



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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
jóváhagyása

A témavezető

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus* BURCHELL, 1822) a *Siluriformes* rendbe tartozó halfaj, mely akvakultúrás termelésre rendkívül alkalmas. A hímek növekedési erélye és táphasznosítása (HENKEN ET AL., 1987), valamint filé kihozatala (FAO, 2010) is meghaladja a nőstényekét, így termelési szempontból előnyös lenne egyivarú (monoszex) termelési állományokat létrehozni. A monoszex állományok kialakítása érdekében végzett bármilyen ivar manipulációs eljáráshoz elengedhetetlen az adott faj ivardeterminációs mechanizmusának, ivari fejlődésének részletes ismerete. Az afrikai harcsa kiemelt gazdasági jelentősége ellenére még ivardeterminációs mechanizmusáról is ellentmondásos eredményekkel rendelkezünk: néhányan női heterogametikus (ZZ/ZW) (OZOUF-COSTAZ ET AL., 1990; VÁRADI ET AL., 1999), mások viszont hím heterogametikus (XX/XY) ivardeterminációs rendszert (GALBUSERA ET AL., 2000; LIU ET AL., 1996) írtak le. Egy nemrég megjelent publikációban pedig (NGUYEN ET AL., 2021) a kétféle ivardeterminációs rendszer együttes jelenlétét valószínűsítették a faj ázsiai populációjában néhány ‘mérsékelten ivarhoz kötött’ ivari marker alapján. Egyes szerzők szerint (SANTI ET AL., 2016; SANTI ET AL., 2017) az afrikai harcsa genetikai ivardeterminációját környezeti hatások felülírhatják, magasabb hőmérsékleten az ikrások fenotípusosan tejesekké fordulnak át: egyes holland állományokból származó családokon 100% hím ivararányt figyeltek meg 36 °C-os vízhőmérsékleten nevelt állatoknál. Az ivarátfordulás jelenségére azonban csak az ivararányok alapján következtettek, molekuláris módszerekkel nem bizonyították azt.

Az ivarhoz kötött gének korai kifejeződésének mintázatait afrikai harcsában ivaronként még nem vizsgálták, csak az ivarszervek differenciálódását követően. Kutatócsoportunk elődjében izoláltak afrikai harcsából egy hím-specifikus DNS markert (CgaY1, NCBI génbanki azonosító: AF332597), mely lehetővé teszi a DNS alapú ivarmeghatározást az ivarszervek kialakulását megelőzően, és ezáltal a korai génkifejeződés ivaronkénti vizsgálatát is. A CgaY1

emellett alkalmas a hőmérséklet-okozta ivarátfordulás bizonyítására is, valamint jelenléte hím heterogametikus ivardeterminációs rendszert valószínűsít. Emellett egy ivarhoz kötött marker segítségünkre lehet annak tisztázásában is, hogy mely genomi régió játszik szerepet az ivar kialakításában.

Nemrég publikálták egy afrikai harcsa tejes teljes genom szekvenciáját egy nem lektorált, „preprint” publikációk számára fenntartott online repozitóriumban, mely a későbbi kutatások számára alapul szolgálhat (NGUINKAL ET AL., 2023). 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, melyet a Hap1, valamint a Prim assembly 24-es kromoszómájára is sikerült ráilleszteniük, azonban a Hap2 assembly-n nem találtak szignifikáns egyezést. A fenti eredményekből arra következtettek, hogy a Hap1 genom a tejes, a Hap2 pedig az ikrás haplotípust reprezentálja. Az illesztett genomok mérete alapján ZZ/ZW ivardeterminációs rendszert javasoltak, de az ivari kromoszómák jellemzését nem végezték el.

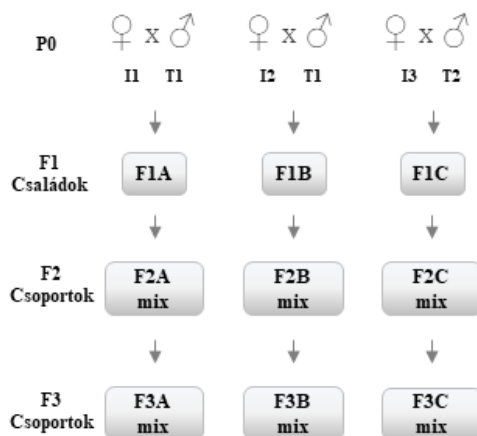
Munkám során a következőket tűztem ki célul:

1. A kutatócsoportunk elődjében izolált hím-specifikus CgaY1 marker többgenerációs validálását magyarországi és vietnámi afrikai harcsa állományokon.
2. Néhány, mások által izolált ‘mérsékeltén ivarhoz kötött’ ivari marker tesztelését.
3. A mások által javasolt hőmérséklet-okozta ivarátfordítás lehetőségének tesztelését egyes hazai 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 molekuláris ivarmeghatározás segítségével.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Afrikai harcsa kísérleti állomány

A recirkulációs akvakultúrás (RAS – Recirculating Aquaculture System) rendszerben tartott tenyészállomány (P0) öt egyedből állt, melyek mindegyike a fenotípusos ivarának megfelelő CgaY1 markerrel rendelkezett (lásd **1. ábra**).

