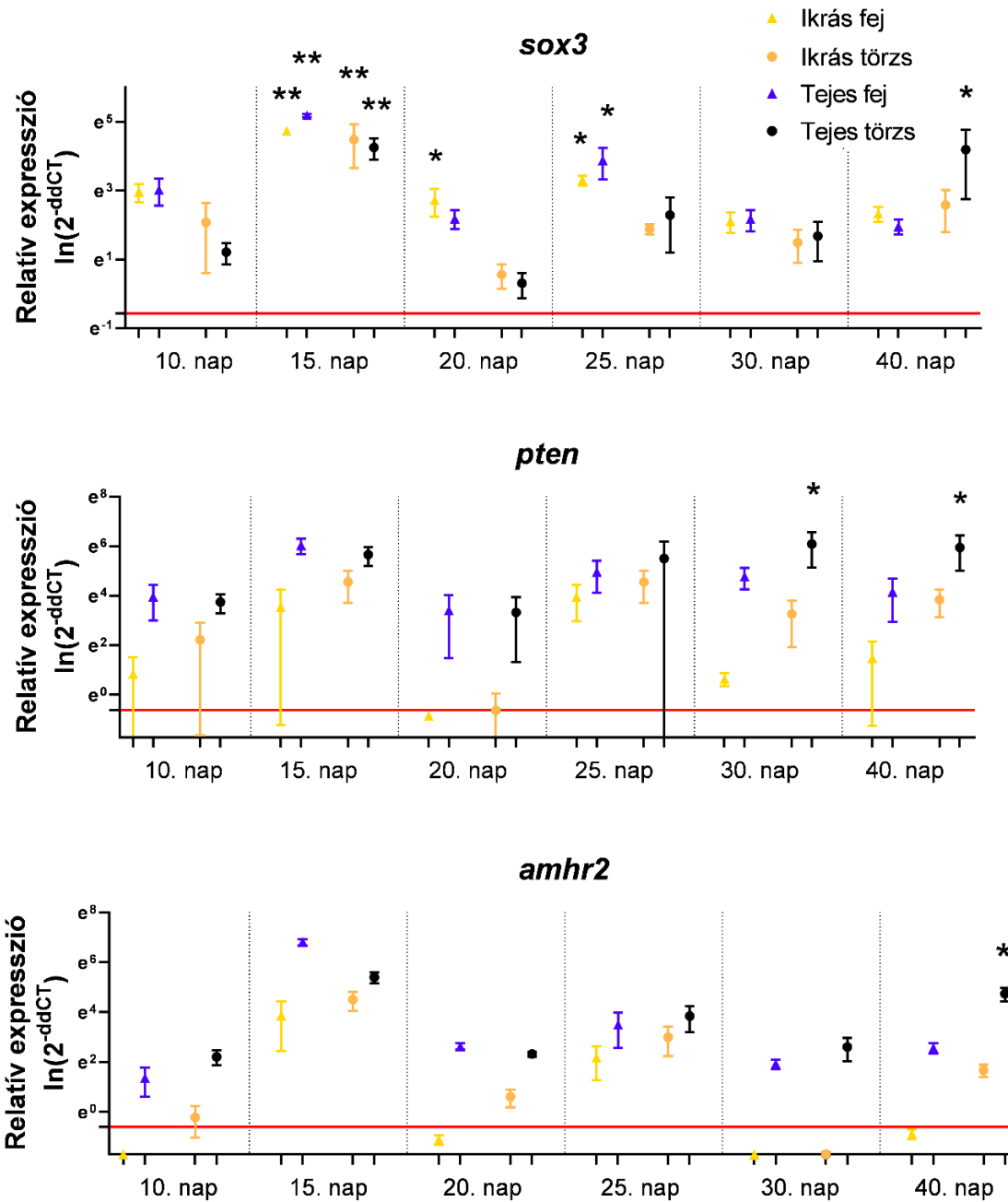
Emlősök és csontoshalak esetén is ismert a hipofízis-agyalapi mirigy-ivarszerv kapcsolata és ivaronkénti különbségeket is megfigyeltek a központi idegrendszer, ezzel együtt

az agy területén bizonyos ivari fejlődésben szerepet játszó gének, illetve nemi hormonok mennyiségében (FENG ET AL., 2020; GORSKI, 1985). Ugyanakkor az még vitatott, hogy az agyban található különbségek az ivarszervből származó faktorok hatására, vagy egyéb, genetikai vagy hormonális, esetleg környezeti tényezők hatására (amelyekre az egyes ivarok eltérően reagálnak) alakulnak ki, melyek származási helye nem az ivarszerv (RAJENDIRAN ET AL., 2021; SENTHILKUMARAN ET AL., 2015). Ebben az esetben az ivarszerv differenciálódásának irányát befolyásolhatják a központi idegrendszerből származó faktorok. Vizsgálataim során csak a fejben találtam szignifikáns ivaronkénti különbséget a női ivar irányába ható gének kifejeződésében, azonban annak bizonyítása, hogy az ivari differenciálódás az agyban vagy az ivarszervekben kezdődik meg először, még további vizsgálatokat igényelne.

5.2.2. A here differenciálódásában szerepet játszó gének (*sox3*, *amhr2*, *pten*, *mark2*)

Afrikai harcsában a korábbi kutatások a hímek ivari differenciálódásának kezdetét 40 napos kor környékén határozták meg, valamivel később, mint az ikrásoknál. Az általam vizsgált, elsősorban a hím ivarban ható négy gén, a *sox3*, *amhr2*, *pten* és a *mark2* expressziója a kontrollhoz (8 nappal a kikelést követően, vegyes ivar) viszonyítva a *sox3* esetében 15, a *mark2* és a *pten* esetében 20, illetve 30, az *amhr2* esetében pedig 40 napos kor környékén már mutat szignifikáns eltérést **(13., 14. ábra)**.

A *sox3* gén korábbi kutatások szerint *Oryzias dancena* és *Clarias batrachus* fajokban a herék kialakításában vesz részt (RAJAKUMAR & SENTHILKUMARAN, 2014; RAJAKUMAR & SENTHILKUMARAN, 2016; TAKEHANA ET AL., 2014). Afrikai harcsában is az ivarérett tejesekben írtak le magasabb expressziót (RAGHUVÉER ET AL., 2011), ugyanakkor Raghuveer és munkatársai már a bipotenciális gonádban is megfigyeltek mérsékelt *sox3* expressziót. Vizsgálataim során szövetenként és fejlődési stádiumonként összehasonlítva nem találtam a két ivar között szignifikáns eltérést a *sox3* gén expressziójában, ugyanakkor az egyedi csoportokat a kontroll csoporthoz viszonyítva már 15 nappal a kikelést követően megfigyelhető volt magasabb expresszió mind a négy vizsgálati csoportban, ami a fejben magasabb volt 20. és a 25. napon is **(13. ábra)**. Ezt követően 40 napos korban volt szignifikánsan magasabb a *sox3* mRNS szintje a tejesek törzsében.



13. ábra: Hím ivar irányába ható gének (*sox3*, *pten*, *amhr2*) expressziós eredményei. A relatív expresszió (2^{-ddCt}) átlaga és sztenderd hibája vizsgálati csoportonként (ikrás és tejes fej és törzs, 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően), linearizált skálán ábrázolva, a szignifikancia szintek ($p < 0,05$) a kontroll csoporthoz (vegyes ivar, teljes test, 8 nappal kikelést követően) viszonyítva. A kontroll csoport ($2^{-ddCt} \sim 1$) piros vonallal van jelölve.

In silico analízissel, BLAST algoritmus segítségével (blastn) illesztettem a CgaY1 ivar-specifikus markert és az azt tartalmazó hosszabb DNS szekvenciát (scaffoldot, scf484) az NCBI adatbázisban megtalálható összes, sugarasúszójú halakból származó szekvenciára. A keresés eredményeként az *Ictalurus punctatus*-ból származó *pten* gén szekvenciáját találtam 88,42%-os egyezéssel. Egér modellen bizonyították ezen gén szerepét a PGC-k proliferációjában

(KIMURA ET AL., 2003), azonban tudomásom szerint csontoshalaknál még nem publikálták a *pten* ivari fejlődésben betöltött szerepét.

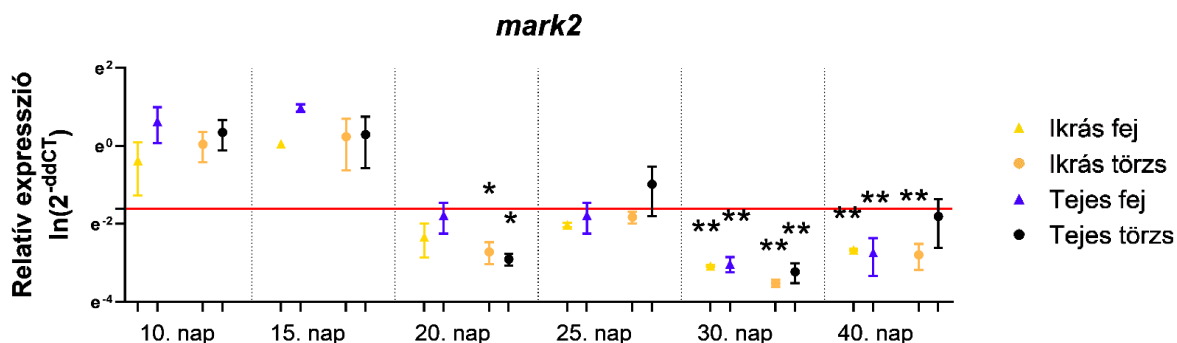
Vizsgálataim alapján a *pten* gén expressziója a kontroll csoporthoz viszonyítva 30 és 40 nappal a kikelést követően szignifikánsan magasabb mindkét esetben a tejes törzsben. Emellett 15 és 25 napos korban is megfigyelhető a *pten* mRNS-ek mennyiségének emelkedése, azonban ez a kontrollhoz viszonyítva nem szignifikáns, melynek lehetséges magyarázata az alacsonyabb mintaelemszám (n=3) ezekben a csoportokban (**13. ábra**).

Az *amhr2* mRNS mennyisége a kontroll csoporthoz viszonyítva 40 napos korban a tejesek törzsében volt szignifikánsan magasabb. A *Siluriformes* rendből tudomásom szerint nem rendelkezünk irodalmi adatokkal az *amhr2* gén expressziójára vonatkozóan, azonban más fajokban leírták az *amhr2* ivari fejlődésben betöltött szerepét és magasabb mRNS mennyiséget a tejesekben (FERON ET AL., 2020; NAKAMOTO ET AL., 2021; WEN ET AL., 2022). Eredményim a más fajokban leírtakhoz hasonlóak.

In silico analízissel, BLAST algoritmus segítségével (blastx) illesztettem a CgaY1 ivar-specifikus markert és az azt tartalmazó hosszabb DNS szekvenciát (scaffoldot, scf484) az NCBI adatbázisban megtalálható összes, sugarasúszójú halakból (Actinopterygii) származó szekvenciára és a megadott feltételekkel a *mark2* gént találtam, legnagyobb egyezéssel (97,3%) *Pangasianodon hypophthalmus* fajban. A mostani keresés az azóta publikált (NGUINKAL ET AL., 2023) afrikai harcsa teljes genom szekvencia annotálása során prediktált *mark2a* génnel 97,99%-os szekvencia homológiát mutat. Megjegyzendő azonban, hogy a *mark2* szerepét az ivari fejlődés során tudomásom szerint eddig nem írták le semmilyen gerinces fajban.

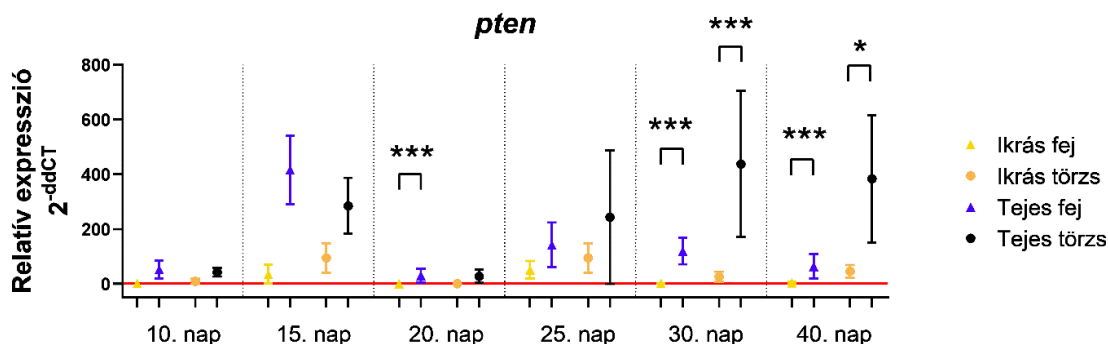
Vizsgálataim alapján a *mark2* gén a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan alul-expresszált 20 nappal a kikelést követően mindkét ivar törzsében, 30 napos korban mind a négy vizsgálati csoportban, 40 nappal kikelést követően pedig mindkét ivar fejében, valamint az ikrás törzsben is (**14. ábra**). Eredményeimből azonban látható, hogy a későbbi (20, 25, 30, 40 napos) fejlődési stádiumokhoz viszonyítva a 10 és 15 napos korban mért mRNS mennyisége kis mértékben, de magasabb. Elképzelhető, hogy ebben az esetben nem megfelelő a 8 napos vegyes ivarú csoportot referencia csoportként alkalmazni, mert előfordulhat, hogy a *mark2* gén expressziója már ebben a fejlődési stádiumban emelkedett. Lehetséges, hogy egy korábbi fejlődési stádiumú referencia csoportot használva a 8, 10 és 15 napos korban mért *mark2* mRNS mennyisége már szignifikáns növekedést mutatna. A két ivar közötti eltérést fejlődési stádiumonként és szövet típusonként vizsgálva nem találtam szignifikáns eltérést, azonban 10 napos korban a fejben és a törzsben, 15 napos korban pedig a fejben volt valamivel magasabb a tejesekben mért *mark2* mRNS mennyisége. Lehetséges, hogy a minták elemszámának

növelésével (jelenleg ez n=3) ez a kismértékű, de egyértelmű ivaronkénti eltérés szignifikáns eredményt mutatna, azonban a fentiek bizonyítása további kísérleteket igényelne.



14. ábra: A *mark2* gén expressziós eredményei. A relatív expresszió (2^{-ddCt}) átlaga és sztenderd hibája vizsgálati csoportonként (ikrás és tejes fej és törzs, 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően), linearizált skálán ábrázolva, a szignifikancia szintek ($p < 0,05$) a kontroll csoporthoz (vegyes ivar, teljes test, 8 nappal kikelést követően) viszonyítva. A kontroll csoport ($2^{-ddCt} \sim 1$) piros vonallal van jelölve.

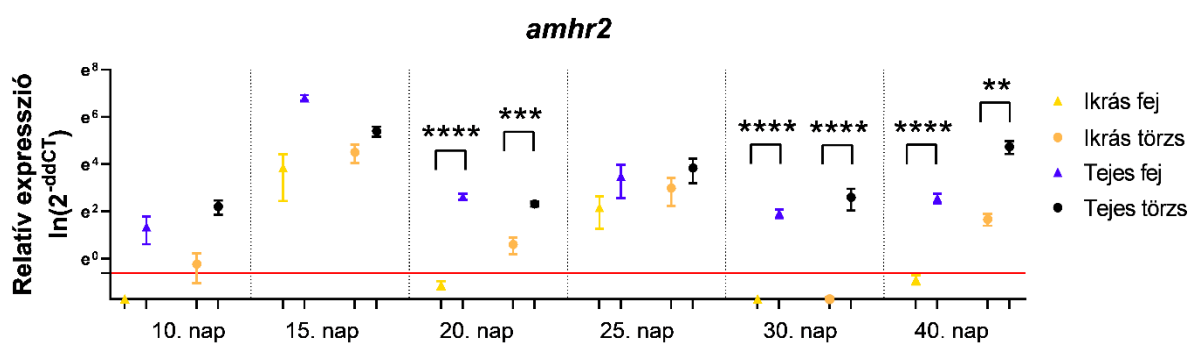
Az expresszió két ivar közötti eltérését szövetenként (tejes fej – ikrás fej, tejes törzs – ikrás törzs) és fejlődési stádiumonként (10, 15, 20, 25, 30, 40 nappal kikelés után) külön vizsgálva a hím ivarhoz köthető gének (*sox3*, *amhr2*, *pten* és *mark2*,) közül két esetben találtam szignifikáns eltérést: a *pten* és az *amhr2* gén esetében. A *pten* transzkriptek mennyisége tejesekben 20 nappal a kikelést követően a fejben, valamint 30 és 40 nappal kikelést követően a fejben és a törzsben volt szignifikánsan magasabb (15. ábra). Mindemellett jól látható, hogy bár szignifikáns különbség az ivarok között a többi vizsgálati csoportban nincsen, de minden fejlődési stádiumban és szövetben magasabb a *pten* expressziója a tejesekben, valamint nagy szórással, de nagymértékben emelkedik a hírvivő RNS-ek mennyisége 15 napos korban.



15. ábra: A *pten* gén expressziója magasabb tejesekben, mint az ikrásokban. A relatív expresszió (2^{-ddCt}) átlaga és sztenderd hibája vizsgálati csoportonként (ikrás és tejes fej és törzs, 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően), a két ivar közötti eltérést fejlődési stádiumonként és szövet típusonként egymáshoz viszonyítva, $p < 0,05$ szignifikancia szinttel. A kontroll csoport ($2^{-ddCt} \sim 1$) piros vonallal van jelölve.

Több fajban, például a japán medakában és a nilusi tilápiában is megfigyelték, hogy az első ivarak közötti különbség az ivari differenciálódás során az ivarsejtek nagyobb arányú felszaporodása az ivarszerv kezdeményében az ikrásokban, melyet pár nappal később követ a szomatikus szövetek átalakulása (SIEGFRIED, 2010). A PTEN gén emlősökben az ivari őscsírasejtek osztódását gátolja (CHU & TARNAWSKI, 2004; YIN & SHEN, 2008), sejt kultúrában tartott PGC-kben a csendesítése magasabb proliferációt okoz (KIMURA ET AL., 2003). Eredményeim alapján elképzelhető, hogy afrikai harcsában is megfigyelhető az ivarsejtek nagyobb mértékű felszaporodása az ikrások esetén, melyekben a *pten* gén kifejeződése alacsonyabb a tejeselekhez viszonyítva. Eredményeim arra utalnak, hogy az afrikai harcsában az ivarszerv differenciálódása 10 és 15 napos kor között kezdődhet meg. A *pten* gén, mely a CgaY1 hím-specifikus marker közelében helyezkedik el az afrikai harcsa genomában és minden vizsgált fejlődési stádiumban és szövetben magasabb expressziót mutat tejeselekben, feltételezhetően egy fontos gén a faj ivari fejlődése szempontjából.

Az *amhr2* gén mRNS-ének mennyiségében mind a fejben, mind a törzsben szignifikáns különbséget találtam ivaronként 20, 30 és 40 napos korban (**16. ábra**). 10, 15 és 25 napos fejlődési stádiumokban is megfigyelhető, hogy magasabb az *amhr2* transzkriptek mennyisége tejeselekben, mint az ikrásokban, azonban feltételezhetően az alacsony mintaelemszám miatt nem kaptam szignifikáns különbséget. Eredményeim hasonlóak a más halfajokban megfigyelt eredményekkel (IJIRI ET AL., 2008; KLÜVER ET AL., 2007; MORINAGA ET AL., 2007).

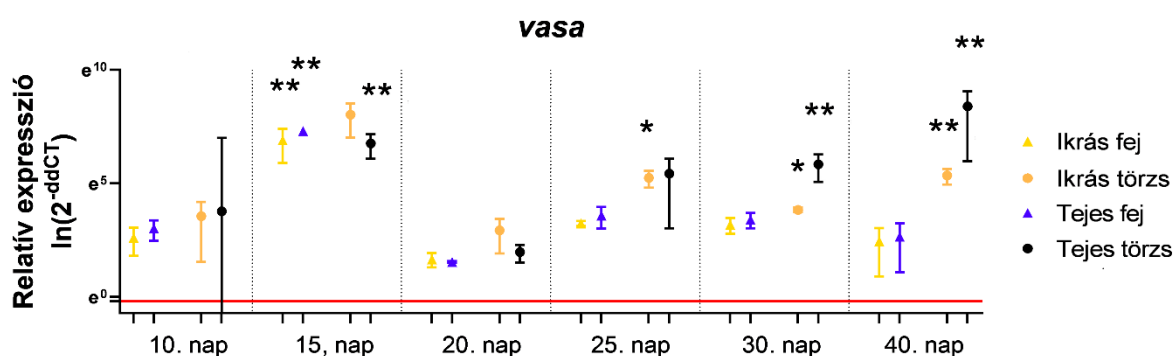


16. ábra: Az *amhr2* gén expressziója magasabb tejeselekben, mint az ikrásokban. A relatív expresszió (2^{-ddCt}) átlaga és sztenderd hibája vizsgálati csoportonként (ikrás és tejes fej és törzs, 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően), a két ivar közötti eltérést fejlődési stádiumonként és szövet típusonként egymáshoz viszonyítva, $p < 0,05$ szignifikancia szinttel. A kontroll csoport ($2^{-ddCt} \sim 1$) piros vonallal van jelölve.

5.2.3. Az ivari őscsírasejtekben kifejeződő *vasa* gén expressziójának analízise

A *vasa* (*ddx4*) gén olyan fehérjét kódol, mely az ivari őscsírasejtekben (PGC-k), az ivari redő területén és a felnőtt ivarsejtekben fejeződik ki (CASTRILLON ET AL., 2000), emiatt alkalmas marker a PGC-k kimutatására. Fiatal, vegyes ivarú afrikai harcsák teljes testéből izolált RNS segítségével korábban kimutatták, hogy 0-12-órával kikelést követően stabil, majd ezt követően 12 óráig csökkenő volt a *vasa* mRNS-ek mennyisége, mely valószínűleg anyai eredetű (RAGHUVEER & SENTHILKUMARAN, 2010a). Később, 10-20 napos korban ismét emelkedni kezdett a *vasa* mRNS-ek mennyisége, mely 50-100 napos korban érte el a csúcst (RAGHUVEER & SENTHILKUMARAN, 2010a). Megjegyzendő azonban, hogy a korábbi kutatások az ivaronkénti és a szövetenkénti különbségeket nem vizsgálták.

Vizsgálataim során 15 nappal a kikelést követően figyeltem meg szignifikánsan magasabb *vasa* expressziót a tejes és ikrás fejben, valamint a tejes törzsben (17. ábra) a kontroll csoporthoz viszonyítva (8 nappal kikelést követően, vegyes ivar). Eredményeim a korábbi kutatások adataival egybevágnak, ahol 10-20 napos kor között detektálták a *vasa* hírvivő RNS-ek szintjének emelkedését (RAGHUVEER & SENTHILKUMARAN, 2010a). Ezt követően 25 napos korban az ikrás törzsben, 30 és 40 napos korban pedig mindkét ivar törzsében megfigyelhető volt magasabb expresszió a kontrollhoz viszonyítva. A két ivar közötti esetleges különbségeket fejlődési stádiumonként és szövet típusonként vizsgálva nem találtam szignifikáns eltérést.

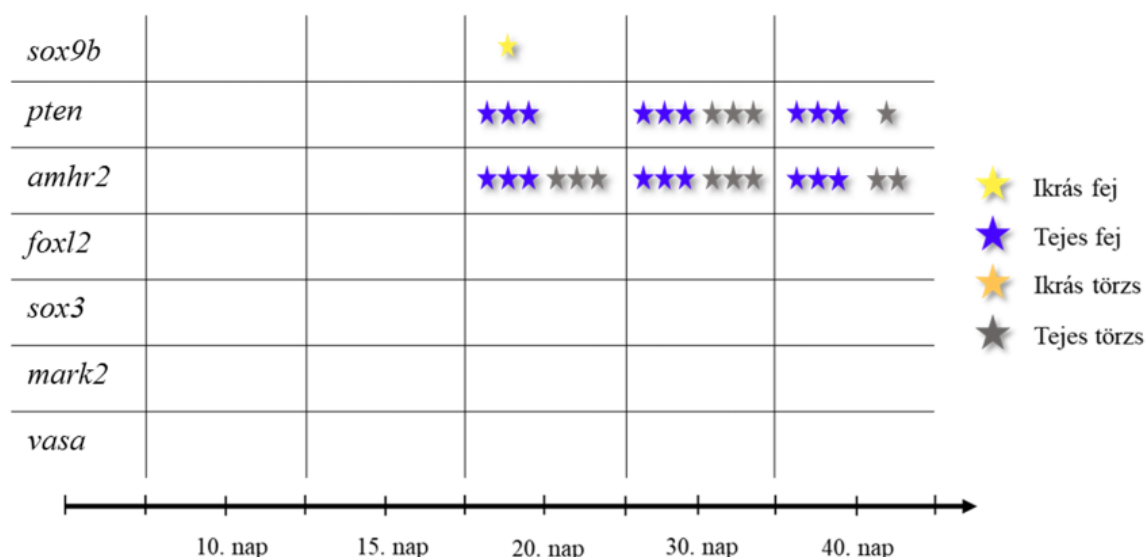


17. ábra: A *vasa* mRNS már 15 napos korban kimutatható a törzsben és a fejben is. A relatív expresszió (2-ddCt) átlaga és sztenderd hibája logaritmikus skálán (ln), vizsgálati csoportonként (ikrás és tejes fej és törzs, 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően) ábrázolva, a szignifikancia szintek ($p < 0,05$) a kontroll csoporthoz (vegyes ivar, teljes test, 8 nappal kikelést követően) viszonyítva. A kontroll csoport [$\ln(2\text{-ddCt} \sim 1)$] piros vonallal van jelölve.

Az ivari differenciálódást megelőző folyamat a PGC-k vándorlása, ami sokféle külső és belső faktor összehangolt működésének az eredménye (BARTON ET AL., 2016; RICHARDSON & LEHMANN, 2010). Ha ebben a folyamatban valamelyik tényező nem megfelelően működik, például valamelyik génben mutáció történik vagy valamelyik környezeti grádiens nincs jelen, a PGC-k vándorlása nem a megszokott úton játszódik le (ANDERSON ET AL., 1999). Ez magyarázhatja a *vasa* mRNS-ek jelenlétét 15 napos korban a fejben. Ez a megfigyelés korábbi eredményeimet is alátámasztja, miszerint az ivari differenciálódás 10 és 15 napos kor között kezdődik meg afrikai harcsa fajban, tehát a PGC-k vándorlása ebben a fejlődési stádiumban érhet véget. Későbbi fejlődési stádiumokban, 25, 30 és 40 napos korban már csak a törzsben mutattam ki a *vasa* gén expresszióját, mely arra utalhat, hogy azok a PGC-k, ahol a migráció nem megfelelően zajlott le – feltehetően programozott sejthalál útján – eltűntek a fejből.

5.2.4. Az ivaronkénti expressziós mintázat eredményeinek összefoglalása

A vizsgált hét gén közül három esetben találtam szignifikáns ivaronkénti különbséget: a *sox9b*, a *pten* és az *amhr2* esetén. A *sox9b* mennyisége az ikrásokban, a *pten* mennyisége pedig a tejeseekben volt magasabb 20 napos korban a fejben. Az *amhr2* 20 nappal kikelést követően mind a fejben, mind a törzsben magasabb volt a tejeseekben. Összességében megállapíthatjuk, hogy ettől a fejlődési stádiumtól kezdve már egyértelmű ivaronkénti különbségek figyelhetők meg mind a fejben, mind a törzsben (18. ábra).



18. ábra: A génexpresszió statisztikailag szignifikáns eltérései az ikrás és tejes fejben és törzsben.
 * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; üres cellák - $p > 0,05$; sárga- ikrás fejben, kék- tejes fejben, fekete- tejes törzsben magasabb mRNS mennyiség

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1. Az afrikai harcsa genetikai ivardeterminációs rendszere

Az afrikai harcsa ivardeterminációs mechanizmusát illetően korábban több ellentmondásos eredményt publikáltak: egyesek XX/XY (GALBUSERA ET AL., 2000; KOVÁCS ET AL., 2001; LIU ET AL., 1996), mások ZZ/ZW (OZOUF-COSTAZ ET AL., 1990; VÁRADI ET AL., 1999) ivardeterminációs rendszert írtak le. Nemrég thai kutatók a két rendszer együttes jelenlétét feltételezték Thaiföldről származó állományokban (NGUYEN ET AL., 2021a).

Munkám során egy, a kutatócsoportunk elődjében izolált (KOVÁCS ET AL., 2001) hím-specifikus afrikai harcsa DNS marker (CgaY1) több generációs validálását végeztem el, mely a faj hazai populációiban az XX/XY ivardeterminációs rendszer jelenlétét támasztja alá. Emellett sikerrel teszteltem a CgaY1 hím-specifikus markert a hazai állományoktól genetikailag távol álló vietnámi mintákon (n=61) is. Szintén teszteltem négy, mások által leírt „mérsékelten ivarhoz kötött” markert (NGUYEN ET AL., 2021a) a két ivardeterminációs rendszer esetleges együttes jelenlétének kimutatása céljából. Három „mérsékelten hím-asszociált” (*dtna*, *add3*, *gucd1*) és kettő „mérsékelten nőstény-asszociált” (*dctn4*, *pcdh2ab3*) lókuszt közül BLAST analízissel a *gucd1* markert nem sikerült detektálni. A PCR reakciók alapján a másik négy markerrel egyik esetben sem találtam ivaronkénti különbséget. Mindezek alapján feltételezem, hogy az általam vizsgált afrikai harcsa állományok ivarát kizárólag hím heterogametikus (XX/XY) ivardeterminációs rendszer határozza meg, ugyanakkor nyilvánvaló, hogy fajsztíntű következtetések levonásához további állományok vizsgálata lenne szükséges.

A CgaY1 marker több generációs tesztelése során 451 vizsgált egyedből 16 esetben találtam eltérést a fenotípusos és a genotípusos ivar között: öt tejesből nem sikerült felszokszorozni a CgaY1 hím-specifikus markert, és 11 ikrásban megjelent az, többszörös ellenőrzés ellenére is. A jelenség magyarázata lehet, hogy rekombinációs esemény történt az ivari marker és az ivardetermináló gén között. Ebben az esetben a rekombináció átlagos gyakorisága a 30 páros keresztezésből származó F2 generációban 2,69 %, ahol a P0 szülők a fenotípusuknak megfelelő markerrel rendelkeztek és az F1 generáció szülőállománya véletlenszerűen került kiválasztásra. Így a genetikai távolság mértéke 2,69 cM. Az F3 generáció létrehozásánál szintén 30 páros keresztezésben csak azokat az egyedeket használtam fel, melyek a fenotípusuknak megfelelő CgaY1 markerrel rendelkeztek. A rekombináció átlagos

gyakorisága ebben a generációban 4,51 % volt, így a genetikai távolság mértéke 4,51 cM. Egy korábbi kutatásban (KOVÁCS, 2004) egy, a Szarvas Fish Kft. állományából származó tenyészpártól származó 179 F1 utód esetén azt találták, hogy a CgaY1 marker az esetek 3,4 %-ában nem felelt meg a fenotípusos ivarnak. Amennyiben véletlenszerű rekombinációt feltételezünk az ivardetermináló régió és az ivari marker között, úgy a rekombináció átlagos gyakorisága véletlenszerű keresztezések esetén generációnként egyre magasabb lenne. Kísérleteim alapján a genetikai távolság átlagos értéke a két generációban 3,6 cM, a korábbi kutatásban, a Szarvas Fish Kft. állományában 3,4 cM. Mindez arra utal, hogy a CgaY1 ivari marker és az ivardetermináló régió között szoros genetikai kapcsoltság áll fenn.

Nagy áteresztőképességű szekvenálással vizsgáltam 192 egyed genomját és kiválasztottam a tizenkét fenotípusos ivarral legszorosabb kapcsoltságot mutató SNP markert, melyek tíz lókuszon helyezkednek el. Szekvencia összehasonlítással (BLAST elemzéssel) a tíz lókuszból hetet a nemrég publikált (NGUINKAL ET AL., 2023) afrikai harcsa genom 24-es kromoszómájára sikerült illesztenem. A publikált genom szerzői a kutatásom során validált CgaY1 hím-specifikus markert szintén az afrikai harcsa genom 24-es kromoszómáján találták meg (NGUINKAL ET AL., 2023), azonban nekem egy el nem helyezett genomi szekvenciára (36-os scaffold) sikerült illesztenem azt. A kutatócsoportunk által végzett korábbi teljes genom szekvenálásból származó, CgaY1 markert tartalmazó scaffold (scf484) és az általuk annotált *pten* gén szekvenciája is a 36-os scaffold-ra illeszkedett. Ezek alapján elképzelhetőnek tartom, hogy az ivardeterminációban szerepet játszó genomi régió a 24-es kromoszómán helyezkedik el, de feltételezem, hogy az el nem helyezett 36-os scaffold is fontos szerepet játszik a folyamatban. Lehetséges, hogy a 24-es kromoszóma az X, a 36-os scaffold pedig az Y kromoszómának felel meg. A 36-os scaffoldon talált egyes gének (*amhr2*, *mark2*, *pten*) fontos szerepet játszhatnak az ivardetermináció, illetve az ivari differenciálódás folyamatában.