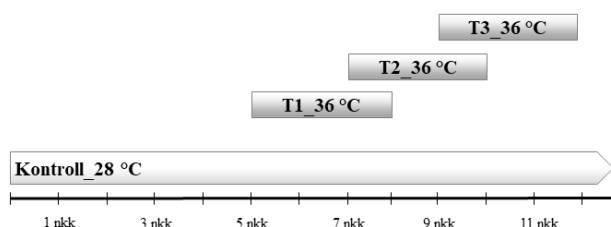


1. ábra: A RAS rendszerben tartott állomány keresztezési sémája. Ikrások- I1, I2, I3 és tejesek- T1, T2

Az öt P0 egyed páros keresztezésével, egy egyedet két keresztezésben is felhasználva létrehoztam három F1 családot (F1A, F1B, F1C család), melyet három különböző medencében neveltem ivaréérésig. Ezt követően mindhárom családból 10 tejes és 10 ikrás egyedet páros keresztezésével, molekuláris ivarmeghatározás nélkül, létrehoztam az F2 generáció csoportjait (F2A mix, F2B mix, F2C mix), melyeknél a 10-10 családból származó ikratételeket egyenlő arányban kevertem. Az F2 generációt ivaréérésig neveltem, majd molekuláris ivarmeghatározást és boncolást követően, az ivarszervek morfológiája alapján, fenotípusos ivarmeghatározást végeztem rajtuk. 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, melyek a fenotípusos ivarnak megfelelő CgaY1 markerrel rendelkeztek. A 10-10 páros

keresztkezésből származó utódokat csoportonként keverve (F3A Mix, F3B Mix és F3C Mix) neveltem a kikelést követő 3. hónapig, amikor molekuláris ivarmeghatározást és fenotípusos ivarmeghatározást végeztem fénymikroszkóp alatt, egy módosított aceto-kármin festés segítségével.

A hőmérséklet általi ivarátfordulás ellenőrzésére kialakítottam négy, egyenként 1000-1000 lárvából álló csoportot az F3 generáció csoportjaiból (F3A Mix, F3B Mix és F3C Mix), majd csoportonként hármat $36 \pm 1^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten, vízfürdőben 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 (lásd 2. ábra).



2. ábra: A hőmérséklet általi ivarátfordítás vizsgálata. Három csoportot 36°C hőmérsékleten tartottam három különböző fejlődési stádiumban (T1 – 5-8, T2 – 7-10, T3 - 9-12 nappal kikelést követően), a negyediket kezeletlen kontroll csoportként 28°C hőmérsékleten neveltem.

A CgaY1 ivar-specifikus marker validálására a P0 anyaállományt (5 egyed), három F2 csoportot (85, 86, 89 egyed) és három F3-as csoportot (50, 48, 93 egyed) használtam. Néhány, mások által izolált mérsékelt ivarhoz kötött ivari marker tesztelésére az F2 csoportokból olyan egyedeket használtam ($n=16$), melyek a fenotípusos ivarnak megfelelő CgaY1 markerrel rendelkeztek. A hőmérséklet általi ivarátfordítás jelenségének vizsgálatára az F3 csoportokat (hőkezelt és kontroll, $n=444$) használtam. A korai, ivari fejlődésben szerepet

játszó gének kifejeződésének ivaronkénti vizsgálatát az F3 kontroll csoportokon (n=168) végeztem el.

A CgaY1 hím-specifikus marker alkalmazhatóságát Vietnámból származó afrikai harcsákon (n=61) is megvizsgáltam. Az új, ivarhoz kötött SNP markerek izolálására a Bajcsihal Kft. kisbajcsi telephelyén, átfolyóvízes rendszerben tartott állomány P0 és F2 generációját használtam (n=192).

2.2. Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszerének vizsgálata

2.2.1. Fenotípusos ivar ellenőrzése

A halak túlaltatását követően a fenotípusos ivar ellenőrzéséhez *post mortem* eltávolítottam és tárgylemezre helyeztem az ivarszerveket, majd egy módosított aceto-kármin (Guerrero & Shelton, 1974) festés segítségével megfestettem és fénymikroszkóp alatt vizsgáltam.

2.2.2. Molekuláris ivarmeghatározás

DNS izolálást követően, egy duplex PCR reakció segítségével felszaporítottam a CgaY1 hím-specifikus fragmentet (1,1 kb), mely csak tejeseekben amplifikálódik és egy rövidebb, kontroll fragmentet (486 bp), mely tejeseekben 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 reakciót optimalizáltam és a PCR termék méretét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem.

2.2.3. A hőmérséklet hatásának vizsgálata

Ellenőriztem mind a hőkezelt, mind a kontroll csoportok összes egyedének (n=444) fenotípusos ivarát (lásd 2.2.1). Ezen felül 123, fenotípusa alapján tejes egyedet véletlenszerűen kiválasztva (24, 19, 80 hal a három keresztezésből) molekuláris ivarmeghatározást végeztem a CgaY1 marker segítségével (lásd 2.2.2) a genetikai ivar ellenőrzésére.

2.2.4. A CgaY1 vizsgálatából 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 (cM - centiMorgan). Az 1:1 ivaráránytól való eltérést minden csoportban teszteltem egymintás Z-próba segítségével.

2.2.5. Egyéb ivarhoz kötött markerek vizsgálata

Három „mérsékelten hím-asszociált” (*dtna*, *add3*, *gucd1*) és kettő „mérsékelten nőstény-asszociált” (*dctn4*, *pcdh2ab3*) lókuszt vizsgáltam. A termék szekvenciákat a BLAST szoftver segítségével összevettem a kutatócsoportunk által korábban megszekvenált afrikai harcsa genommal (nem publikált adat). A négy marker határoló régiójára primereket terveztem, és DNS izolálást követően PCR reakcióval felsokszoroztam és az *in silico* számított termékek hosszát agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem.

2.2.6. Ivarhoz kötött SNP markerek izolálása ddRAD szekvenálás segítségével

A nagy tisztaságú DNS mintákat PstI és MspI restriktációs enzimekkel emésztettem, majd méretszelekciót hajtottam végre KAPA PureBeads segítségével a 150-300 bp közötti fragmentek kinyerésére. T4 DNS ligáz segítségével a fragmentekhez kétszálú adaptereket ligáltam, majd PCR reakcióval, NEBNext Multiplex Oligos for Illumina kit felhasználásával minden mintát egyedi azonosítóval (barcode) láttam el. A mintákat egyenlő koncentrációban 'pooloztam', a 'poolozott' könyvtáron minőség és mennyiség ellenőrzést végeztem és a végleges, amplifikált könyvtárat 10 pM koncentrációra hígítottam. A szekvenálást a Xenovea Kft. végezte Illumina NextSeq 500 genomszekvenáló platformon 2x150 bp leolvasási hosszal. Az adatok kiértékelését egy együttműködés keretében Julian Catchen (Department of Evolution, Ecology, and Behavior, University of Illinois, Urbana-Champaign,

Urbana, IL) végezte el. A markerek és az ivar közötti asszociációt nem parametrikus Fisher-féle egzakt próbával és molekuláris varianciaanalízis (AMOVA, Analysis of Molecular Variance) segítségével teszteltük. Az eredményeket a legmagasabb fixációs index (F_{ST}) értékekre ($>0,07$) szűrtük.