Javaslatok a további kutatásokhoz: Javaslom a CgaY1 hím-specifikus marker vizsgálatát a faj ázsiai, lehetőleg Thaiföldről származó populációin a fajra jellemző ivardeterminációs rendszer tisztázására. Javaslom továbbá a marker tesztelését további generációkban a genetikai kapcsoltság és a genetikai távolság mértékének meghatározására. Ezen túlmenően érdemes lenne olyan egyedeket keresztezni, ahol a fenotípusos ivar nem egyezik a CgaY1 markerrel vizsgált genotípusos ivarral és az utódállomány ivararányát megfigyelni. Javaslom az általam izolált SNP markerek és a nemrég megjelent afrikai harcsa genom segítségével egy olyan genetikai kapcsoltsági térkép létrehozását, mely lehetővé tenné az ivardetermináció szempontjából fontos genomi régiók pontosabb meghatározását. Hasznos lenne a Nguinkal és

munkatársai által publikált genom 36-os scaffold-jának részletesebb elemzése, kiemelten az *amhr2*, *pten* és *mark2* génekre irányultan. Javaslom továbbá az izolált SNP markerek SCAR markerré alakítását, kiemelten a két legmagasabb F_{ST} értékkel rendelkező markert (6., 11.), valamint azt a lókuszt, amely három SNP markert (3., 4., 5.) is tartalmaz.

6.2. A hőmérséklet afrikai harcsa ivarára gyakorolt esetleges hatásának vizsgálata

Korábbi kutatások eredménye alapján vizsgáltam azt a hipotézist, hogy afrikai harcsa fajban a genetikai ivardetermináció környezeti (hőmérséklet) hatással felülírható-e (SANTI ET AL., 2016; SANTI ET AL., 2017; SANTI ET AL., 2019). Ezen eredmények szerint 36 °C-os vízhőmérséklet hatására egyes családokban más-más arányban ivarátfordulás következik be, melynek kritikus időszakát a kikelést követő 6-8. nap között határozták meg. A jelenséget nem vizsgálták molekuláris módszerekkel, az utódok ivararánya alapján következtettek az ivarátfordulásra és bizonyos családokban 100%-os hím ivararányt is elértek. Én is megvizsgáltam a Santi és munkatársai (2016, 2017) által javasolt, hőmérséklet hatására történő ivarátfordítást a magyar állományon: a 30 páros keresztezésből származó utódokat 36 ± 1 °C-os vízhőmérsékleten neveltem három-három napig, a kezelést 5 (T1), 7 (T2) és 9 (T3) nappal kikelést követően indítva. Összesen 123, a fenotípusa alapján teljesnek látszó egyedből négy (3,25%) esetben nem sikerült PCR-rel felszorozni a CgaY1 hím-specifikus fragmentet. Ez az arány nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporttól, ahol 191 vizsgált egyedből 9 esetben találtunk eltérést (4,71%) a fenotípus és genotípus között. A hőkezelt csoportok egyikében sem találtam eltérést a 1:1 fenotípusos ivararányhoz képest (44%, 53%, 44% volt a hímek aránya az A, B és C csoportban). A hőkezelt csoportok ivararányát a kontroll csoportok ivararányához (58%, 58% és 50% a hímek aránya az F3A, B és C Mix kontroll csoportokban, lásd **3. táblázat**) viszonyítva sem figyeltem meg szignifikánsan magasabb hím ivararányt.

Eredményeim alapján a hőkezelés hatására ivarátfordulás nem történt, azonban megemlíteném, hogy sok egyéb halfajnál erős szülői (BAROILLER ET AL., 2009b; SHEN & WANG, 2014), valamint populációs (VALENZUELA & LANCE, 2004) hatást figyeltek meg a hőmérsékletre adott válasz tekintetében. Előbbiekén túl a Santi és munkatársai által is megfigyelt magas mortalitást és sok morfológiai elváltozást tapasztaltam: 90 nappal kikelés után 31 %-kal volt magasabb a mortalitás a hőkezelt csoportokban. Ezek alapján feltételezem, hogy a fenti paraméterek nem alkalmasak egyivarú állomány létrehozására a magyarországi afrikai harcsa állományokban.

Javaslatok a további kísérletekre: Javaslom a hőkezelés hőmérsékletének csökkentését a mortalitás alacsonyabb szinten tartására, esetleg a kezelés időtartamának növelését annak tesztelésére, hogy a hőmérséklet általi ivarátfordítás megfigyelhető-e e faj más vonalai, szelektált állományai, vagy egyedi keresztezések (családok) esetében.

6.3. Az ivaronkénti génexpresszió analízise az afrikai harcsa korai fejlődése során

Afrikai harcsában az ivarszervek differenciálódása egyes szerzők szerint ikrásoknál 20, míg tejeseknél 42 nappal a kikelést követően kezdődik meg (BUDD ET AL., 2015). Mások szerint ikrásoknál 28 nappal a kikelést követően figyelhető meg a petefészek üreg és benne a PGC-k, mint az első fenotípusos ivari jelleg, míg a herék legkorábban 42 napos korban ismerhetők fel (VAN DEN HURK ET AL., 1989). A *Siluriformes* rendbe tartozó ázsiai cápaharcsa (*Pangasianodon hypophthalmus*) esetén azt találták, hogy az ivari redő 15 napos korban alakult ki és a testi sejtek 20 napos korban zárták körbe a primordiális őscsírasejteket, melyek proliferációja 25 nappal kikelést követően kezdődött meg (DUANGKAEW ET AL., 2019). Az afrikai harcsán végzett korábbi génexpressziós vizsgálatok az ivaronkénti expressziós különbségeket csak 50 napos kor után, a gonádok szöveti differenciálódását követően vizsgálták, emiatt a korai ivaronkénti különbségekről, melyek szerepet játszhatnak a korai ivarszerv kezdemény sorsának kialakításában, nem rendelkezünk információval. Az irodalomban elérhető afrikai harcsát vizsgáló kutatások emellett elsősorban az ivarszervek génkifejeződésének eredményeit tartalmazzák, kevés adat áll rendelkezésre az agyról. Emlősök és csontoshalak esetén is megfigyelhetőek ivaronkénti különbségek az agyban, ugyanakkor az még vitatott, hogy az agyban található különbségek az ivarszervből származó faktorok hatására alakulnak ki vagy fordítva (RAJENDIRAN ET AL., 2021; SENTHILKUMARAN ET AL., 2015).

Vizsgáltam a *vasa*, *foxl2*, *sox3*, *sox9*, *pten*, *amhr2* és *mark2* gének korai expresszióját ivaronként (tejes és ikrás) két testrészen (fej és törzs) 10, 15 és 25 nappal a kikelést követően, öt-öt egyedből álló 'poolozott' mintán, három biológiai ismétléssel, valamint 20, 30 és 40 nappal kikelést követően, egyedi mintákon, 12 biológiai ismétléssel. Az irodalmi adatok alapján női ivar irányába ható gének (*sox9b*, *foxl2*) esetében mindhárom gén szignifikánsan magasabb expressziót mutatott már 15 nappal kikelést követően a kontroll csoporthoz képest. A herék differenciálódásában szerepet játszó gének (*sox3*, *mark2*, *amhr2*, *pten*) közül csak a *sox3* mRNS szintje nőtt szignifikánsan, szintén 15 napos korban, mely későbbi fejlődési stádiumban történő ivari fejlődést valószínűsít a tejesekben. Ugyanakkor a *mark2* gén esetén szignifikánsan alacsonyabb génkifejeződést figyeltem meg 20 napos korban, emiatt elképzelhetőnek tartom,

hogy másik referencia csoport használatával már 10-15 napos korban vagy azelőtt is kimutatható lenne a *mark2* mRNS mennyisége, várhatóan a tejeseekben. A *vasa* mRNS-ek, melyek az irodalmi adatok alapján csak a PGC-kben találhatóak meg, szintén 15 nappal a kikelést követően voltak kimutathatóak. Előbbiek alapján feltételezem, hogy afrikai harcsa esetén az ivari differenciálódás már 15 nappal a kikelést követően megkezdődik.

Az általam tanulmányozott génekről átíródó mRNS-ek szintjét fejlődési stádiumonként és szövetenként külön-külön vizsgálva, a két ivar között három gén esetében találtam eltérést. A *sox9b* mRNS mennyisége 20 nappal a kikelést követően szignifikánsan magasabb volt az ikrás fejben. A *pten* gén mRNS mennyisége későbbi fejlődési stádiumokban is, de legkorábban 20 napos korban mutatott ivari dimorfizmust, magasabb volt a tejes fejben. Az *amhr2* szintén legkorábban 20 napos korban volt magasabb tejeseekben mind a fejben, mind a törzsben. Előbbiek alapján elképzelhető, hogy az ivari fejlődés afrikai harcsa esetében az agyban kezdődik és az innen származó faktorok okoznak ivaronkénti különbségeket a differenciálódó ivarszervben.

Több fajban leírták, hogy az első különbség a két ivar között az ivari differenciálódás során az ivarsejtek nagyobb arányú felszaporodása a petefészek kezdeményben a heréhez képest (SIEGFRIED, 2010). Vizsgálataim során minden fejlődési stádiumban és szövetben magasabb *pten*, valamint *amhr2* expressziót figyeltem meg a tejeseekben. A *pten* mRNS mennyiségének ivaronkénti különbsége 20 napos korban a fejben, valamint 30 és 40 napos korban a fejben és a törzsben is szignifikáns volt. Az *amhr2* expressziója 20, 30 és 40 napos fejlődési stádiumban minden testrészben szignifikánsan magasabb volt a tejeseekben. A PTEN gén emlősökben a sejtek osztódását gátolja (CHU & TARNAWSKI, 2004; YIN & SHEN, 2008), sejt kultúrában PGC-kben történő elcsendesítése növeli a felszaporodás mértékét (KIMURA ET AL., 2003). Az *amh/amhr2* szignáltranszdukciós útvonal más fajokban szintén a PGC-k proliferációját és érését szabályozza (ADOLFI ET AL., 2019; YAN ET AL., 2019). Ezek alapján elképzelhető, hogy afrikai harcsában, az ikrásokban megfigyelt *pten* és *amhr2* mRNS-ek alacsonyabb szintje a PGC-k fokozott szaporodását segíti elő. Amennyiben igaz, hogy a *pten* vagy az *amhr2* gén hatására ivari dimorfizmus alakul ki a PGC-k számában, érdekes lehet annak vizsgálata, hogy ezek közül kerül-e ki az elsődleges ivardeterminációs faktor.

Javaslatok a további kísérletekre: Eredményeim alapján feltételezem, hogy az afrikai harcsa ivari fejlődése 15 napos kor környékén kezdődik, és a folyamatban az agyból származó faktorok is fontos szerepet játszanak. Emiatt érdemes lenne egy nagy áteresztőképességű transzkriptóma vizsgálatot végezni ebben a fejlődési stádiumban, lehetőség szerint külön az agyban és az

ivarszervekben is. Javaslom továbbá, ivarátfordított egyedek agyában egy transzkriptóma vizsgálat elvégzését. Ezen felül szintén érdemes lenne 15-20 napos kor környékén *in situ* hibridizációs technikával megvizsgálni, hogy van-e ivaronkénti különbség a PGC-k mennyiségében. Amennyiben igen, érdemes lenne génkiütéssel vagy géncsendesítéssel megvizsgálni a *pten* és az *amhr2* gének szerepét a folyamatban. Javaslom emellett a *pten*, az *amhr2* és *mark2* gének további vizsgálatát, valamint ezen gének kapcsolatának elemzését is.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Vizsgálataim alapján a következő megállapításokat tettem:

1. Megállapítottam, hogy az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) általam vizsgált magyar és vietnámi állományaira kizárólag hím heterogametikus (XX/XY) ivardeterminációs rendszer jellemző.
2. Három generáció 451 egyedének genotipizálásával validáltam a korábban izolált CgaY1 hím ivar-specifikus DNS markert. Megerősítettem, hogy a CgaY1 hím-specifikus marker az ivardetermináló régióval kapcsoltan öröklődik, és attól 3,4-3,6 cM genetikai távolságra helyezkedik el.
3. Afrikai harcsa állományokon 5-8, 7-10 és 9-12 nappal a kikelést követően, 36 °C-os vízhőmérséklettel végzett hőkezelésével cáfoltam azt a hipotézist, hogy az ivarátfordulást okozhat a magyar állományokban.
4. Izoltam több, mint 24 ezer polimorf SNP markert afrikai harcsa ikrásokból és hasonló számú markert a tejesekből is, melyekből tizenkettő feltételezhetően erősen ivarhoz kötött. Megállapítottam, hogy ezen markerek az afrikai harcsa 24-es kromoszómáján helyezkednek el. Ezzel megerősítettem azon korábbi jelzéseket, melyek az ivardetermináló régió elhelyezkedését valószínűsítették ezen a kromoszómán.
5. Afrikai harcsában elsőként vizsgáltam a korai ivaronkénti génexpressziós különbségeket molekuláris ivarmeghatározás segítségével, az ivar első fenotípusos jegyeinek megjelenése előtt fejben és törzsben. Megállapítottam, hogy az ivari differenciálódás feltehetően 15 nappal a kikelést követően megkezdődik.
6. Megállapítottam továbbá, hogy a *sox9*, az *amhr2* és a *pten* mRNS-ek mennyisége az ivarszervek differenciálódása előtt szignifikánsan különbözik ivaronként, emiatt feltételezem, hogy az afrikai harcsa ivari differenciálódának folyamatában ezen gének termékei szerepet játszanak.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) ivardeterminációs mechanizmusának és korai ivari differenciálódásának molekuláris vizsgálatát végeztem el. A faj genetikai ivardeterminációs rendszeréről ellentmondásos információkkal rendelkezünk, néhányan XX/XY, mások ZZ/ZW rendszert írtak le és nemrégiben a két rendszer együttes jelenlétét is feltételezték. Teszteltem egy hím-specifikus (CgaY1) DNS markert magyarországi és vietnámi állományokon, valamint öt mások által „mérsékelten ivarhoz-kötött”nek feltételezett markert (*dtna*, *add3*, *gucd1*, *dctn4*, *pcdh2ab3*) néhány egyedben. Eredményeim alapján az afrikai harcsa ezen populációi kizárólag XX/XY ivardeterminációs mechanizmussal rendelkeznek. A CgaY1 marker több generációs validálása által megerősítettem, hogy ez a hím specifikus marker az ivardetermináló régióval szoros kapcsoltságot mutat, attól 3,4-3,6 cM genetikai távolságra helyezkedik el.

Bizonyos szerzők szerint az afrikai harcsa genetikai ivardeterminációs rendszere környezeti hatással felülírható: magasabb hőmérsékleten (36 °C) magasabb hím ivararány figyelhető meg. Az általam, magyar állományokon végzett hőkezelés hatására nem történt ivarátfordulás: sem molekuláris ivarmeghatározás útján, sem az ivararányok megfigyelésével nem tudtam azt bizonyítani. Emellett magas mortalitást figyeltem meg a kezelt csoportokban, ezek alapján feltételezem, hogy a magas hőmérsékleti kezeléssel végzett ivarátfordítás nem alkalmas a hazai állományokban egyivarú termelési populációk létrehozására.

Vizsgáltam a *vasa*, *foxl2*, *sox3*, *sox9*, *amhr2*, *pten* és *mark2* gének korai kifejeződését fejben és törzsben, 10-40 napos kor között, ivaronként, molekuláris ivarmeghatározás segítségével. Eredményeim alapján az ivari differenciálódás jelei már 15 napos korban kimutathatóak ebben a fajban és a fejből (feltehetően az agyból) származó jelek is szerepet játszanak a folyamatban. Ivaronkénti különbséget találtam a *sox9* mRNS mennyiségében, mely az ikrás fejben volt magasabb 20 napos korban. Emellett a *pten* és az *amhr2* mRNS-ek mennyisége, mind a fejben, mind a törzsben magasabb volt a tejeseekben, több fejlődési stádiumban is. Egér modellen és sejtkultúrában bizonyították a *pten* gén szerepét a PGC-k proliferációjában és több hajfaj esetén megfigyeltek ivaronkénti különbséget a PGC-k mennyiségében a korai ivari fejlődés során, melynek közvetlen hatását az ivarra bizonyos fajok esetén bizonyították is. Az *amhr2* az irodalmi adatok alapján szintén a PGC-k proliferációját szabályozza. Elképzelhetőnek tartom, hogy a *pten* és az *amhr2* gén hímekben a PGC-k felszaporodásának gátlása által a tejes fenotípus kialakításában vesz részt.

Izoláltam több, mint 3600 új, ivarhoz-kötött SNP markert, melyek szekvencia illesztéses vizsgálata az afrikai harcsa 24-es kromoszómájára (NC_071123.1) mutat. Ezek alapján feltételezem, hogy az ivar kialakításában fontos genomi régiók ezen a kromoszómán lehetnek. Emellett a kutatócsoportunk által prediktált *pten* gén, valamint a CgaY1 markert tartalmazó genomi régió (scaffold) szekvenciájának illesztése során kapott eredményeim alapján, az NCBI adatbázisban megtalálható 36-os el nem helyezett genomi régiót (NW_026521003.1) szintén az ivar kialakításában fontos szerepet játszó régiónak tartom. A *pten* génen kívül a *mark2*, valamint az *amhr2* gének kódoló szekvenciáit is megtaláltam ebben a genomi régióban, emiatt javaslom ezek további vizsgálatát.

9. SUMMARY

In this study, I investigated the molecular background of sex determination and early sexual differentiation of African catfish (*Clarias gariepinus*). Prior to my study, controversial information was available about the genetic sex determination mechanism of this species; some authors suggested XX/XY, others ZZ/ZW system, and recently it was also proposed that the two systems co-exist. Based on the results obtained with a male-specific DNA marker (CgaY1) on Hungarian and Vietnamese lines, and five proposed ‘moderately sex-linked’ markers (*dtna*, *add3*, *gucd1*, *dctn4*, *pcdh2ab3*) on Hungarian lines of African catfish, I suggest that the investigated lines possess XX/XY sex determination mechanism only. The CgaY1 male-specific marker was validated across multiple generations and proved to be in strong genetic linkage with the sex determining locus, with a predicted genetic distance of 3.4-3.6 cM.

It was also suggested earlier that the genetic sex determination mechanism of African catfish can be influenced by environmental factors; higher temperature (36 °C) induced higher male-ratio. I tested the temperature-induced masculinization on Hungarian stocks, but no such effect was detected either by molecular sexing, or by the sex-ratio of the treated groups. Moreover, high mortality was experienced in heat-treated groups. Therefore, I concluded that this high temperature-induced masculinization protocol is not applicable for production of all-male populations in the culture of Hungarian stocks.

I analyzed the early expression profile of *vasa*, *foxl2*, *sox3*, *sox9*, *amhr2*, *pten*, and *mark2* genes in head and trunk of African catfish between 10 and 40 days post hatching. The two sexes were separated through CgaY1-based molecular sexing. The first sign of sexual differentiation was detected at 15 days post hatching and presumably factors originating from the head (possibly the brain) play an important role in this process. Sexually dimorphic expression was observed for *sox9*, where the amount of mRNA was higher in female heads at 20 days post hatching. The mRNA amount of *pten* and *amhr2* was higher in both heads and trunks of males in several developmental stages. In mice and cell cultures the effect of *pten* on the proliferation of PGCs was confirmed and in several fish species sexual dimorphism was revealed in the number of PGCs at the beginning of sexual differentiation, which proved to directly regulate the sex determination of some species. *Amhr2* also regulates PGC proliferation in several fish species. It is possible, that higher *pten* and *amhr2* mRNA amount in males promotes testis formation through the inhibition of PGC proliferation.

Over 3600 novel sex-associated SNP markers were isolated during this study and their sequence alignment pointed to chromosome 24 (NC_071123.1) of African catfish. Therefore, I propose that the genomic regions responsible for sex determination and possibly for early gonad differentiation are located on this chromosome. Moreover, the sequence of the previously predicted *pten* gene and the sequence of our scaffold containing the CgaY1 male-specific marker were successfully aligned to the unplaced genomic scaffold number 36 (NW_026521003.1) available in NCBI database, indicating that this region is also important for the early sexual development of African catfish. This scaffold contains the coding sequences of *mark2* and *amhr2* genes besides *pten*, so further investigation of these three genes is also recommended.

10. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ADOLFI, M. C., HERPIN, A., SCHARTL, M. (2021): The replaceable master of sex determination: Bottom-up hypothesis revisited. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 376, e20200090.
- ADOLFI, M. C., NAKAJIMA, R. T., NÓBREGA, R. H., SCHARTL, M. (2019): Intersex, hermaphroditism, and gonadal plasticity in vertebrates: Evolution of the Müllerian duct and *Amh/Amhr2* signaling. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 149-172p.
- ANDERSON, R., FÄSSLER, R., GEORGES-LABOUESSE, E., HYNES, R. O., BADER, B. L., KREIDBERG, J. A., SCHAIBLE, K., HEASMAN, J., WYLIE, C. (1999): Mouse primordial germ cells lacking $\beta 1$ integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 126, 1655–1664p.
- ANGELOPOULOU, R., LAVRANOS, G., MANOLAKOU, P. (2012): Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 (13), 1-18p.
- BAKLOUSHINSKAYA, I. Y. (2009): Evolution of sex determination in mammals. *Biol. Bull.* 36, 167–174p.
- BALOGH, R. E., CSORBAI, B., GUTI, C., KESZTE, S., URBÁNYI, B., ORBÁN, L., KOVÁCS, B. (2023): Validation of a male-specific DNA marker confirms XX/XY-type sex determination in several Hungarian strains of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* 205, 106–113p.
- BAO, L., TIAN, C., LIU, S., ZHANG, Y., ELASWAD, A., YUAN, Z., KHALIL, K., SUN, F., YANG, Y., ZHOU, T., ET AL. (2019): The Y chromosome sequence of the channel catfish suggests novel sex determination mechanisms in teleost fish. *BMC Biol.* 17, 1–16p.
- BAROILLER, J. F., D'COTTA, H., SAILLANT, E. (2009a): Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex. Dev.* 3, 118–135p.
- BAROILLER, J. F., COTTA, H. D., BEZAULT, E., WESSELS, S., HOERSTGEN-SCHWARK, G. (2009b): Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 153, 30–38p.

- BARON, D., COCQUET, J., XIA, X., FELLOUS, M., GUIGUEN, Y., VEITIA, R. A. (2004): An evolutionary and functional analysis of *foxL2* in rainbow trout gonad differentiation. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 705–715p.
- BARON, D., BATISTA, F., CHAFFAUX, S., COCQUET, J., COTINOT, C., CRIBIU, E., DE BAEREE, E., GUIGUEN, Y., JAUBERT, F., PAILHOUX, E., ET AL. (2005): *Foxl2* gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reprod Nutr Dev* 45, 377–382p.
- BARTON, L. J., LEBLANC, M. G., LEHMANN, R. (2016): Finding their way: themes in germ cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 42, 128–137p.
- BERTA, P., HAWKINS, J. R., SINCLAIR, A. H., TAYLOR, A., GRIFFITHS, B. L., GOODFELLOW, P. N., FELLOUS, M. (1990): Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450p.
- BHAT, I. A., RATHER, M. A., SAHA, R., PATHAKOTA, G. B., PAVAN-KUMAR, A., SHARMA, R. (2016a): Expression analysis of *Sox9* genes during annual reproductive cycles in gonads and after nanodelivery of LHRH in *Clarias batrachus*. *Res. Vet. Sci.* 106, 100–106p.
- BHAT, I. A., RATHER, M. A., DAR, J. Y., SHARMA, R. (2016b): Molecular cloning, computational analysis and expression pattern of *forkhead box l2* (*Foxl2*) gene in catfish. *Comput. Biol. Chem.* 64, 9–18p.
- BUDD, A., BANH, Q., DOMINGOS, J., JERRY, D. (2015): Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *J. Mar. Sci. Eng.* 3, 329–355p.
- CASTRILLON, D. H., QUADE, B. J., WANG, T. Y., QUIGLEY, C., CRUM, C. P. (2000): The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *PNAS* 97, 9585–9590p.
- CATCHEN, J. M., AMORES, A., HOHENLOHE, P., CRESKO, W., POSTLETHWAIT, J. H. (2011): Stacks: Building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 1, 171–182p.
- CATCHEN, J., HOHENLOHE, P. A., BASSHAM, S., AMORES, A., CRESKO, W. A. (2013): Stacks: An analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22, 3124–3140p.
- CHEN, S., ZHANG, G., SHAO, C., HUANG, Q., LIU, G., ZHANG, P., SONG, W., AN, N.,

- CHALOPIN, D., VOLFF, J. N., ET AL. (2014). Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nat. Genet.* 46, 253–260p.
- CHU, E. C. & TARNAWSKI, A. S. (2004): PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med. Sci. Monit.* 10, 235–242p.
- COLOMBO, G. & GRANDI, G. (1996): Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *J. Fish Biol.* 48, 493–512p.
- CORPUZ, P. S., LINDAMAN, L. L., MELLON, P. L., COSS, D. (2010): *FoxL2* is required for activin induction of the mouse and human follicle-stimulating hormone β -subunit genes. *Mol. Endocrinol.* 24, 1037–1051p.
- CRESPO, B., LAN-CHOW-WING, O., ROCHA, A., ZANUY, S., GÓMEZ, A. (2013): *Foxl2* and *foxl3* are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 194, 81–93p.
- D'COTTA, H., FOSTIER, A., GUIGUEN, Y., GOVOROUN, M., BAROILLER, J. F. (2001): Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 290, 574–585p.
- DAI, S., ZHOU, Y., GUO, X., LIU, M., WANG, T., LI, Z., HAN, D. (2022): Sex-specific markers developed by genome-wide 2b-RAD sequencing confirm an XX/XY sex determination system in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). *Aquaculture* 549, 1–9p.
- DAN, C., MEI, J., WANG, D., GUI, J. F. (2013): Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1043–1049p.
- DEE, C. T., HIRST, C. S., SHIH, Y. H., TRIPATHI, V. B., PATIENT, R. K., SCOTTING, P. J. (2008): *Sox3* regulates both neural fate and differentiation in the zebrafish ectoderm. *Dev. Biol.* 320, 289–301p.
- DENG, S. PING, ZHU, C. HUA, SUN, J., WANG, W. DA, WU, T. LI, CHEN, H. PU, SHI, S. LI, LI, G. LI (2015): *Foxl2* of the Hong Kong catfish (*Clarias fuscus*): cDNA cloning, tissue distribution and changes in gene expression towards methyltestosterone, estradiol and letrozole exposure of the fries during gonadal differentiation. *Genes and Genomics*

37, 669–677p.

- DEVLIN, R. H. & NAGAHAMA, Y. (2002): Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364p.
- DREWES, G., EBNETH, A., PREUSS, U., MANDELKOW, E. M., MANDELKOW, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297–308p.
- DUAN, W., GAO, F. X., CHEN, Z. WEI, GAO, Y., GUI, J. F., ZHAO, Z., SHI, Y. (2021): A sex-linked SNP mutation in *amhr2* is responsible for male differentiation in obscure puffer (*Takifugu obscurus*). *Mol. Biol. Rep.* 48, 6035–6046p.
- DUANGKAEW, R., JANGPRAI, A., ICHIDA, K., YOSHIZAKI, G. AND BOONANUNTANASARN, S. (2019). Characterization and expression of a vasa homolog in the gonads and primordial germ cells of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Theriogenology* 131, 61–71p.
- FAO. (2010) http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Clarias_gariepinus. letöltve: 2022 június 27.
- FELIP, A., YOUNG, W. P., WHEELER, P. A., THORGAARD, G. H. (2005): An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247, 35–43p.
- FENG, K., CUI, X., SONG, Y., TAO, B., CHEN, J., WANG, J., LIU, S., SUN, Y., ZHU, Z., TRUDEAU, V. L., ET AL. (2020): GnRH3 regulates PGC proliferation and sex differentiation in developing zebrafish. *Endocrinol.* 161, 1–13p.
- FERON, R., ZAHM, M., CABAU, C., KLOPP, C., ROQUES, C., BOUCHEZ, O., ECHÉ, C., VALIÈRE, S., DONNADIEU, C., HAFFRAY, P., ET AL. (2020): Characterization of a Y-specific duplication/insertion of the anti-Müllerian hormone type II receptor gene based on a chromosome-scale genome assembly of yellow perch, *Perca flavescens*. *Mol. Ecol. Resour.* 20, 531–543p.
- FINK, K. & GRANDVAUX, N. (2013): STAT2 and IRF9 Beyond ISGF3. *JAK-STAT* 2, e27521.
- GALBUSERA, P., VOLCKAERT, F. A., OLLEVIER, F. (2000): Gynogenesis in the African

- catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture* 185, 25–42p.
- GAMMERDINGER, W. J. & KOCHER, T. D. (2018): Unusual diversity of sex chromosomes in African cichlid fishes. *Genes* 9, 1–20p.
- GAUTIER, A., GAC, F. LE, LAREYRE, J. (2011): The *gsdf* gene locus harbors evolutionary conserved and clustered genes preferentially expressed in fish previtellogenic oocytes. *Gene* 472, 7–17p.
- GIBBONS, R. J., PICKETTS, D. J., VILLARD, L., HIGGS, D. R. (1995): Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with α -thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 80(6), 837–845p.
- GORSKI, R. A. (1985): Sexual dimorphisms of the brain. *J. Anim. Sci.* 61, 38–61p.
- GOU, Y., GUO, J., MAULDING, K., RILEY, B. B. (2018a): *Sox2* and *sox3* cooperate to regulate otic/epibranchial placode induction in zebrafish. *Dev. Biol.* 435, 84–95p.
- GOU, Y., VEMARAJU, S., SWEET, E. M., KWON, H. J., RILEY, B. B. (2018b): *Sox2* and *sox3* play unique roles in development of hair cells and neurons in the zebrafish inner ear. *Dev. Biol.* 435, 73–83p.
- GRAVES, J. A. M. (2008): Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 42, 565–586p.
- GRAVES, J. A. M. (2014): Avian sex, sex chromosomes, and dosage compensation in the age of genomics. *Chromosom. Res.* 22, 45–57p.
- GRAVES, J. A. M. & PEICHEL, C. L. (2010): Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genome Biol.* 11(205), 1–12p.
- GU, G. J., WU, D., LUND, H., SUNNEMARK, D., KVIST, A. J., MILNER, R., ECKERSLEY, S., NILSSON, L. N. G., AGERMAN, K., LANDEGREN, U., ET AL. (2013): Elevated MARK2-dependent phosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 33, 699–713p.
- GUERRERO, R. D. & SHELTON, W. L. (1974): An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. *Progress. Fish-Cultist* 36, 56–56p.
- GUPTA, P. K., ROY, J. K., PRASAD, M. (2001): Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with

- emphasis on their use in plants. *Curr. Sci.* 80, 524–535p.
- HADRY, H., BALICK, M., SCHIERWATER, B. (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1, 55–63p.
- HATTORI, R. S., MURAI, Y., OURA, M., MASUDA, S., MAJHI, S. K., SAKAMOTO, T., FERNANDINO, J. I., SOMOZA, G. M., YOKOTA, M., STRUŠSMANN, C. A. (2012): A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *PNAS* 109(8), 2955–2959p.
- HAVASI, M. (2014): A harcsa (*Silurus glanis*) növényi fehérje alapú takarmányozásának megalapozása intenzív rendszerben. *Doktori értekezés*. Keszthely, 1-113p.
- HENKEN, A. M., BOON, J. B., CATTELL, B. C., LOBEE, H. W. J. (1987): Differences in growth rate and feed utilization between male and female African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture* 63, 221-232p.
- HERPIN, A. & SCHARTL, M. (2011): *Dmrt1* genes at the crossroads: A widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS J.* 278, 1010–1019p.
- HERPIN, A., SCHARTL, M., DEPINCE, A., GUIGUEN, Y., BOBE, J., HUA-VAN, A., HAYMAN, E. S., OCTAVERA, A., YOSHIZAKI, G., NICHOLS, K. M., ET AL. (2021). Allelic diversification after transposable element exaptation promoted *gsdf* as the master sex determining gene of sablefish. *Genome Res.* 31, 1366–1381p.
- HEULE, C., SALZBURGER, W., BÖHNE, A. (2014): Genetics of sexual development: An evolutionary playground for fish. *Genetics* 196, 579–591p.
- HSU, S. Y., NAKABAYASHI, K., NISHI, S., KUMAGAI, J., KUDO, M., SHERWOOD, O. D., HSUEH, A. J. W. (2002): Activation of Orphan Receptors by the Hormone Relaxin. *Science* 295, 671-674p.
- HU, Y., WANG, B. AND DU, H. (2021). A review on sox genes in fish. *Rev. Aquac.* 13, 1986–2003p.
- HUANG, J., CHEN, S., LIU, Y., SHAO, C., LIN, F., WANG, N., HU, Q. (2014): Molecular characterization, sexually dimorphic expression, and functional analysis of 3'-untranslated region of *vasa* gene in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Theriogenology* 82, 213–224p.