2.3. Az ivaronkénti génexpresszió vizsgálata

Az állatokat túlaltattam, majd sztereomikroszkóp (Leica M205 FA) alatt három részre vágtam őket. A farokúszó szövetekből DNS-t izoláltam a molekuláris ivarmeghatározáshoz (lásd 2.2.2). A fejből és a törzsből RNS-t izoláltam TRI Reagent segítségével, majd DNázI kezelést alkalmaztam. Random hexamer primer és reverz transzkriptáz enzim felhasználásával az RNS-ből cDNS-t készítettem, amelyen qPCR vizsgálatokat végeztem Step One Plus készülékkel, Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus felhasználásával.

Vizsgáltam a *vasa*, *foxl2*, *sox3*, *sox9*, *amhr2*, *pten* és *mark2* gének korai kifejeződését. A reakciókat standard curve analízis segítségével optimalizáltam 95-105% közötti hatékonyság értékig. Öt potenciális referencia gén (*ef1a*, *gapdh*, *rpl13*, *actb*, *18S*) közül meghatároztam a vizsgálataimhoz legmegfelelőbb referencia gént, az *actb*-t.

Négyféle csoportot (tejes, ikrás, fej, törzs) vizsgáltam 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően. Kontroll csoportként 8 napos halakból álló 'poolt' használtam. Minden minta esetében meghatároztam az átlagos küszöbérték ciklusszámot (C_t) 3 technikai ismételtes átlagából. Az eredményeket gélelektroforézis, illetve olvadási görbe analízis segítségével ellenőriztem. 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. A statisztikai analízishez a csoportok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov tesztel ellenőriztem. Ennek függvényében a kontroll csoporttól való eltérést ANOVA vagy Kruskal-Wallis tesztel, az ivaronkénti különbségeket t-próbával vagy Mann-Whitney próbával vizsgáltam.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

3.1. Az afrikai harcsa ivardeterminációs rendszere

3.1.1. CgaY1 marker validálásának eredményei

A CgaY1 marker több generációs validálása során a genotípusos és a fenotípusos ivar az esetek 96,4%-ában egyezett. A megbízhatóság az F2 generációban 97,3% (95,3-98,8%), míg az F3 generáció csoportjaiban 95,3% (94,6-96%) volt. A 451 egyed vizsgálata során mindössze 16 esetben (3,5%) találtam eltérést a geno- és fenotípusos ivar között: öt fenotípusa alapján tejcs egyedből nem sikerült felszokszorozni a hím-specifikus markert, míg 11 fenotípusosan ikrás egyedben viszont megjelent. Az eltéréseket második PCR reakcióval is igazoltam. Az eltérések valószínűsíthető oka: rekombináció az ivari marker és az ivardeterminációs szakasz között. Ebben az esetben a rekombináció átlagos gyakorisága az F2 és F3 generációban 2,69% és 4,51%. Így a genetikai távolság mértéke 2,69 cM és 4,51 cM közé becsülhető generációnként, átlagosan pedig 3,6 cM. Sem a fenotípusos, sem a genotípusos ivar esetében nem találtam szignifikáns eltérést ($p > 0,05$) az 1:1 ivarárányhoz képest egyik vizsgált csoportnál sem.

Ellenőriztem a CgaY1 marker alkalmazhatóságát 61 Vietnámból származó egyeden is. A vietnámi állomány vizsgálata során nagyobb arányban (16,39%) találtam eltérést a fenotípus és a genotípus között: hat fenotípusa alapján tejcs egyedből nem sikerült felszokszorozni 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.

3.1.2. A hőmérséklet ivarra gyakorolt hatásának eredményei

A hőkezelt csoportokból 123 fenotípusa alapján teljes egyedeket véletlenszerűen kiválasztva mindössze négy egyed (3,25%) esetében nem sikerült felszorozni a CgaY1 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) viszonyítva sem figyeltem meg szignifikánsan magasabb hím ivararányt. 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.

3.1.3. Egyéb ivarhoz kötött markerek vizsgálatának eredményei

A más szerzők (NGUYEN ET AL., 2021) által publikált, öt „mérsékelten ivarhoz kötött” (‘moderately sex-linked’) marker (három hím ivarra jellemző: *gucd1*, *add3* és *dtna* és két női ivarra jellemző: *dctn4* és *pcdh2ab3*) közül 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 nyolc teljes és nyolc ikrás egyeden. Mind a négy PCR reakció esetén ugyanazt a - markerenként eltérő méretű - terméket figyeltük meg mindkét ivarban, mely az *in silico* számításoknak megfelelő mérettartományba esett (*dtna* - 194 bp, *add3* - 204 bp, *dctn4* - 226 bp, és *pcdh2ab3* - 195 bp).

3.1.4. Ivarhoz kötött SNP markerek eredményei

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

A fixációs index (F_{ST}) átlagos értéke 0,0036 volt a tejesek és ikrások között. A legmagasabb ($> 0,07$) F_{ST} értéket mutató tizenkét SNP marker tíz lókuszon helyezkedett el. 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, mivel egy lókuszt három markert is tartalmazott. A tíz lókuszt BLASTn algoritmus segítségével (Megablast) a nemrég közölt (NGUINKAL ET AL., 2023) afrikai harcsa genomra illesztettem és hetet, köztük a két legmagasabb F_{ST} és LOD értékekkel rendelkezőt és a három SNP markert tartalmazót a 24-es kromoszómán találtam meg. A hét lókuszból öt egymás közelében, egy nagyjából 1,2 Mb hosszúságú szakaszon helyezkedett el, mely több, mint negyven fehérjét kódoló szekvenciát tartalmaz, köztük az androgén receptort (*ar*) kódoló gént is.