- HUBAUX, R., THU, K. L., VUCIC, E. A., PIKOR, L. A., KUNG, S. H. Y., MARTINEZ, V. D., MOSSLEMI, M., BECKER-SANTOS, D. D., GAZDAR, A. F., LAM, S., ET AL. (2015): *Microtubule affinity-regulating kinase 2* is associated with DNA damage response and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 137, 2072–2082p.
- IJIRI, S., KANEKO, H., KOBAYASHI, T., WANG, D. S., SAKAI, F., PAUL-PRASANTH, B., NAKAMURA, M., NAGAHAMA, Y. (2008): Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction* 78, 333-341p.
- IMARAZENE, B., DU, K., BEILLE, S., JOUANNO, E., FERON, R., PAN, Q., TORRES-PAZ, J., LOPEZ-ROQUES, C., CASTINEL, A., GIL, L., ET AL. (2021): A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pachón cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Curr. Biol.* 31, 4800–4809p.
- JACCOUD, D., PENG, K., FEINSTEIN, D., KILIAN, A. (2001): Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29(4), e25.
- JACOBS, P. A. & STRONG, J. A. (1959): A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183, 302–303p.
- JIANG, W., YANG, Y., ZHAO, D., LIU, X., DUAN, J., XIE, S., ZHAO, H. (2011): Effects of sexual steroids on the expression of *foxl2* in *Gobiocypris rarus*. *Comp. Biochem. Physiol. - Part B* 160, 187–193p.
- JUSTICE, N. J., BLOUNT, A. L., PELOSI, E., SCHLESSINGER, D., VALE, W., BILEZIKJIAN, L. M. (2011): Impaired FSH β expression in the pituitaries of *Foxl2* mutant animals. *Mol. Endocrinol.* 25, 1404–1415p.
- KAMIYA, T., KAI, W., TASUMI, S., OKA, A., MATSUNAGA, T., MIZUNO, N., FUJITA, M., SUETAKE, H., SUZUKI, S., HOSOYA, S., ET AL. (2012): A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genet.* 8, e1002798.
- KIMURA, T., SUZUKI, A., FUJITA, Y., YOMOGIDA, K., LOMELI, H., ASADA, N., IKEUCHI, M., NAGY, A., MAK, T. W., NAKANO, T. (2003): Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development* 130, 1691–1700p.

- KIRAN, U., KHAN, S., MIRZA, K. J., RAM, M., ABDIN, M. Z. (2010): SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia* 81, 969–976p.
- KIRUBAKARAN, T. G., ANDERSEN, Ø., DE ROSA, M. C., ANDERSSTUEN, T., HALLAN, K., KENT, M. P., LIEN, S. (2019): Characterization of a male specific region containing a candidate sex determining gene in Atlantic cod. *Sci. Rep.* 9, 1–9p.
- KLÜVER, N., PFENNIG, F., PALA, I., STORCH, K., SCHLIEDER, M., FROSCHAUER, A., GUTZEIT, H. O., SCHARTL, M. (2007): Differential expression of anti-Müllerian hormone (*amh*) and anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhrII*) in the teleost Medaka. *Developmental Dynamics* 238, 271–281p.
- KNAUT, H., PELEGRI, F., BOHMANN, K., SCHWARZ, H., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (2000): Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* 149, 875–888p.
- KOBAYASHI, T., KAJIURA-KOBAYASHI, H., NAGAHAMA, Y. (2000): Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Dev.* 99, 139–142p.
- KOBAYASHI, T., KAJIURA-KOBAYASHI, H., GUAN, G., NAGAHAMA, Y. (2008): Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev. Dyn.* 237, 297–306p.
- KOOPMAN, P. (1999): *Sry* and *Sox9*: Mammalian testis-determining genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 839–856p.
- KOPP, A. (2012): *Dmrt* genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet.* 28, 175–184p.
- KOVÁCS, B. (2004): Az afrikai harcsa ivarának vizsgálata molekuláris módszerekkel. *Doktori értekezés*. Gödöllő, 1–127p.
- KOVÁCS, B., EGEDI, S., RICHÁRD, B., ORBÁN, L. (2001): Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica* 110, 267–276p.
- KOYAMA, T., NAKAMOTO, M., MORISHIMA, K., YAMASHITA, R., YAMASHITA, T., SASAKI, K., KURUMA, Y., MIZUNO, N., SUZUKI, M., OKADA, Y., IEDA, R.,

- UCHINO, T., TASUMI, S., HOSOYA, S., UNO, S., KOYAMA, J., TOYODA, A., KIKICHI, K., SAKAMOTO, T. (2019): A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in *Seriola* fishes. *Current Biology* 29, 1901-1909p.
- KUMAGAI, J., HSU, S. Y., MATSUMI, H., ROH, J., FU, P., WADE, J. D., BATHGATE, R. A. D., HSUEH, A. J. W. (2002): INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *Journal of Biological Chemistry* 277(35), 31283-31286p.
- LI, C., LIU, L., CHEN, X., ZHANG, T., GAN, F., CHENG, B. (2010): Identification of a *vasa* homologue gene in grass carp and its expression pattern in tissues and during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 157, 159–166p.
- LI, M., SUN, Y., ZHAO, J., SHI, H., ZENG, S., YE, K., JIANG, D., ZHOU, L., SUN, L., TAO, W., ET AL. (2015): A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS Genet.* 11(11), e1005678.
- LIN, X., TAN, J., SHEN, Y., YANG, B., ZHANG, Y., LIAO, Y., WANG, B., ZHOU, D., LI, G., TIAN, C. (2022): A high-density genetic linkage map and QTL mapping for sex in *Clarias fuscus*. *Aquaculture* 561, e738723.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ddCT method. *Methods* 25, 402-408p.
- LIU, S., YAO, Z., WANG, Y. (1996): Sex hormone induction of sex reversal in the teleost *Clarias lazera* and evidence for female homogamety and male heterogamety. *J. Exp. Zool.* 276, 432–438p.
- LIU, Z., WU, F., JIAO, B., ZHANG, X., HU, C., HUANG, B., ZHOU, L., HUANG, X., WANG, Z., ZHANG, Y., ET AL. (2007): Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *J. Endocrinol.* 194(1), 223–241p.
- LO, K. H., NGA, M., HUI, Y., MAN, R., YU, K., SHIU, R., WU, S., HAN, S. (2011): Hypoxia impairs primordial germ cell migration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *PLoS One* 6(9), e24540.

- LUZIO, A., SANTOS, D., MONTEIRO, S. M., COIMBRA, A. M. (2021): Zebrafish male differentiation: Do all testes go through a “juvenile ovary” stage? *Tissue Cell* 72, e101545.
- MARTÍNEZ, P., ROBLEDO, D., TABOADA, X., BLANCO, A., MOSER, M., MAROSO, F., HERMIDA, M., GÓMEZ-TATO, A., ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B., CABALEIRO, S., ET AL. (2021): A genome-wide association study, supported by a new chromosome-level genome assembly, suggests *sox2* as a main driver of the undifferentiated ZZ/ZW sex determination of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genomics* 113, 1705–1718p.
- MATSUDA, M., NAGAHAMA, Y., SHINOMIYA, A., SATO, T., MATSUDA, C., KOBAYASHI, T., MORREY, C. E., SHIBATA, N., ASAKAWA, S., SHIMIZU, N., ET AL. (2002): DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563p.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D., POLESKY, H. F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3), 1215p.
- MORINAGA, C., SAITO, D., NAKAMURA, S., SASAKI, T., ASAKAWA, S., SHIMIZU, N., MITANI, H., FURUTANI-SEIKI, M., TANAKA, M., KONDOH, H. (2007): The *hotei* mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *PNAS* 104(23), 9691-9696p.
- MUELLER, U. G. & WOLFENBARGER, L. L. R. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14, 389–394p.
- MULLEN, R. D. & BEHRINGER, R. R. (2014): Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. *Sexual Development* 8, 281-296p.
- MULLEN, R. D., ONTIVEROS, A. E., MOSES, M. M., BEHRINGER, R. R. (2019): AMH and AMHR2 mutations: A spectrum of reproductive phenotypes across vertebrate species. *Dev. Biol.* 455, 1–9p.
- MYOSHO, T., OTAKE, H., MASUYAMA, H., MATSUDA, M., KUROKI, Y., FUJIYAMA, A., NARUSE, K., HAMAGUCHI, S., SAKAIZUMI, M. (2012): Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191, 163–170p.
- NAKAMOTO, M., UCHINO, T., KOSHIMIZU, E., KUCHIISHI, Y., SEKIGUCHI, R., WANG, L., SUDO, R., ENDO, M., GUIGUEN, Y., SCHARTL, M., POSTLETHWAIT, J. H., SAKAMOTO, T. (2021): A Y-linked anti-Müllerian hormone type-II receptor is the

- sex-determining gene in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *PLoS Genetics* 17(8), e1009705
- NAKAMURA, S., AOKI, Y., SAITO, D., KUROKI, Y., FUJIYAMA, A., NARUSE, K., TANAKA, M. (2008): *Sox9b/sox9a2*-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 472–476p.
- NANDA, I., KONDRÓ, M., HORNING, U., ASAKAWA, S., WINKLER, C., SHIMIZU, A., SHAN, Z., HAAF, T., SHIMIZU, N., SHIMA, A., SCHMID, M., SCHARTL, M. (2002): A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *PNAS*. 99(18), 11778-11783p.
- NGUINKAL, J. A., ZOCLANCLOUNON, Y. A. B., BRUNNER, R. M. (2023): Haplotype-resolved assembly of the African catfish (*Clarias gariepinus*) provides insights for semi-terrestrial adaptation of airbreathing catfishes. pre-print in *bioRxiv*. 1-27p.
- NGUYEN, D. H. M., PANTHUM, T., PONJARAT, J., LAOPICHIENTPONG, N., KRAICHAK, E., SINGCHAT, W., AHMAD, S. F., MUANGMAI, N., PEXACHOKNAGUL, S., NA-NAKORN, U., ET AL. (2021a): An investigation of ZZ/ZW and XX/XY sex determination systems in North African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822). *Front. Genet.* 11, 1–15p.
- NGUYEN, D. H. M., PONJARAT, J., LAOPICHIENTPONG, N., KRAICHAK, E., PANTHUM, T., SINGCHAT, W., AHMAD, S. F., MUANGMAI, N., DUENGKAE, P., PEYACHOKNAGUL, S., ET AL. (2021b): Genome-wide SNP analysis suggests male heterogamety in bighead catfish (*Clarias macrocephalus*, Günther, 1864). *Aquaculture* 543, e737005.
- NINWICHIAN, P., PEATMAN, E., PERERA, D., LIU, S., KUCUKTAS, H., DUNHAM, R., LIU, Z. (2012): Identification of a sex-linked marker for channel catfish. *Anim. Genet.* 43, 476–477p.
- NISHIMURA, T. & TANAKA, M. (2014): Gonadal development in fish. *Sex. Dev.* 8, 252–261p.
- OLMSTEAD, A. W., VILLENEUVE, D. L., ANKLEY, G. T., CAVALLIN, J. E., LINDBERG-LIVINGSTON, A., WEHMAS, L. C., DEGITZ, S. J. (2011): A method for the determination of genetic sex in the fathead minnow, *Pimephales promelas*, to support testing of endocrine-active chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 45(7), 3090–3095p.

- ORBAN, L., SREENIVASAN, R., OLSSON, P. E. (2009): Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312, 35–41p.
- OSPINA-ÁLVAREZ, N. & PIFERRER, F. (2008): Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS One* 3(7), 2–4p.
- OVERBEEK, P. A., GORLOV, I. P., SUTHERLAND, R. W., HOUSTON, J. B., HARRISON, W. R., BOETTGER-TONG, H. L., BISHOP, C. E., AGOULNIK, A. I. (2001): A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice. *Genesis* 30, 26–35p.
- OZOUF-COSTAZ, C., TEUGELS, G. G., LEGENDRE, M. (1990): Karyological analysis of three strains of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Clariidae), used in aquaculture. *Aquaculture* 87, 271–277p.
- PAN, Q., FERON, R., YANO, A., GUYOMARD, R., JOUANNO, E., VIGOUROUX, E., WEN, M., BUSNEL, J. M., BOBE, J., CONCORDET, J. P., ET AL. (2019): Identification of the master sex determining gene in Northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation. *PLoS Genetics* 15(8), 1–31p.
- PAN, Q., KAY, T., DEPINCÉ, A., ADOLFI, M., SCHARTL, M., GUIGUEN, Y., HERPIN, A. (2021): Evolution of master sex determiners: TGF- β signalling pathways at regulatory crossroads. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 376, 1–11p.
- PENMAN, D. J. & PIFERRER, F. (2008): Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination. *Rev. Fish. Sci.* 16, 16–34p.
- PICKETTS, D. J., HIGGS, D., R., BACHOO, S., BLAKE, D. J., QUARRELL, O. W. J., GIBBONS, R. J. (1996): ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: Mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics* 5(12), 1899–1907p.
- PLUCIŃSKA, G., PAQUET, D., HRUSCHA, A., GODINHO, L., HAASS, C., SCHMID, B., MISGELD, T. (2012): *In vivo* imaging of disease-related mitochondrial dynamics in a vertebrate model system. *J. Neurosci.* 32(46), 16203–16212p.
- POWELL, W., MACHRAY, G. C., PROVEN, J. (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1(7), 215–222p.
- PU, Q., MA, Y., ZHONG, Y., GUO, J., GUI, L., LI, M. (2022): Characterization and expression

- analysis of *sox3* in medaka gonads. *Aquac. Fish.* 7(1), 23–30.
- QI-YAN, D., FENG-YU, W., HUI-YING, H., ZHONG-JIE, C. (2007): Cloning and study of adult-tissue-specific expression of *Sox9* in *Cyprinus carpio*. *J. Genet.* 86(2), 85–91p.
- RADICS, F. (1990): Az afrikai harcsa szaporításának és nevelésének hazai tapasztalatai, *Halászat Magazin* 4, 125-128p.
- RADICS, F., KOVÁCS, GY., KEPENYES, J. (1994): Az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) tenyésztése Magyarországon. In: XVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás (Szarvas), 69–73p.
- RAFATI, N., CHEN, J., HERPIN, A., PETTERSSON, M. E., HAN, F., FENG, C., WALLERMAN, O., RUBIN, C. J., PÉRON, S., COCCO, A., ET AL. (2020): Reconstruction of the birth of a male sex chromosome present in Atlantic herring. *PNAS.* 117(39), 24359–24368p.
- RAGHUVeer, K. & SENTHILKUMARAN, B. (2010a): Cloning and differential expression pattern of *vasa* in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 157, 79–85p.
- RAGHUVeer, K. & SENTHILKUMARAN, B. (2010b): Isolation of *sox9* duplicates in catfish: Localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of *sox9* in testicular slices. *Reproduction* 140, 477–487p.
- RAGHUVeer, K., SENTHILKUMARAN, B., SUDHAKUMARI, C. C., SRIDEVI, P., RAJAKUMAR, A., SINGH, R., MURUGANTHKUMAR, R., MAJUMDAR, K. C. (2011): Dimorphic expression of various transcription factor and steroidogenic enzyme genes during gonadal ontogeny in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Sex. Dev.* 5, 213–223p.
- RAJAKUMAR, A. & SENTHILKUMARAN, B. (2014): Expression analysis of *sox3* during testicular development, recrudescence, and after hCG induction in catfish, *Clarias batrachus*. *Sex. Dev.* 8(6), 376–386p.
- RAJAKUMAR, A. & SENTHILKUMARAN, B. (2016): *Sox3* binds to *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase* gene promoter suggesting transcriptional interaction in catfish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 158, 90–103p.