Az egyik lókuszt Nguinkal és munkatársai (2023) annotálása alapján egy ATRX-szerű transzkripció aktivátor (transcriptional regulator ATRX-like, Gene ID: 128512310) szekvenciájára sikerült illesztenem és az SNP marker a gén egyik exonján helyezkedett el. A gén emlősökben egy X kromoszómához kötött cink-ujj helikázt kódol (STAYTON ET AL., 1994; VILLARD ET AL., 1997), melynek mutációja XY egyedekben ivarátfordulást (REARDON ET AL., 1995) okoz. Az egyik legerősebben kapcsolt SNP marker pedig egy relaxin 2-es típusú receptor szerű (relaxin family peptide receptor 2 like, Gene ID: 128511954) gén intronján

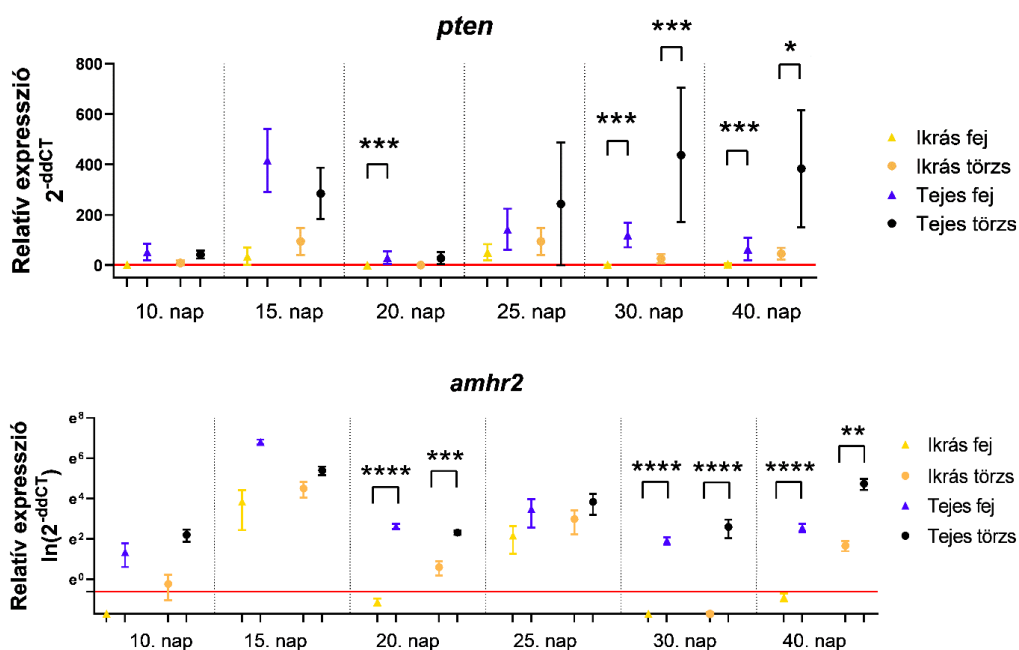
helyezkedik el, mely emlősökben egy G-fehérje kapcsolt transzmembrán receptort kódol (HSU ET AL., 2002). Ennek a receptornak a ligandja a relaxin-típusú peptidek közé tartozó inzulinszerű 3-as faktor (INSL3), amely a here Leydig-sejtjeiben fejeződik, a Wolff-vezeték fenntartását, a reprodukív szervek fenntartását és a here leszállását szabályozza (KUMAGAI ET AL., 2002).

Érdekes módon, amikor BLAST elemzéssel a 2.582 bp hosszúságú hím-specifikus CgaY1 markert (AF332597.1) az NCBI adatbázisban közzétett afrikai harcsa genomra (NC_071100.1) próbáltam ráilleszteni, azt a 36-os számú (NW_026521003.1), a genomban el nem helyezett szekvencián (scaffold) találtam meg 99%-os lefedettséggel és 97,2%-os egyezéssel. 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. Ez a szakasz az annotáció alapján huszonegy fehérjekódoló gént tartalmaz, többek között hiszton fehérjét, valamint ribóz-foszfát foszfokináz fehérjét kódoló géneket, emellett a más fajokban MSD gén funkciót betöltő és a gerincesek ivari differenciálódásában fontos szerepet játszó *amhr2* gént, valamint a *mark2* és *pten* gént is.

3.2. A korai ivaronkénti génkifejeződés eredményei

Vizsgáltam a petefészek differenciálódásában szerepet játszó *foxl2* és *sox9b*, a here differenciálódásában szerepet játszó *sox3*, *amhr2*, *pten* és *mark2*, valamint az ivari őscsírasejtekre jellemző *vasa* gén kifejeződését 40 napos kor előtt, molekuláris ivarmeghatározás segítségével. A nyolc napos, vegyes ivarú, kontroll csoporthoz viszonyítva a *sox9b*, *foxl2*, *sox3* és *vasa* gén esetében 15 napos korban figyeltem meg emelkedett mRNS mennyiséget. A mennyiségeket ivaronként vizsgálva a petefészek differenciálódásában fontos gének közül a *sox9b*

20 napos korban volt magasabb az ikrás fejben. A here differenciálódásában szerepet játszó gének közül a *CgaY1* hím-specifikus marker közelében talált két gén, az *amhr2* és a *pten* mutatott szignifikánsan magasabb expressziót a tejeselekben mind a fejben, mind a törzsben, 20 napos kortól kezdve több fejlődési stádiumban (lásd **3. ábra**). Az irodalmi adatok alapján mindkét gén az ivari őscsírasejtek (PGC) proliferációját szabályozza, a *pten* emlősökben osztódásukat gátolja (CHU AND TARNAWSKI, 2004; KIMURA ET AL., 2003; YIN AND SHEN, 2008). A csontoshalak több fájában az első ivaronkénti különbség a PGC-k magasabb száma az ikrásokban, mely mennyiségi különbség bizonyos esetekben direkt módon is kialakítja az ivart (SIEGFRIED, 2010; TZUNG ET AL., 2015; YE ET AL., 2019).



3. ábra: A tejeselekben megemelkedett expressziós szintet mutató *pten* és *amhr2* gének kifejeződésének eredményei. A mintavételek 10, 15, 20, 25, 30 és 40 nappal kikelést követően történtek, ikrás és tejes fejből és törzsből, a szignifikáns különbségek csillaggal jelölve.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A CgaY1 hím-specifikus marker egy három generációs keresztezés egyedein 96%-ban mutatott egyezést a fenotípusos ivarral. A magyar állományoktól genetikailag eltérő eredetű vietnámi állomány esetében is 84%-os megbízhatóságot tapasztaltam. Emellett, a mások által publikált (NGUYEN ET AL., 2021), ZZ/ZW ivardeterminációs rendszer jelenlétét alátámasztó markerek (*dctn4* és *pcdh2ab3*) nem mutattak ivaronkénti különbséget kísérleteim során. Eredményeim alapján feltételezem, hogy az általam vizsgált hazai afrikai harcsa állományok ivarát kizárólag hím heterogametikus (XX/XY) ivardeterminációs rendszer határozza meg. Kísérleteim alapján a relatív genetikai távolság átlagos értéke az ivardetermináló régió és a CgaY1 hím-specifikus marker között 3,6 cM, mely szoros kapcsoltságot valószínűsít.

A nagy áteresztőképességű szekvenálás eredményei alapján az ivar kialakításában szerepet játszó genomi régiót a nemrég publikált (NGUINKAL ET AL., 2023) afrikai harcsa genom 24-es kromoszómáján feltételezem. A CgaY1 hím-specifikus markert azonban egy el nem helyezett genomi szekvenciára (36-os scaffold) sikerült illesztenem, melyen a *pten*, *mark2*, valamint *amhr2* gének szekvenciája is megtalálható volt. 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, feltételezhetően a 24-es kromoszómához tartozik.

A 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 egyivarú termelési populációk létrehozására a magyar állományokon.

A *vasa*, *foxl2*, *sox3*, *sox9*, *amhr2*, *pten* és *mark2* gének korai kifejeződésének vizsgálata alapján az ivari differenciálódás jelei már 15 napos

korban kimutathatóak és a fejből (feltehetően az agyból) és törzsből (feltételezhetően a gonádból/PGC-kból) 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. A *pten* és az *amhr2* gének az irodalmi adatok alapján a PGC-k proliferációját szabályozzák és a csontoshalak több fájában az első ivaronkénti különbség a PGC-k magasabb mennyisége ikrásokban. Ezek alapján elképzelhetőnek tartom, hogy afrikai harcsa fajban ezen gének terméke hímelekben a PGC-k felszaporodásának gátlása által a tejes fenotípus kialakításában vesz részt.

Javaslatok

Javaslom a CgaY1 hím-specifikus marker vizsgálatát a faj Thaiföldről származó populációin, továbbá olyan egyedeket keresztezését, melyeknél a fenotípusos ivar nem egyezik a CgaY1 marker szerinti genotípusos ivarral, majd az így kapott utódállomány ivararányának vizsgálatát. Javaslom az a Nguinkal és munkatársai által publikált genom 24-es kromoszómájának és 36-os scaffold-jának részletesebb elemzését. Javaslom a hőkezelés hőmérsékletének csökkentését a mortalitás alacsonyabb szinten tartására, illetve a jelenség vizsgálatát más vonalak, szelektált állományok, vagy egyedi keresztezések (családok) esetében. Javaslom egy nagy áteresztőképességű transzkriptóma vizsgálat elvégzését 15 nappal kikelést követően, lehetőség szerint külön az agyban és az ivarszervekben, valamint ivarátfordított egyedek agyában is. Érdemes lenne ebben a fejlődési stádiumban *in situ* hibridizációs technikával megvizsgálni, hogy van-e ivaronkénti különbség a PGC-k mennyiségében és amennyiben igen, génkiütéssel megvizsgálni a *pten* és az *amhr2* gének szerepét a folyamatban. Javaslom emellett a *pten* és az *amhr2* gének további vizsgálatát, valamint ezen gének kapcsolatának elemzését is.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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 terméke szerepet játszik.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

6.1. Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

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.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.04.017>

6.2. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

6.2.1. Előadás

Balogh, R. E., Csorbai, B., Guti, C., Urbányi, B., Catchen, J., Orbán, L. & Kovács, B. (2024): Revisiting the sex determination and sexual differentiation of African catfish (*Clarias gariepinus*). 59th Croatian & 19th International Symposium on Agriculture, Dubrovnik, Croatia, 12-15 February 2024

Balogh, R. E., Csorbai, B., Guti, C., Keszte, S., Bíró, A., Péter, D., Urbányi, B., Kovács, B. (2021): Early expression profile of sex-related genes in African catfish (*Clarias gariepinus*). 56th. Croatian & 16th International Symposium on Agriculture, Vodice, Croatia, 5-10 September 2021

6.2.2. Poszter

Balogh, R. E., Csorbai, B., Guti, C., Keszte, S., Urbányi, B., Orbán, L., Kovács, B. (2019): Applicability of an African catfish (*Clarias gariepinus*) sex specific DNA marker. 54 Croatian & 14 International Symposium on Agriculture, Vodice, Croatia, 17-22 February 2019

Guti, C., Kovács, B., Barta, E., Keszte, S., Kánai, S. D., **Balogh, R. E.**, Uri, C., Patócs, A., Pongor, S. L., Müller, T., Orbán, L., Urbányi, B. (2017): Whole transcriptome sequencing and sex-specific expression of the African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture Europe 17, Dubrovnik, Croatia, 17-20 October 2017

Kovács, B., Barta, E., Guti, C., Keszte, S., Kánai, S. D., **Balogh, R. E.**, Uri, C., Patócs, A., Pongor, S. L., Müller, T., Orbán, L., Urbányi, B. (2017): Preliminary

results of de novo whole genome sequencing of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Aquaculture Europe 17, Dubrovnik, Croatia, 17-20 October 2017