- RAJENDIRAN, P., JAAFAR, F., KAR, S., SUDHAKUMARI, C., SENTHILKUMARAN, B., PARHAR, I. S. (2021): Sex determination and differentiation in teleost: Roles of genetics, environment, and brain. *Biology*. 10, e973.
- RAMOS, L., ANTUNES, A. (2022): Decoding sex: Elucidating sex determination and how high-quality genome assemblies are untangling the evolutionary dynamics of sex chromosomes. *Genomics*. 114(2), e110277
- R CORE TEAM. (2023): R: a language and environment for statistical computing. *Foundation for Statistical Computing*
- REARDON, W., GIBBONS, R. J., WINTER, R. M., BARAITSER, M. (1995): Male pseudohermaphroditism in sibs with the α -thalassemia mental retardation (ATR-X) syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 55, 285-287p.
- REICHWALD, K., PETZOLD, A., KOCH, P., DOWNIE, B. R., HARTMANN, N., PIETSCH, S., BAUMGART, M., CHALOPIN, D., FELDER, M., BENS, M., ET AL. (2015): Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. *Cell* 163, 1527–1538p.
- RICCI, J. M. B., MARTINEZ, E. R. M., BUTZGE, A. J., DORETTO, L. B., OLIVEIRA, M. A., BOMBARDELLI, R. A., BOGERD, J., NÓBREGA, R. H. (2018): Characterization of *vasa* homolog in a neotropical catfish, Jundiá (*Rhamdia quelen*): Molecular cloning and expression analysis during embryonic and larval development. *Gene* 654, 116–126p.
- RICHARDSON, B. E. & LEHMANN, R. (2010): Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 37–49p.
- RODRÍGUEZ-MARÍ, A., YAN, Y. L., BREMILLER, R. A., WILSON, C., CAÑESTRO, C., POSTLETHWAIT, J. H. (2005): Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr. Patterns* 5, 655–667p.
- ROGERS, N., CHEAH, P. S., SZAREK, E., BANERJEE, K., SCHWARTZ, J., THOMAS, P. (2013): Expression of the murine transcription factor SOX3 during embryonic and adult neurogenesis. *Gene Expr. Patterns* 13, 240–248p.
- SANTI, S., GENNOTTE, V., TOGUYENI, A., MÉLARD, C., ANTOINE, N., ROUGEOT, C. (2016): Thermosensitivity of the sex differentiation process in the African catfish, *Clarias*

- gariiepinus*: Determination of the thermosensitive period. *Aquaculture* 455, 73–80p.
- SANTI, S., ROUGEOT, C., TOGUYENI, A., GENNOTTE, V., KEBE, I. (2017): Temperature preference and sex differentiation in African catfish, *Clarias gariiepinus*. *J. Exp. Zool.* 00(1-10), 28–37p.
- SANTI, S., GENNOTTE, V., MULLER, M., MELARD, C., TOGUYENI, A., MANDIKI, S. N. M., ROUGEOT, C. (2019): Sex-ratio, early sex steroid profiles and *cyp19a1b*, *dmrt1* and *foxl2* gene expressions upon high temperature treatment of undifferentiated African catfish juveniles (*Clarias gariiepinus*). *Aquaculture* 499, 140–148p.
- SCHARTL, M. (2004): Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 634–641p.
- SCHARTL, M., GEORGES, A., GRAVES, J. A. M. (2023): Polygenic sex determination in vertebrates – is there any such thing? *Trends in Genetics*. 39(4), 242-250p.
- SCHMIDT, D., OVITT, C. E., ANLAG, K., FEHSENFELD, S., GREDSTED, L., TREIER, A. C., TREIER, M. (2004): The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131, 933–942p.
- SENTHILKUMARAN, B., SUDHAKUMARI, C. C., MAMTA, S. K., RAGHUVeer, K., SWAPNA, I., MURUGANANTHKUMAR, R. (2015): “Brain sex differentiation” in teleosts: Emerging concepts with potential biomarkers. *Gen. Comp. Endocrinol.* 220, 33–40p.
- SHEN, Z. & WANG, H. (2014): Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in Teleost fish. *Genet. Sel. Evol.* 46(26), 1–21p.
- SHINOMIYA, A., TANAKA, M., KOBAYASHI, T., NAGAHAMA, Y., HAMAGUCHI, S. (2000): The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 42, 317–326p.
- SIEGFRIED, K. R. (2010): In search of determinants: Gene expression during gonadal sex differentiation. *J. Fish Biol.* 76, 1879–1902p.
- SINCLAIR, A. H., BERTA, P., PALMER, M. S., HAWKINS, J. R., GRIFFITHS, B. L., SMITH, M. J., FOSTER, J. W., FRISCHAUF, A. M., LOVELL-BADGE, R., GOODFELLOW, P. N. (1990): A gene from the human sex-determining region encodes

- a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244p.
- SNEE, M. J. & MACDONALD, P. M. (2004): Live imaging of nuage and polar granules: Evidence against a precursor-product relationship and a novel role for Oskar in stabilization of polar granule components. *J. Cell Sci.* 117, 2109–2120p.
- SONG, W., XIE, Y., SUN, M., LI, X., FITZPATRICK, C. K., VAUX, F., O'MALLEY, K. G., ZHANG, Q., QI, J., HE, Y. (2021): A duplicated *amh* is the master sex-determining gene for *Sebastes* rockfish in the Northwest Pacific. *Open Biology* 11, e210063
- SRIDEVI, P. & SENTHILKUMARAN, B. (2011): Cloning and differential expression of *FOXL2* during ovarian development and recrudescence of the catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 259–268p.
- STAYTON, C. L., DABOVIC, B., GULISANO, M., GECZ, J., BROCCOLL, V., GLOVANAZZL, S., BOSSOLASCO, M., MONACO, L., RASTAN, S., BONICINELLI, E., BLANCHIL, M. E., CONSALEZ, G. G. (1994): Cloning and characterization of a new human Xq13 gene, encoding a putative helicase. *Human Molecular Genetics* 3(11), 1957–1964p.
- TAKAHASHI, H. (1977): Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 28(2), 57–65p.
- TAKEHANA, Y., MATSUDA, M., MYOSHO, T., SUSTER, M. L., KAWAKAMI, K., SHIN-I, T., KOHARA, Y., KUROKI, Y., TOYODA, A., FUJIYAMA, A., ET AL. (2014): Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nat. Commun.* 5, 1–10p.
- TANAKA, K., TAKEHANA, Y., NARUSE, K., HAMAGUCHI, S., SAKAIZUMI, M. (2007): Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related *oryzias* fishes: Substitution of the master sex-determining gene. *Genetics* 177(4), 2075–2081p.
- TANKSLEY, S. D., YOUNG, N. D., PATERSON, A. H., BONIERBALE, M. W. (1989): RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Nat. Biotechnol.* 7(3), 257–264p.
- TZUNG, K. W., GOTO, R., SAJU, J. M., SREENIVASAN, R., SAITO, T., ARAI, K., YAMAHA, E., HOSSAIN, M. S., CALVERT, M. E. K., ORBÁN, L. (2015): Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem Cell*

Reports 4, 61–73p.

- UHLENHAUT, N. H., JAKOB, S., ANLAG, K., EISENBERGER, T., SEKIDO, R., KRESS, J., TREIER, A. C., KLUGMANN, C., KLASSEN, C., HOLTER, N. I., ET AL. (2009): Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 139, 1130–1142p.
- VALENZUELA, N. & LANCE, V. (2004): Conover DO: Temperature-Dependent Sex Determination in Fishes. In: Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates, pp. 11–20. Washington DC: Smithsonian Books.
- VALENZUELA, N., ADAMS, D. C., JANZEN, F. J. (2003): Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? *Am. Nat.* 161(4), 676–683p.
- VAN DEN HURK, R., RICHTER, C. J. J., JANSSEN-DOMMERHOLT, J. (1989): Effects of 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione on gonad differentiation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 83, 179–191p.
- VÁRADI, L., BENKÓ, I., VARGA, J., HORVÁTH, L. (1999): Induction of diploid gynogenesis using interspecific sperm and production of tetraploids in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822). *Aquaculture* 173, 401–411p.
- VILLARD, L., LOSSI, A. M., CARDOSO, C., PROUD, V., CHIARONI, P., COLLEAUX, L., SCHWARTZ, C., FONTÉS, M. (1997): Determination of the genomic structure of the XNP/ATRX gene encoding a potential zinc finger helicase. *Genomics* 43(2), 149–155p.
- VINING, B., MING, Z., BAGHERI-FAM, S., HARLEY, V. (2021): Diverse regulation but conserved function: Sox9 in vertebrate sex determination. *Genes*. 12(486), 1–23p.
- VOLFF, J. N., NANDA, I., SCHMID, M., SCHARTL, M. (2007): Governing sex determination in fish: Regulatory putsches and ephemeral dictators. *Sex. Dev.* 1(2), 85–99p.
- WALSH, S. P., METZGER, D. A., HIGUCHI, R. (1992): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4), 506–513p.
- WANG, D., KOBAYASHI, T., ZHOU, L., NAGAHAMA, Y. (2004): Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 83–89p.

- WANG, D., MAO, H., CHEN, H., LIU, H., GUI, J. (2009): Isolation of Y- and X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations. *Anim. Genet.* 40, 978–981p.
- WANG, T., LI, Z., YU, Z. X., WANG, Z. W., LIAN, Z. Q., DU, W. X., ZHAO, X., WANG, M. T., MIAO, C., DING, M., ET AL. (2021): Production of YY males through self-fertilization of an occasional hermaphrodite in Lanzhou catfish (*Silurus lanzhouensis*). *Aquaculture* 539, e736622.
- WEI, W. Y., GONG, Y., GUO, X. F., LIU, M., ZHOU, Y. L., LI, Z., ZHOU, L., WANG, Z. W., GUI, J. F. (2023): Gonadal transcriptomes reveal sex-biased expression genes associated with sex determination and differentiation in red-tail catfish (*Hemibagrus wyckioides*). *BMC Genomics* 24(1), 1–14p.
- WEISS, J., MEEKS, J. J., HURLEY, L., RAVEROT, G., FRASSETTO, A., JAMESON, J. L. (2003): Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol. Cell. Biol.* 23(22), 8084–8091p.
- WELSHONS, W. J. & RUSSELL, L. B. (1959): The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *PNAS.* 45, 560–566p.
- WEN, M., PAN, Q., JOUANNO, E., MONTFORT, J., ZAHM, M., CABAU, C., KLOPP, C., IAMPIETRO, C., ROQUES, C., BOUCHEZ, O., ET AL. (2022): An ancient truncated duplication of the *anti-Müllerian hormone receptor type 2* gene is a potential conserved master sex determinant in the Pangasiidae catfish family. *Mol. Ecol. Resour.* 22(6), 2411–2428p.
- WILHELM, D., PALMER, S.; KOOPMAN, P. (2007): Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87(1), 1–28p.
- WILKINS, A. S. (1995): Moving up the hierarchy: A hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays* 17(1), 71–77p.
- WU, X., WANG, Z., JIANG, J., GAO, J., WANG, J., ZHOU, X., ZHANG, Q. (2014): Cloning, expression promoter analysis of *vasa* gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 167, 41–50p.
- XIA, X., HUO, W., WAN, R., WANG, P., ZHANG, L., CHANG, Z. (2018): Molecular cloning, characterization, and expression profiles of the Sox3 gene in Chinese loach *Paramisgurnus*

dabryanus. *Evol. Dev.* 20(3-4), 108–118p

- XIE, J., LI, M., WANG, F., SONG, G., LI, Q., QIAO, Z., LONG, Y. (2023): Identification of male-specific DNA markers and generation of genetically all-female offspring using natural pseudomales in Amur catfish (*Silurus asotus*). *Aquaculture* 574, e739657.
- YAMAGUCHI, T. & KITANO, T. (2023): *Amh/Amhr2* signaling causes masculinization by inhibiting estrogen synthesis during gonadal sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International Journal of Molecular Sciences* 24, e2480
- YAMAMOTO, T.-O. (1969). Sex differentiation. In: W.S. Hoar & D.J. Randall (eds.) *Fish Physiol.* 3, 117–175 p.
- YAN, Y.-L., BATZEK, P., TITUS, T., SYDES, J., DESVIGNES, T., BREMILLER, R., DRAPER, B., POSTLETHWAIT, J. H. (2019): A hormone that lost its receptor: Anti-Müllerian hormone (AMH) in zebrafish gonad development and sex determination. *Genetics* 213, 529-553p.
- YANG, Y., WANG, Y., LI, Z., ZHOU, L., GUI, J. (2017): Sequential, divergent, and cooperative requirements of *foxl2a* and *foxl2b* in ovary development and maintenance of zebrafish. *Genetics* 205, 1551–1572p.
- YANO, A., GUYOMARD, R., NICOL, B., JOUANNO, E., QUILLET, E., KLOPP, C., CABAU, C., BOUCHEZ, O., FOSTIER, A., GUIGUEN, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr. Biol.* 22(15), 1423–1428p.
- YANO, A., NICOL, B., JOUANNO, E., QUILLET, E., FOSTIER, A., GUYOMARD, R., GUIGUEN, Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol. Appl.* 6(3), 486–496p.
- YAO, B., ZHOU, L., WANG, Y., XIA, W., GUI, J.-F. (2007): Differential expression and dynamic changes of SOX3 during gametogenesis and sex reversal in protogynous hermaphroditic fish. *J. Exp. Zool.* 307A, 207–219p.
- YE, D., ZHU, L., ZHANG, Q., XIONG, F., WANG, H., WANG, X., HE, M. (2019): Abundance of early embryonic primordial germ cells promotes zebrafish female differentiation as revealed by lifetime labeling of germline. *Mar. Biotechnol.* 21, 217–

228p.

- YE, H., RUAN, R., SONG, X., FAN, J., DU, H., SHAO, J., WANG, Y., YUE, H., ZHANG, T., LI, C. (2023): Identification of a candidate sex-determining gene, *ptf1aY*, in the Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*) through high-throughput sequencing. *Aquac. Reports* 32, e101730.
- YIN, Y. & SHEN, W. H. (2008). PTEN: A new guardian of the genome. *Oncogene* 27, 5443–5453p.
- ZHANG, X., GUAN, G., LI, M., ZHU, F., LIU, Q., NARUSE, K., HERPIN, A., NAGAHMA, Y., LI, J., HONG, Y. (2016): Autosomal *gsdf* acts as a male sex initiator in the fish medaka. *Nat. Sci. Reports* 6, 1–13p.
- ZHANG, X., LI, M., MA, H., LIU, X., SHI, H., LI, M. AND WANG, D. (2017). Mutation of *foxl2* or *cyp19a1a* results in female to male sex reversal in XX Nile tilapia. *Endocrinology* 158(8), 2634–2647p.
- ZHANG, G., LI, J., ZHANG, J., LIANG, X., WANG, T., YIN, S. (2020). A high-density SNP-based genetic map and several economic traits-related loci in *Pelteobagrus vachelli*. *BMC Genomics* 21(1), 1–17p.
- ZHENG, S., WANG, X., ZHANG, S., LONG, J., TAO, W., LI, M., WANG, D. (2020): Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Aquaculture* 517, e734783.
- ZHENG, S., TAO, W., TAO, H., YANG, H., WU, L., SHAO, F., WANG, Z., JIN, L., PENG, Z., WANG, D., ZHANG, Y. (2023): Characterization of the male-specific region containing the candidate sex-determining gene in Amur catfish (*Silurus asotus*) using third-generation- and pool-sequencing data. *International Journal of Biological Macromolecules* 248, e125908
- ZHOU, Y. L., WANG, Z. W., GUO, X. F., WU, J. J., LU, W. J., ZHOU, L., GUI, J. F. (2021): Construction of a high-density genetic linkage map and fine mapping of QTLs for growth and sex-related traits in red-tail catfish (*Hemibagrus wyckioides*). *Aquaculture* 531, e735892.
- ZHU, C., PAN, Z., WANG, H., CHANG, G., DING, H. (2018): A novel male-associated marker for sex identification in Ussuri catfish *Pseudobagrus ussuriensis*. *J. Oceanol.*

Limnol. 36(3), 850–852p.

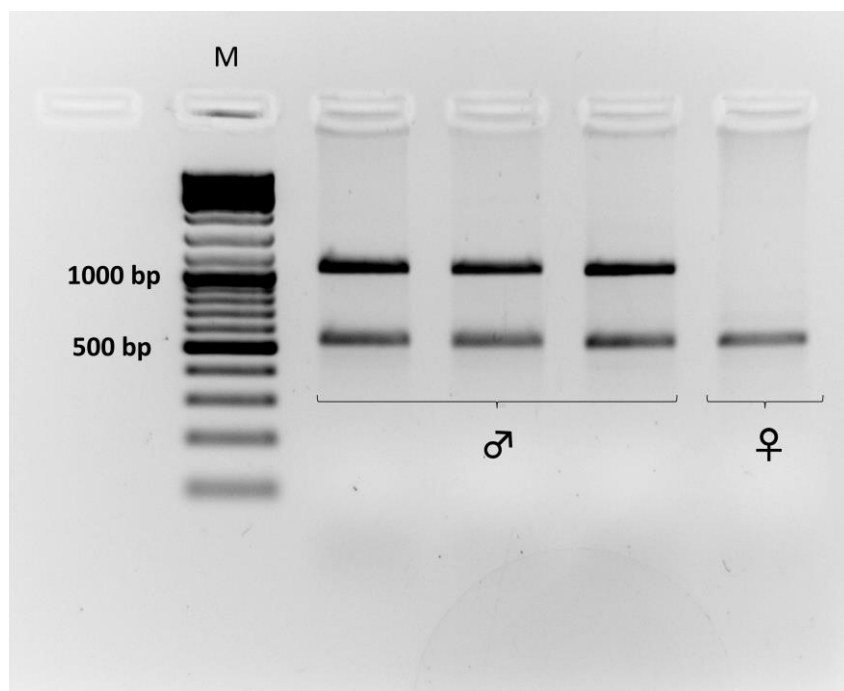
ZHU, C., LIU, H., PAN, Z., CHENG, L., SUN, Y., WANG, H., CHANG, G., WU, N., DING, H., ZHAO, H., ET AL. (2022): Insights into chromosomal evolution and sex determination of *Pseudobagrus ussuriensis* (Bagridae, Siluriformes) based on a chromosome-level genome. *DNA Res.* 29(4), 1–15p.