6.3. Hazai konferencia kiadványban megjelent közlemények

6.3.1. Poszter

Balogh, R. E., Csorbai, B., Keszte, S., Péter, D., Urbányi, B., Orbán, L. & Kovács, B. (2023): A molekuláris ivarmeghatározás alapján a hazai afrikai harcsa állományokon nem történt hőmérsékleti hatásra ivarátfordulás, XLVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Magyarország, 2023. június 7-8

Balogh, R. E., Keszte, Sz., Guti, Cs., Csorbai, B., Urbányi, B., Kovács, B. (2019): Ivar-specifikus DNS marker öröklődésének vizsgálata afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) keresztezéseken. XLIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Magyarország, 2019. május 29-30

Kovács, B., Barta, E., Guti, C., Pongor, S. L., Uri, C., Keszte, S., Kánai, S. D., **Balogh, R. E.**, Patócs, A., Müller, T., Orbán, L., Urbányi, B. (2017): Az afrikai harcsa genom vizsgálatának újabb eredményei. XLI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Magyarország, 2017. június 14-15

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

7.1. Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Bláha, M., Weiperth, A., Patoka, J., Szajbert, B., **Balogh, R. E.**, Staszny, Á., Ferincz, Á., Lente, V., Maciaszek, R., Kouba, A. (2022): The pet trade as a source of non-native decapods: the case of crayfish and shrimps in a thermal waterbody in Hungary, *Environmental Monitoring and Assessment* 194(10), e795, <https://doi.org/10.1007/S10661-022-10361-9>

Piria, M., Jelkic, D., Gavrilovic, A., Horváth, Á., Kovács, B., **Balogh, R. E.**, Spelic, I., Radocaj, T., Vilizzi, L., Ozimec, S., Opacak, A. (2022): Finding a hybrid African catfish (*Clariobranchus*) in the Danube river, *Journal of Vertebrate Biology* 71(22008), 1-8p., <https://doi.org/10.25225/JVB.22008>

Keszte, S., Ferincz Á., Tóth-Ihász, K., **Balogh, R. E.**, Staszny, Á., Hegyi, Á., Takács, P., Urbányi, B., Kovács, B., (2021): Mitochondrial sequence diversity reveals the hybrid origin of invasive gibel carp (*Carassius gibelio*) populations in Hungary, *PeerJ*, 9, e12441 <https://doi.org/10.7717/peerj.12441>

7.2. Hazai folyóiratban megjelent közlemények

Németh, T., **Balogh, R. E.**, Berényi D., Franyó S., Ferincz Á., Lente V., Staszny, Á., Weiperth A. (2022): A cifrarák (*Faxonius limosus*) téli aktivitásának igazolása hazánk természetes vizeiben. *Halászat* 115/3, 18-18p.

Balogh, R. E., Borzák, R., Doszpoly A., Mári Á., Weiperth A. (2021): A feketeszájú géb (*Neogobius melanostomus*) első bányatavi észlelése Magyarországon. *Halászat* 114/3, 98-98p.

Keszte Sz., Stein R., Kánainé S. D., Balogh E., Zellei Á., Sebestyén A., **Balogh R. E.**, Guti Cs. F., Bokor Z., Urbányi B., Kovács B. (2017): Mitokondriális genetikai vizsgálat a velencei-tavi vadponty anyajelöltjeinek állományán. *Animal welfare, Etológia és Tartástechnológia*, 2017. XIII/2

Keszte Sz., Mészáros O., Kánainé S. D., Balogh E., Zellei Á., Sebestyén A., **Balogh R. E.**, Guti Cs. F., Bokor Z., Urbányi B., Kovács B. (2017): Velencei ponty állomány diverzitásának mikroszatellit markerekre alapozott genetikai vizsgálata, *Animal welfare, Etológia és Tartástechnológia*, 2017. XIII/2

7.3. Hazai könyvfejezet

Kovács B., Lehoczky, I., **Balogh, R. E.**, Molnár T. (2022): A sügér biológiája és tenyésztése - A sügér genetikai háttere és genetikai erőforrásai, szerk.: Bokor, Z., Csorbai, B., Urbányi, B., Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő, Magyarország, 166 p. pp. 41-61.

Kovács B., **Balogh, R. E.**, Péter, D. (2021): Horgászati szempontból jelentős pontyfélék biológiája és tenyésztése - Egyes horgászati szempontból jelentős pontyfélék genetikája, szerk.: Urbányi, B., Szabó, T., Horváth, Á., Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő, Magyarország, 262 p. pp. 53-71.

7.4. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

7.4.1. Előadás

Balogh R. E., Péter, D., Bíró, A., Kobolák, J., Varju-Katona, M., Szilágyi, G., Bokor, Z., Urbányi, B., Kovács, B. (2023): Selection programme for better performance of African catfish (*Clarias gariepinus*). 58th Croatian & 18th International Symposium on Agriculture, Dubrovnik, Croatia, 12-16 February 2023

7.4.2. Poszter

Balogh R. E., Kovács, B., Urbányi, B., Marinović, Z., Kitanović, N., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., I., Radočaj, T., Barić, O., Allison, J., Horváth, Á. (2023): Molecular species identification of Adriatic oysters. Aquaculture Europe 2023, Vienna, Austria, 18-21 September 2023

Balogh R. E., Péter, D., Bíró, A., Kobolák, J., Bokor, Z., Urbányi, B., Kovács, B. (2022): Multi generation selection and performance test of an African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) line selected for better utilization of low fish-meal feed. Aquaculture Europe 2022, Rimini, Italy, 27-30 September 2022

Kitanović N., **Balogh R. E.**, Marinović Z., Kovács B., Csenki Zs., Urbányi B., Horváth Á. (2022): Steps towards establishing a primary culture of zebrafish previtellogenic ovarian follicles. 8th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Gdansk, Poland, 20-23 September 2022

Balogh R. E., Péter, D., Bíró, A., Keszte Sz., Urbányi, B., Lehoczky, I., Edviné M., E., Kovács, B. (2021): Genetic analysis of nine Hungarian common carp (*Cyprinus carpio*) strains with a novel multiplex PCR set for tetranucleotide microsatellites. Aquaculture Europe 2021, Funchal, Madeira, 4-7 October 2021

Balogh R. E., Varju-Katona, M., Péter, D., Bíró, A., Keszte Sz., Kobolák, J., Pataki, B., Kitanovic, N., Szilágyi, G., Urbányi, B., Kovács, B. (2021): Preliminary results of an African catfish (*Clarias gariepinus*) selection programme for better utilization of low fish-meal feed. Aquaculture Europe 2021, Funchal, Madeira, 4-7 October 2021

Balogh R. E., Varju-Katona, M., Ihász, K., Keszte Sz., Lujic, J., Šćekić, I., Kitanović, N., Urbányi, B., Kovács, B. (2020): Growth performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed with low fish-meal feed. 55th Croatian & 15th International Symposium on Agriculture, Vodice, Croatia, 16-21 February 2020

Balogh R. E., Guti, Cs., Ihász, K., Keszte, Sz., Lehocky, I., Urbányi, B., Kovács, B. (2019): Population genetic analysis of wild common carp (*Cyprinus carpio*) populations from Hungary with a newly designed multiplex microsatellite set. Aquaculture Europe, Berlin, Germany, 7-10 October 2019

Kovács, B., Kánainé, S. D., **Balogh R. E., Guti, Cs., Ihász, K., Keszte, Sz., Urbányi, B. (2019):** Microsatellite set for parentage analysis of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Aquaculture Europe, Berlin, Germany, 7-10 October 2019

Balogh R. E., Keszte, Sz., Guti, Cs., Kánainé, S. D., Lehocky, I., Várkonyi, L., Bokor, Z., Bernáth, G., Urbányi, B., Kovács, B. (2019): A novel multiplex microsatellite set and its application on common carp (*Cyprinus carpio*). 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture, Vodice, Croatia, 17-22 February 2019

Reining, M., **Balogh R. E., Balogh, E., Butz, H., Németh, K., Bakos, K., Gazsi, Gy., Kövesi, J., Csepeli, A., Kovács, R., Csenki, Zs., Urbányi, B., Patócs, A. (2016):** In situ hybridization of DLK1 and DIO3 tumor suppressor genes in zebrafish, 8th International Symposium on Fish Endocrinology, Gothenburg, Sweden, 28 June -2 July 2016

7.5. Hazai konferencia kiadványban megjelent közlemények

7.5.1. Előadás

Balogh R. E., Reining, M., Patócs, A. (2017): Hipofízis adenómára jellemző gének feltérképezése és expressziós vizsgálata zebradánióban (*Danio rerio*). Tavaszi Szél Konferenciakötet, <https://doi.org/10.23715/TSZ.2017.1>

7.5.2. Poszter

Kánainé, S. D., Bíró, A., Bokor, Z., Żarski, D., **Balogh R. E.**, Ittész, I., Urbányi, B., Kovács, B. (2021): Új mikroszatellit markerek sügér (*Perca fluviatilis*, Linnaeus, 1758) állományok genetikai vizsgálatához. XLV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2021. szeptember 8-9.

Kánainé, S. D., Péter, D., Bíró, A., **Balogh, R. E.**, Lehoczky, I., Kovács, Gy., Urbányi, B., Kovács, B. (2021): Vietnámi és magyar afrikai harcsa állományok genetikai összehasonlításának előzetes eredményei. XLV. Halászati Tudományos Tanácskozás Poszter Szarvas, 2021. szeptember 8-9.

Balogh, R. E., Ihász, K., Keszte, Sz., Csorbai, B., Szilágyi, G., Varju-Katona, Milán, Urbányi Béla, Kovács Balázs: Előzetes eredmények egy tápra szelektált afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) vonal létrehozása során, poszter: XIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2020.09.23-24, Szarvas

Keszte, Sz., Tóth-Ihász, K., **Balogh, R. E.**, Ferincz, Á., Staszny, Á., Józsa, V., Urbányi, B., Kovács, B. (2019): Magyarországi ezüstkárász (*Carassius auratus gibelio*) populációk genetikai diverzitás vizsgálata. VII. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap, p.52, Gödöllő, Magyarország, 2019.11.22. - 2019.11.22.

Keszte, Sz., Tóth-Ihász, K., **Balogh, R. E.**, Ferincz, Á., Staszny, Á., Bokor, Z., Bernáth, G., Várkonyi, L., Józsa, V., Urbányi, B., Kovács, B. (2019): A balatoni ezüstkárász (*Carassius auratus gibelio*) populációk genetikai diverzitás vizsgálata a mitokondriális genom szekvenciák alapján. XLIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, p. 99-101, Szarvas, Magyarország 2019.05.29-2019.05.30.

Balogh, R. E., Kánainé S. D., Keszte, Sz., Lehoczky, I., Horváth, Á., Guti, Cs., Urbányi, B., Kovács, B. (2018): Süllő (*Sander lucioperca*) állományok genetikai vizsgálata génbank létrehozásához, XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018

Balogh, R. E., Guti, Cs., Kánainé S. D., Keszte, Sz., Urbányi, B., Kovács, B. (2018): Új multiplex mikroszatellit PCR szett kidolgozása a ponty (*Cyprinus carpio*) faj hatékonyabb genetikai vizsgálatához, XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Magyarország 2018.05.30. - 2018.05.31

Keszte, Sz., Kánainé S. D., Stein, R., Mészáros, O., Balogh E., Zellei, Á., Sebestyén, A., **Balogh, R. E.,** Guti, Cs. F., Bokor, Z., Várkonyi, L., Urbányi, B., Kovács, B. (2018): A velencei-vadponty anyaállomány genetikai diverzitás vizsgálata, XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Magyarország 2018.05.30. - 2018.05.31

Keszte, Sz., Kánainé S. D., **Balogh, R. E.,** Fodor, F., Józsa, V., Bokor, Z., Bernáth, G., Várkonyi, L., Urbányi, B., Kovács, B. (2018): Multiplex PCR módszer fejlesztés kősüllő (*Sander volgensis*) genetikai diverzitás vizsgálatához, XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás, p. 52, Szarvas, Magyarország 2018.05.30. - 2018.05.31