M2. A CgaY1 hím-specifikus és egyéb „mérsékelten ivarhoz kötött” markerek vizsgálatához használt primer szekvenciák

Gén elnevezése	Gén szimbóluma	Lókuszt ID	Forward primer	Reverse primer
Adducin 3	<i>add3</i>	PA51665576	5'-ATGAGCACCGGCTCTACCTT-3'	5'-AACTGCATGTCTGTCTAACCTG-3'
Dystrobrevin alpha	<i>dtna</i>	PA51658745	5'-TAACCAGCGACGACATGGTG-3'	5'-GCTCAGAGTAGGTGAACCGT-3'
Dynactin subunit 4	<i>dctn4</i>	PA51673180	5'-AGCATCGTGCTAATCAGGCTAA-3'	5'-GGGACTAAAATCAGCCGAGTCA-3'
Protocadherin alpha subfamily C	<i>pcdh2ab3</i>	PA51665230	5'-ATCGATGTCCAAAGGAGCAGA-3'	5'-GGCCTACTAAATACTGGGGCAT-3'
Guanylyl cyclase domain-containing 1*	<i>gucd1</i>	PA51633778	N/A	N/A
CgaY1 marker (Y1-6F, Y1-1R)	-	AF332597	5'-CCGTAGCCTGCCACTCTGC-3'	5'-GAACTGAACCCACATTTTGTC-3'
K1 kontroll fragment (K1-1F, K1-1R)	-	AF332599	5'-AGTACATTGAGGACGAGGACGC-3'	5'-CATTGTAACAAGAGGAGCCAC-3'

* Ez a szekvencia nem volt detektálható az általunk szekvenált afrikai harcsa genomban (nem publikált adat)

M3. A CgaY1 markerrel végzett molekuláris ivarmeghatározás tipikus gélképe (M-molekulasúly marker)



M4: Adapter szekvenciák ddRAD könyvtár készítése során

Restrikciós enzim	Az adapterek nukleotid szekvenciája (5' – 3')
PstI	TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCA (5'Phos)GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
MspI	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT (5'Phos)CGAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC

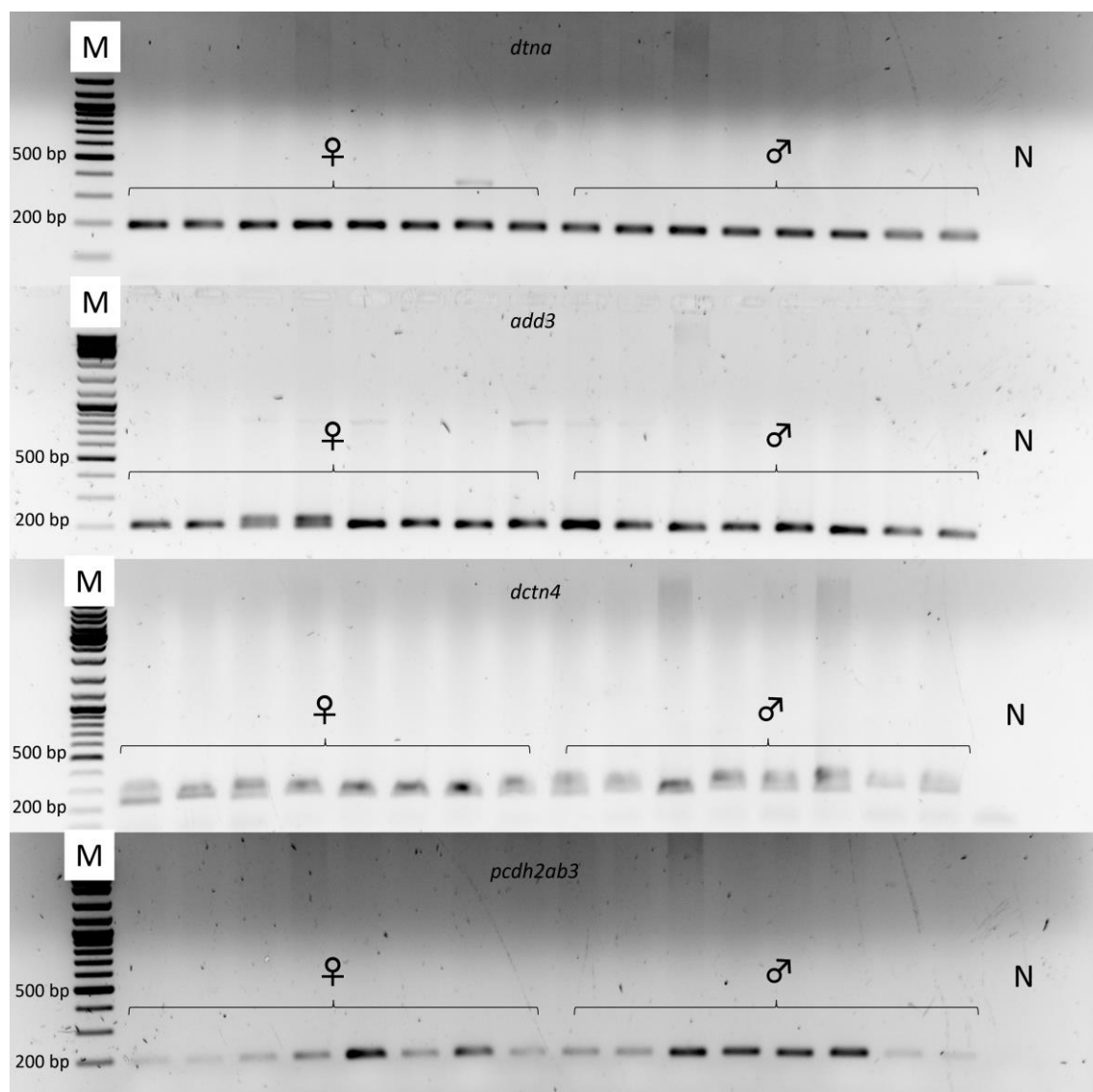
M5: A real-time PCR vizsgálatokhoz használt gének, primerek, reakció összetételek és hatékonyságok

Gén szimbóluma	Primer szekvencia (5'-3')	Hatékonyság (%)	Termék méret (bp)	Primer koncentráció (μM)	cDNS mennyiség (ng)	Primer tapadási hőmérséklet (°C)	Referencia
<i>foxl2</i>	F: CAT GGC TAT ACG CGA CAG CTC R: CCA GTA GTT CCC CTT CCT CTC	94,97	193	0,2	150	60	RAGHUVÉER et al., 2011
<i>vasa</i>	F: GGT CTG AGT AAA GTT CGT TAT CTG R: GCC AAC CTT TGA ATA TCC TCT G	104,06	170	0,2	200	60,5	RAGHUVÉER & SENTHILKUMARAN, 2010a
<i>mark2</i>	F: CGA GCA CTC ATC TAG CCA GG R: GCG GTC GCT CCA ACA TGC CT	96,35	188	0,2	180	60	saját tervezés
<i>cyp19</i>	F: AAG CGG AGA GGG TTG AAG AT R: CAC AGC ACT ACC ACA AAC AC	105,35	135	0,2	200	60	saját tervezés
<i>sox3</i>	F: ATT CAG CAT CTC AAC TCT ACT ACC R: CTT ACA CAG CGT CCA TCC AC	100,37	192	0,21	180	60,5	saját tervezés
<i>sox9b</i>	F: AGT TAT GGA GAT TGC TGA ACG A R: CGT GGC TGG TAT TTG TAG TC	96,66	152	0,15	100	60	saját tervezés
<i>pten</i>	F: ACC TCT GAA ACA GAT TTA TCG G R: GAA TGC CTG ACC AAC TTG TG	95,65	157	0,2	200	60	saját tervezés
<i>amhr2</i>	F: TAG AGG TAC TTA ATA ATG ACC TG R: GCA ATT GCA ATG AAA TGG AGA AT	101,34	96	0,2	200	60	saját tervezés
<i>actb</i>	F: GTG CGG AAT ATC ATC TGC CC R: ACC AAC ATA GCT GTC CTT CTG	99,15	167	0,2	180	60,5	saját tervezés

M6. A real-time PCR vizsgálatokhoz tesztelt referencia gének, azok Ct értékei és hatékonyságuk

Gén szimbóluma	Primer szekvencia (5'-3')	Ct min	Ct max	Hatékonyság (%)	Referencia
<i>actb</i> *	F: GTG CGG AAT ATC ATC TGC CC R: ACC AAC ATA GCT GTC CTT CTG	20,33	21,93	99,15	saját tervezés
<i>ef1a</i>	F: CCA AAC CAA ACC AAG AAT GTC R: CGT GAC AAA GTA GCC ATT TCG	27,29	31,31	95,77	saját tervezés
<i>gapdh</i>	F: TGT GAC TTT GAT CCC TTT CTG R: CAA CCT ATC AAA CCG TAA CCA	19,89	25,90	97,1	saját tervezés
<i>rpl13</i>	F: CAC TAT CCG ATT TCC ACG CA R: ATC ACA CCA TAA AGC CTC AGT	31,97	36,86	102,07	saját tervezés
<i>18S</i>	F: ATC AAT CTG TCA ATC CTT TCC GTG R: CGT AGT TCC GAC CGT AAA CC	13,84	17,65	84,31	saját tervezés

M7. Egyéb „mérsékelten ivarhoz kötött” markerek vizsgálatának gélképe
(M- molekulásúly marker, N- negatív kontroll)



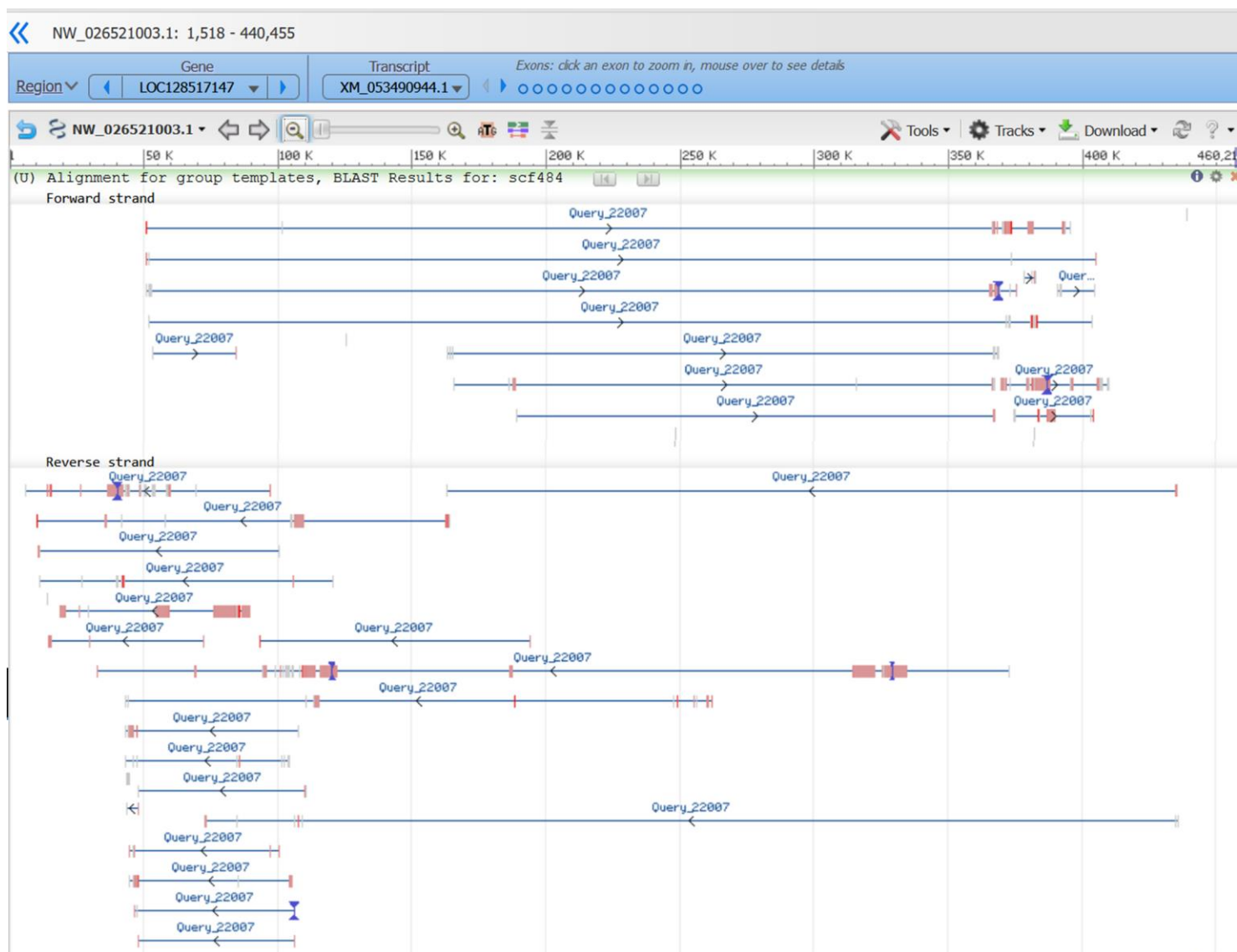
M8. A ddRAD szekvenálás során izolált ivarhoz kötött SNP markereket tartalmazó lókuszok szekvenciái

Lókusz neve	Lókusz szekvenciája
>CLocus_5762	gcaggaggaacgattaatggcagtcgaacatcatgacatcatcctttccacctcaaacatgta attacatcatgaatatttataatatgataattaaccacaccccccaaaaattttttgtttgtttgtc gttatactgaacacacccgctcgagaagtgcgtggaggacgtggactctcttcatgagtcg gacgtcagacggcgtggagtcggcgactggccgttctggatggggtaataaaccg
>CLocus_7160	gcaggcttctgctccagtaacttgctgtacgttcttggcaggctgaacacacagacacac acatggaacatgtttactgttcaacagtatgctccttaaaaatactctataataacatctgacactca cagcacagcttgaacagacattcacaacgttatatgtgtgtgccacccccgtgtgctcttccgac cg
>CLocus_8398	gcaggcagctggaagctgacagggttattcttagagtgtgacagtatgggtccgatgaagcga gggtgaaagtttagggattccgtatccagatgtaggtcttttagaaagccatacctgtcaccta ctttgtacaaacgtcccagga
>CLocus_16186	gcaggatccgattttgggtccaggagatcaaagggatcgtgcaaaagccaggggtgtccg aggatgatgggtggatgaaatggaggttagatgatattgaatccgttcttgatgttgattgatg gtgagaatgatgggtgtgtctgggtggatggggctagatgaaagggccggctgtcttcc gatgtgatacaaacaggctgggataacgcctcaatttctacccccagtttttggcgtaatagag tcaatgaatttacctgtggcaccg
>CLocus_21558	gcaggaggcagtagtgagcgtgagatgctagtaaacacacagtagtcttctgactgcgac gtacctaaacgttacaaggggaatcatccgaggtgtgtctatgagccaggcgtgtgcagta ccgtgtgtgtgagtgccgtgtgtgatactgtacgcgtgtgacatgccccagtcctgtgtcttc cgaccg
>CLocus_21950	gcagagtttctgtaaaactcgggtccatcactaaaacactttgtcctccaagtgtagaatattaca gttactcttctcgagtcagtggtcatacaagcatcataattatacatgtgcggcagagttccagt aactcctgtgtgtgtaaccgagtgctcttccgaccg
>CLocus_26980	gcaggcttataaaaatttccaagcaaaagacaattcaagaacttgggaaaagcttcacaaggaat gatgtgaggctggattctgtgtagcttgagggaagcgtggagtgggacagaatccaagttgctt gaagtccagtgtgaagtcgtctgctgcccgtgtgctcttccgaccg
>CLocus_29742	gcagtaaaagtaggcactgtgaaaacatagtgtaaagaaaaggaatcctaaaaacacactgat gtatgtctacataagtagaagtaggacttttgggatttaaaaagattttgtattctgaaactattaa gcattatgataaatatgtattaacattacgttcaggtttgttaattaaccataatgaattttgtcatgat ttgaccatctttattttgggtaccgtgtgctcttccgaccg
>CLocus_39965	gcagcactgcactgtgcactatatgagacactttcatgggtgcttactgacattatctgtgctgtag tggtgtgggtgcatcggggacagcgggacaaatccagtgcgtacaacacagagcagaaacc gtctaacaaaataaacgtcccataacaccttaacggccccctgtctgtctctattgacaccatc agcctctgccggccccgtctgtctctaccgacccccctgtgtctctactagaaccgtctgtcg ctctaccg
>CLocus_40371	gcagtatttctaaaagtattcttactcatattattgatatttaaaggtattaaaggttactaggattat tagcagttgaagtaaaacctcactaaatgcagatgaataataaagcattaaatctttaaactctct ctgatcagctccgcgtgaacacggccggccttactttcattgcgccgtgggggttctgttccggg ccctctgactcgcgcgcggttgactccttggtccgtgttcaagacgggtcggttgggtggc cg