Kánainé S. D., Guti, Cs., Keszte, Sz., Lehoczky, I., **Balogh, R. E.,** Urbányi, B., Kovács, B. (2017): Süllő (*Sander lucioperca*) mikroszatellit markerek alkalmazásának tovább fejlesztése: idő- és költséghatékonyság növelése. XLI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Magyarország, 2017

Kánainé S. D., Guti, Cs., Keszte, Sz., Lehoczky, I., **Balogh, R. E.,** Urbányi, B., Kovács, B. (2017): Új multiplex mikroszatellit vizsgálati szett *Sander lucioperca* állományok genetikai analíziséhez. VI. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap, Gödöllő, Magyarország, 2017.11.24

IRODALOMJEGYZÉK

- CHU, E. C. AND TARNAWSKI, A. S.** (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med. Sci. Monit.* **10**, 235–242.
- GALBUSERA, P., VOLCKAERT, F. A. . AND OLLEVIER, F.** (2000). Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture* **185**, 25–42.
- GUERRERO, R. D. AND SHELTON, W. L.** (1974). An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. *Progress. Fish-Cultist* **36**, 56–56.
- HENKEN, A. M., BOON, J. B., CATTELL, B. C. AND LOBEE, H. W. J.** (1987). Differences in growth rate and feed utilization between male and female African catfish , *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture* **63**, 221–232.
- HSU, S. Y., NAKABAYASHI, K., NISHI, S., KUMAGAI, J., KUDO, M., SHERWOOD, O. D. AND HSUEH, A. J. W.** (2002). Activation of Orphan Receptors by the Hormone Relaxin. *Science (80-.)*. **295**, 671–674.
- KIMURA, T., SUZUKI, A., FUJITA, Y., YOMOGIDA, K., LOMELI, H., ASADA, N., IKEUCHI, M., NAGY, A., MAK, T. W. AND NAKANO, T.** (2003). Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development* **130**, 1691–1700.
- KOVÁCS, B.** (2004). Investigation of the sex of African catfish with molecular genetic methods (in Hungarian). *PhD thesis*.
- KUMAGAI, J., HSU, S. Y., MATSUMI, H., ROH, J., FU, P., WADE, J. D., BATHGATE, R. A. D. AND HSUEH, A. J. W.** (2002). INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J. Biol. Chem.* **277**, 31283–31286.
- LIU, S., YAO, Z. AND 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**, 432–438.
- NGUINKAL, J. A., ZOCLANCLOUNON, Y. A. B. AND BRUNNER, R. M.** (2023). Haplotype-resolved assembly of the African catfish (*Clarias gariepinus*) provides insights for semi-terrestrial adaptation of airbreathing catfishes. *bioRxiv* 1–27.
- NGUYEN, D. H. M., PANTHUM, T., PONJARAT, J., LAOPICHENPONG, N., KRAICHAK, E., SINGCHAT, W., AHMAD, S. F., MUANGMAI, N., PEXACHOKNAGUL, S., NA-NAKORN, U., ET AL.** (2021). An investigation of ZZ/ZW and XX/XY sex determination systems in North African catfish (*Clarias gariepinus* , Burchell , 1822). *Front. Genet.* **11**, 1–15.

- OZOUF-COSTAZ, C., TEUGELS, G. G. AND LEGENDRE, M.** (1990). Karyological analysis of three strains of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Clariidae), used in aquaculture. *Aquaculture* **87**, 271–277.
- REARDON, W., GIBBONS, R. J., WINTER, R. M. AND BARAITSER, M.** (1995). Male pseudohermaphroditism in sibs with the α -thalassemiamental retardation (ATR-X) syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **55**, 285–287.
- SANTI, S., GENNOTTE, V., TOGUYENI, A., MÉLARD, C., ANTOINE, N. AND ROUGEOT, C.** (2016). Thermosensitivity of the sex differentiation process in the African catfish, *Clarias gariepinus*: Determination of the thermosensitive period. *Aquaculture* **455**, 73–80.
- SANTI, S., ROUGEOT, C., TOGUYENI, A., GENNOTTE, V. AND KEBE, I.** (2017). Temperature preference and sex differentiation in African catfish, *Clarias gariepinus*. *J. Exp. Zool.* **00**, 28–37.
- SIEGFRIED, K. R.** (2010). In search of determinants: Gene expression during gonadal sex differentiation. *J. Fish Biol.* **76**, 1879–1902.
- STAYTON, C. L., DABOVIC, B., GULISANO, M., GECZ, J., BROCCOLL, V., GIOVANAZZI, S., BOSSOLASCO, M., MONACO, L., RASTAN, S., BONCINELLI, E., ET AL.** (1994). Cloning and characterization of a new human Xq13 gene, encoding a putative helicase. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1957–1964.
- TZUNG, K. W., GOTO, R., SAJU, J. M., SREENIVASAN, R., SAITO, T., ARAI, K., YAMAHA, E., HOSSAIN, M. S., CALVERT, M. E. K. AND ORBÁN, L.** (2015). Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem Cell Reports* **4**, 61–73.
- VÁRADI, L., BENKÓ, I., VARGA, J. AND HORVÁTH, L.** (1999). Induction of diploid gynogenesis using interspecific sperm and production of tetraploids in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822). *Aquaculture* **173**, 401–411.
- VILLARD, L., LOSSI, A. M., CARDOSO, C., PROUD, V., CHIARONI, P., COLLEAUX, L., SCHWARTZ, C. AND FONTÉS, M.** (1997). Determination of the genomic structure of the XNP/ATRX gene encoding a potential zinc finger helicase. *Genomics* **43**, 149–155.
- YE, D., ZHU, L., ZHANG, Q., XIONG, F., WANG, H., WANG, X. AND HE, M.** (2019). Abundance of early embryonic primordial germ cells promotes zebrafish female differentiation as revealed by lifetime labeling of germline. *Mar. Biotechnol.* **21**, 217–228.
- YIN, Y. AND SHEN, W. H.** (2008). PTEN: A new guardian of the genome. *Oncogene* **27**, 5443–5453.