M9. A CgaY1 marker illesztésének eredményei a Prim assembly-re (GCA_024256425.1)

Talált lókuszt neve	Maximum pontszám	Összes pontszám	Lefedettség	E érték	Egyezés (%)	Lókuszt hossza	Génbanki azonosító
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands unplaced genomic scaffold 36	4375	44388	99%	0.0	97,23	460213	NW_026521003.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 1	2100	14675	69%	0.0	92,92	52237485	NC_0711100.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 14	396	1026	22%	1e-107	86,13	32602070	NC_0711113.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 12	322	1253	21%	2e-85	89,23	33715535	NC_0711111.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 10	311	2930	21%	5e-82	93,75	35173121	NC_0711109.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 6	237	2051	17%	8e-60	94,23	41146859	NC_0711105.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands unplaced genomic scaffold 34	237	1358	6%	8e-60	94,23	581378	NW_026521001.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 23	226	647	6%	2e-56	91,93	26592883	NC_0711122.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 21	180	374	11%	1e-42	86,23	29591905	NC_0711120.1
<i>Clarias gariepinus</i> isolate MV-2021 ecotype Netherlands chromosome 22	161	161	9%	5e-37	80,08	29481022	NC_0711121.1

M10. A 36-os el nem helyezett genom scaffold és az scf484 scaffold illesztése



M11. A kutatócsoportunk által prediktált *pten* gén szekvenciája

>TRINITY_DN78060_c1_g2_i6 len=2457

TTTGCTGCTGTGTAAGAAAGACAAAACCAAGGATCATTTTTACTTTTTATATAATTAATTTAT
TGAATTAATTTAAAAGAAATAGGTTTTAAAAACCTTTATGAGTGATTTAACTTTAAAC
ATTTAAATCACCCAACATTTTCAGTATGAAAAAACCCAACATGTCCGTAAAAGACCTTTA
ACCATTTAAGCAGGATAATTATAAATATTTGTTATGAATGTATGCAAAACCCAATATGGT
CAAAGCCAACCTTGCCCAGACCCATATTGCAAGACCCAATATGTTTTTCCTCAGACATCGA
TTTTACATACATCTTAAACATTTACAGTAATCACTACCTGCACCATACAGATATTAATACA
TGCAGTTATCCTGGTTTTCTTACCTGATCGCTGACAGATTCTCCCTCCATCGTTCAATTAA
AAGTACCGTGTGCCGTTTTCACTGCGCAAACCTAACAGGTCTGATCGGCTGAAGGGTCTGTC
TTCCACACCGCTCCTACACGTGCTTCTGTTGTATTTATGCCTCTAATACTTGCTTTTGTTTT
AAGAAAGTCTGTTCTGATTGGCTGAAGGGTTTGTCACCACGCCTTTCTACATGTGCTTG
TATTGTGATCATGCCTCTAAAAGTCAAAAGCTTTTGTTTCAGGCCTGGATGCGTTTGGGTTC
TTTTTTAAAGATATTTTTATGGCCTCTATCCCTTCCTGGGTATCAATATTAGTCAGAAAAA
TAATATAATGATCCGGTTCATTGTCATGTCAGTGGTTACGCATGCGGAAGGGCTGTCTCT
GAGTTGGATGGTTCCTCCAATGTTTTGTGAAATATAGCTTCACCTAAAAGTTTGGGGAA
AATAATCTGTTCCCACTGATCCAGGGATAAGGAATGTGTTTACCCAGAAGTAAACATC
TTATCCCTTCTCATCTTGCTCTGTTTTTGATAGAATTCCACTTTGATATCGCCACATACTGG
AAGTGGTTGTCTTCCGCCGTGTGTGCTGGATTAGACGTATGTATTTTCACCTTAAGTTGGT
AGACAACAAAATGTGGGGTTTCCAGCTAAAAGCTTTTTAAATGCAGCAACTTTAGTATAT
GCCATCATAGCAGTTGTGCTCTTTTTTTTAGATGTTTGACGATCTATGGCTAGTTTAACATC
CATCACTGGAACCCACACAATTTTTTAAAGACATTTTTTTATTACATCAGTAAGAATAA
TAAAATCTTTAGGAAAGACCTAATAAAACCTGAGTCCTATCTGGCAAGTTTGGCGGCCCA
CTTTGAACACTCACCCCTGAAAGGACAAGGGTTTCTGTGGGGCAATGGGGAGTCAGGGTC
TGCCCACTCCTGAGATCCAGCTAAAAGCTTTTTAAATGCAGCAACTTTAATATATGCCATC
ATAGCAGTTGTGCTCTTTTTTTTAGATGTTTGACGATCTATGGCTAGTTTAACATCCATCAC
TGGAAGTGAAGATCCAGCTAAAAGCTTTTTTAATGCAGCAACTTTAATATACGCTATTGTTT
TTAAAAGTGTGTTGTGCTCTTTCTTAGATTTTTGTCTGTCAATGGCTATATTTGCTCCCAAAC
ATACATCAGCTAATGTGCATTGCAACCTGGTCAAGCCTTGTTAACTCCGTATTCACATTAT
TTCCTGCTTTTATAGTTAAGGGACTTAAGTCTAGAAGTTGGGTGTTTGAACCATCAATA
ACCTTACATTAAACATCTTGGTAAAACACAAGGGATTTAGATATTCTGTTTCTCCGATACAG
GCCTAAACGTATAATGCACATTTGACCTCTGAAACAGATTTATCGGCCTAAAAGCAGTAT
AGAAATGCACATGTTTATAAGCGTTAAATTCTTTAAAATATATATAAATCATTCTGATCA
GAAATATAAGCTTAGAATGCCACCTTTACATCTTGGTATAACACAAGTTGGTCAGGCATT
CTGTTCTACAAAATAGGCCTGATTACCAGTGCAGGATTGACCTTTGACCTTTGAGTCTGT
GTGTAATAATGTACCGTTGTACAAGAGCTCATTGTAGTAGGATAATGATTAGATTCTGCTC
TTTCTGAAAGGTCTGTTTGACAATGATATACAGTATGTTAAATGCTGAAGTATGATTTAT
GAGAGAGTGGAAGGTAAACCTTTGACCCTGCTGTACAGGCCTGTAATAAGGGTGTACCAT
GTTCTCACAGTGTAGTGCATAATCCCTACGGAACATCTTTGGTCATACGTGTACTGTAACC
TTTATCGTGCATTGTTACCTTTTTATTCACTGGCTTTTATAGTTAAGGGACTTAAGTCTAGA
AGTTGGGTCTTTTAACCATCATATACTGAGAAGTTGGTCTCAACGAACTGCTGAAACTTG
GAGTCATATTTAGGGCCTTTGCTGTTGTGTAGGAGAGACAAAACCAAGAATCTTAGTCCC
CGGCTACAGAGCAAACGTCATTGCGATTTCG

M12. A relatív expresszió ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) értékei (átlag $\pm$ szórás) és a mintaelemszámok vizsgálati csoportonként (ikrás és tejes fej és törzs, 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal a kikelést követően)

		<i>sox9b</i>		<i>foxl2</i>		<i>cyp19</i>	
		Átlag $\pm$ Szórás	n	Átlag $\pm$ Szórás	n	Átlag $\pm$ Szórás	n
8. nap (pool)	kontroll	1,14 $\pm$ 0,62	6	1,12 $\pm$ 0,57	6	1,29 $\pm$ 0,99	6
10. nap (pool)	Ikrás fej	4,57 $\pm$ 2,14	3	5,06 $\pm$ 1,16	3	7,67 $\pm$ 3	3
	Ikrás test	3,68 $\pm$ 2,55	3	1,04 $\pm$ 1,48	3	1,81 $\pm$ 0,96	3
	Tejes fej	5,20 $\pm$ 5,32	3	5,54 $\pm$ 4,06	3	4,35 $\pm$ 1,05	3
	Tejes test	4,32 $\pm$ 1,98	3	0,22 $\pm$ 0,11	2	2,10 $\pm$ 1,32	3
15. nap (pool)	Ikrás fej	37,77 $\pm$ 11,00	3	220,41 $\pm$ 125,67	3	11,68 $\pm$ 4,84	3
	Ikrás test	30,60 $\pm$ 9,67	3	265,13 $\pm$ 373,7	3	90,54 $\pm$ 144,12	3
	Tejes fej	81,89 $\pm$ 0,37	3	115,07 $\pm$ 30,92	3	12,12 $\pm$ 5,98	3
	Tejes test	18,31 $\pm$ 12,07	3	148,32 $\pm$ 164,94	3	16,71 $\pm$ 13,71	3
20. nap (egyedi minták)	Ikrás fej	2,64 $\pm$ 1,07	12	5,51 $\pm$ 6,5	12	2,98 $\pm$ 2,82	12
	Ikrás test	81,71 $\pm$ 138,34	12	0,06 $\pm$ 0,03	12	80,37 $\pm$ 138,29	12
	Tejes fej	1,87 $\pm$ 0,16	12	3,64 $\pm$ 4,71	12	2,08 $\pm$ 1,37	12
	Tejes test	1,58 $\pm$ 0,48	12	0,05 $\pm$ 0,04	12	0,88 $\pm$ 0,52	12
25. nap (pool)	Ikrás fej	2,62 $\pm$ 0,22	3	1,12 $\pm$ 0,21	3	2,93 $\pm$ 0,42	3
	Ikrás test	2,38 $\pm$ 0,99	3	-	-	6,42 $\pm$ 3,56	3
	Tejes fej	2,87 $\pm$ 1,49	3	1,27 $\pm$ 0,49	3	3,50 $\pm$ 2,30	3
	Tejes test	4,80 $\pm$ 4,38	3	-	-	187,23 $\pm$ 308,95	3
30. nap (egyedi minták)	Ikrás fej	125,24 $\pm$ 215,15	12	2,36 $\pm$ 1,27	12	2,92 $\pm$ 2,22	12
	Ikrás test	1,11 $\pm$ 0,35	12	1,59 $\pm$ 1,4	12	1,63 $\pm$ 0,79	12
	Tejes fej	1,18 $\pm$ 0,39	12	2,14 $\pm$ 0,92	12	2,50 $\pm$ 1,87	12
	Tejes test	3,96 $\pm$ 4,73	12	2,51 $\pm$ 2,38	12	5,33 $\pm$ 4,83	12
40. nap (egyedi minták)	Ikrás fej	1,28 $\pm$ 1,19	12	1,63 $\pm$ 1,71	12	0,93 $\pm$ 0,45	12
	Ikrás test	1101,43 $\pm$ 1903,09	12	9,00 $\pm$ 8,09	12	16,89 $\pm$ 16,02	12
	Tejes fej	0,92 $\pm$ 0,60	12	1,30 $\pm$ 1,62	12	0,76 $\pm$ 0,58	12
	Tejes test	675,68 $\pm$ 952,38	12	114,61 $\pm$ 186,43	12	279,33 $\pm$ 433,68	12

		sox3		mark2		pten		vasa	
		Átlag ± Szórás	n	Átlag ± Szórás	n	Átlag ± Szórás	n	Átlag ± Szórás	n
8. nap (pool)	kontroll	1,75 ± 2,03	6	1,22 ± 0,73	6	1,71 ± 1,95	5	2,28 ± 2,80	6
10. nap (pool)	Ikrás fej	19,26 ± 8,60	3	0,69 ± 0,71	3	2,31 ± 3,86	3	13,60 ± 13,02	3
	Ikrás test	7,91 ± 10,57	3	1,05 ± 0,67	3	9,20 ± 15,59	3	35,16 ± 52,81	3
	Tejes fej	20,58 ± 13,26	3	1,88 ± 1,41	3	52,11 ± 55,7	3	20,55 ± 14,89	3
	Tejes test	3,34 ± 1,70	3	1,42 ± 0,92	3	42,19 ± 27,15	3	43,42 ± 1833,48	3
15. nap (pool)	Ikrás fej	113,62 ± 19,68	3	1,06 ± 0,19	3	34,78 ± 48,77	2	1000,40 ± 1105,04	3
	Ikrás test	88,20 ± 85,71	3	1,27 ± 1,27	3	94,54 ± 92,34	3	3076,84 ± 3390,52	3
	Tejes fej	178,77 ± 14,38	3	2,65 ± 0,43	3	416,67 ± 217,32	3	1485,90 ± 282,70	3
	Tejes test	70,26 ± 36,28	3	1,34 ± 1,34	3	284,92 ± 177,65	3	866,85 ± 739,02	3
20. nap (egyedi minták)	Ikrás fej	15,18 ± 10,13	12	0,10 ± 0,07	12	0,42 ± 0	12	5,24 ± 2,76	12
	Ikrás test	1,75 ± 1,01	12	0,07 ± 0,03	12	0,53 ± 0,73	12	18,85 ± 20,92	12
	Tejes fej	8,87 ± 4,09	12	0,17 ± 0,11	12	30,2 ± 44,72	12	4,64 ± 0,30	12
	Tejes test	1,36 ± 0,83	12	0,05 ± 0,01	12	27,67 ± 41,45	12	7,19 ± 4,58	12
25. nap (pool)	Ikrás fej	27,17 ± 6,59	3	0,13 ± 0,01	3	51,57 ± 55,78	3	25,39 ± 4,86	3
	Ikrás test	6,56 ± 1,65	3	0,16 ± 0,04	3	94,54 ± 92,34	3	189,66 ± 116,35	3
	Tejes fej	48,43 ± 35,48	3	0,17 ± 0,11	3	142,59 ± 140,14	3	36,14 ± 27,80	3
	Tejes test	9,87 ± 9,27	2	0,37 ± 0,36	3	243,91 ± 344,83	2	229,56 ± 295,75	2
30. nap (egyedi minták)	Ikrás fej	8,20 ± 4,03	12	0,05 ± 0	12	1,89 ± 0,83	12	24,12 ± 14,11	12
	Ikrás test	4,44 ± 3,46	12	0,03 ± 0	12	25,9 ± 32,93	12	46,28 ± 7,88	12
	Tejes fej	8,71 ± 4,41	12	0,05 ± 0,02	12	119,36 ± 83,51	12	30,25 ± 16,98	12
	Tejes test	5,33 ± 4,77	12	0,04 ± 0,02	12	437,9 ± 460,58	12	344,19 ± 321,15	12
40. nap (egyedi minták)	Ikrás fej	10,26 ± 3,90	12	0,07 ± 0	12	4,39 ± 7,11	12	11,57 ± 15,76	12
	Ikrás test	13,19 ± 12,49	12	0,06 ± 0,03	12	46,08 ± 39,56	12	210,62 ± 120	12
	Tejes fej	7,08 ± 2,61	12	0,06 ± 0,05	12	63,71 ± 77,63	12	14,17 ± 19,45	12
	Tejes test	66,08 ± 87,6	12	0,16 ± 0,16	12	383,74 ± 329,19	12	4435,99 ± 6997,92	12

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet fejezni ki a rengeteg segítségért, melyet munkám és dolgozatom elkészítéséhez kaptam az **Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet** összes munkatársának, külön kiemelve:

- témavezetőmet **Dr. Kovács Balázst**, az irányításáért, a tanításaiért és javításaiért.
- **Dr. Orbán Lászlónak**, a publikációk és a dolgozat írásában nyújtott rengeteg segítségért, a szakmai és emberi iránymutatásáért. Nélküle ez a dolgozat nem készülhetett volna el.
- **Dr. Urbányi Bélának** és **Dr. Kriszt Baláznak**, az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet vezetőinek, hogy megteremtették munkám számára a háttérét.
- **Dr. Csorbai Baláznak** a kísérleti állatok nevelése során nyújtott rengeteg segítségért.
- A laboratóriumi gyakorlathoz adott tanácsokat a Molekuláris Ökológia Tanszék összes dolgozójának, külön kiemelve **Guti Csabát** és **Vásárhelyi Ernát**.
- **Dr. Horváth Ákosnak** és **csoportjának** az állandó támogatást, a közös munkák során nyújtott segítséget.
- Hallgatóimnak, **Varga Veronikának**, **Bancsics Annának** és **Cao Thi Linh Chi-nek** fáradhatatlan munkájukat.
- Minden kollégámnak, aki az átfolyóvízes rendszerben nevelt állomány szaporításában és testtömeg mérésében segített, külön kiemelve **Péter Dánielt**, **Bíró Adrienn**t, **Bartucz Tamást**, **Izsák Tibort** és **Láng Levente Zetét**.
- A V-95 Kft. és a Bajcsfal Kft. dolgozóinak, külön kiemelve **Dr. Varju-Katona Milánt** és **Boros Attilát**.
- Családomnak és barátaimnak a támogatásukat.

A munkát az iFishIENCi (Horizont 2020, No 818036), a 2017-2.3.3-TÉT-VN-2017-00004 és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 projekt támogatta, ami az Európai Unió támogatásával és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.