



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2024. november 20.

Egy új, átlátszó zebradánió vonal állományának kialakítása és összehasonlító jellemzése

Propagation and characterization of a new, transparent zebrafish line

Készítette:

Cseresznyés Ferenc
IWPK2J
Mezőgazdasági Mérnök Szak,
harmadik évfolyam
Nappali tagozat
Georgikon Campus

Témavezető:

Dr. Orbán László, tudományos tanácsadó
Dr. Szeverényi Ildikó, szenior kutató

Mentorok:

Szabó Olivér Máté és Hirth Mirella

Tanszék/Intézet:

Alkalmazott Halbiológiai Tanszék
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Georgikon Campus
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi Szekció
Keszthely**

2024.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés és célkitűzés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A zebradánio bemutatása	6
2.1.1 A faj általános jellemzése	6
2.1.2 A zebradánio egyedfejlődése	7
2.2. A gerincesek ivarát kialakító mechanizmusok	8
2.3. A zebradánio ivarát meghatározó folyamatok	9
2.4. A zebradánio ivarszerv differenciálódásának folyamata	10
2.5. A hőmérséklet hatása az ivar kialakulására	11
2.6. Transzgénikus vonalak az ivarszerv fejlődésének monitorozására	11
3. Anyag és módszer	14
3.1. A laboratóriumban használt halak származása	14
3.2. A halak tartási körülményei	14
3.3. A halak szaporítása és az ivadékok gondozása	15
3.4. A korai elhullások követése	17
3.5. A transzgénikus egyedek mikroszkópos szexálása	17
3.6. A <i>ddx4:egfp</i> és a <i>gáspár</i> vonal egyedei testméretének és testtömegének összehasonlítása	18
3.7. A hőkezelések körülményei	19
3.8. Genomi DNS izolálása	20
3.9. A transzgén kópiaszámának kimutatása PCR-alapú genotipizálással	20
3.10. Statisztikai analízis	21
4. Eredmények és értékelésük	22
4.1 A pigmentált transzgénikus családok több ikrát produkáltak a pigmenthiányos családoknál	22

4.2 A pigmentált egyedek túlélési aránya három hetes korban szignifikánsan magasabb volt a pigmenthiányosokénál	23
4.3 A tartási sűrűség meghatározó lehet a túlélés mértékére	26
4.4 A <i>ddx4:egfp</i> egyedek nem mutattak szignifikánsan nagyobb növekedési erélyt, mint a <i>gáspár</i> egyedek	28
4.5 A hőkezelt családnál jelentős ivararány eltolódást tudtam kimutatni a hímek irányába	30
4.6 Új <i>gáspár</i> egyedek azonosítása az állomány bővítése céljából.....	31
4.7 Hozzájárulások	32
5. Limitációk	33
5.1. A túlélési arány összehasonlítását hátráltató tényezők.....	33
5.2. A vizsgált halak ivarát csak három hónapos korban tudjuk meghatározni	33
5.3. A hőkezelésekre használt inkubátor befogadási képessége	33
6. Következtetések és javaslatok	34
7. Összefoglalás	35
Köszönetnyilvánítás	36
8. Irodalomjegyzék	37
9. Mellékletek	39

Rövidítések jegyzéke

AB	egy házasított zebradánió vonal
<i>cas</i>	<i>casper</i> mutáns zebradánió vonal
<i>ddx4</i>	a <i>Dead-box helicase 4</i> fehérjét kódoló gén
<i>dmrt1</i>	' <i>doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i> ' gén
dpf	'days post-fertilization', azaz az egyedek kora napokban megadva
Egfp	'Enhanced Green fluorescent protein', azaz feljavított zöld fluoreszcens fehérje
<i>egfp</i>	az Egfp fehérjét kódoló gén
<i>gpr</i>	<i>gáspár</i> zebradánió vonal, mely pigmenthiányos és tartalmazza a <i>tg{ddx4:egfp}</i> transzgént
Gfp	'Green fluorescent protein', azaz zöld fluoreszcens fehérje
GSD	'Genetic Sex Determination', azaz genetikailag meghatározott ivar
HK	hőkezelt
hpf	'hours post-fertilization', azaz az egyedek kora órákban megadva
PCR	'Polymerase Chain Reaction', azaz polimeráz láncreakció
PGC	'Primordial Germ Cell', azaz ivari őscsírsejt
SD	'Sex Determination', azaz az ivart meghatározó folyamatok kezdete
<i>tg{ddx4:egfp}</i>	az ivarszerveket jelölő transzgénikus konstrukció elnevezése
TSD	'Temperature-based Sex Determination', azaz hőmérséklet által meghatározott ivar

1. Bevezetés és célkitűzés

Munkám során egy gyakran használt gerinces állatot, a zebradániót (*Danio rerio* Hamilton 1822) használtam modellként. Ennek a pontyfélék családjába tartozó halfajnak az őshazája Dél- és Délkelet-Ázsia, napjainkra azonban világszerte elterjedt, mivel megfelelő alanyként szolgál számos kutatáshoz. Élőhelyét tekintve édesvízi faj, mely lárvákkal és apró rákokkal táplálkozik, testmérete pedig kifejlett korban elérheti az 5-6 cm-t is, ezáltal kisebb helyigénnyel rendelkezik, mint az emlős gerinces modellek. Ezen felül más tulajdonságaiban is kiemelkedő, mint például, hogy hamar eléri az ivarérett kort és egy szülőpár akár több száz egyedet is képes létre hozni egy szaporításból és évente több alkalommal is szaporítható. Ennek köszönhetően rengeteg utódon nyomon követhetőek és megfigyelhetőek az esetleges változások, mint a kutatásom alapjául szolgáló ivararány eltolódás, melyet több tényező is kiválthat. A legfontosabb közülük talán a hőmérséklet, amely emelkedésével növekszik a populációban a hímek aránya. Ez történhet természetes körülmények között, és kiváltható mesterségesen, hőkezeléssel laboratóriumi körülmények között. A *tg{ddx4:egfp}* transzgénikus riporter vonalban (Krøvel és Olsen, 2002; Krøvel és Olsen, 2004) az ivar korai meghatározására a feljavított zöld fluoreszcens fehérje (Egfp) jelét használjuk, mert a nőstények petefészkében ez a fehérje sokkal nagyobb mennyiségben termelődik meg, mint a hímek ivarszervében, a herében. Így az előbbi jóval erőteljesebben világít a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat során.

Célkitűzések

Munkám során a céljaim a következők voltak:

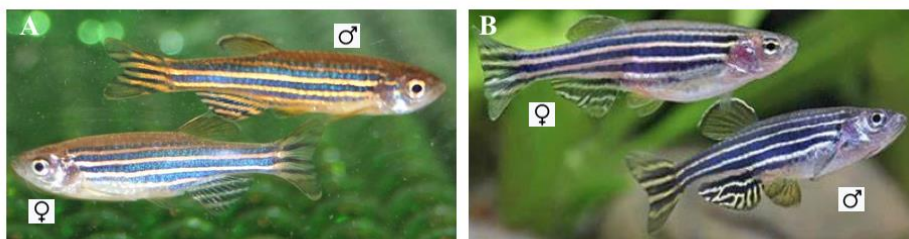
1. Csoportos és páros szaporítások elvégzése a korábban kialakított transzgénikus pigment-mutáns *gáspár* állomány bővítése és a vonal kialakítása céljából.
2. A *gáspár* vonal egyedeinek alapszintű jellemzése a pigmentált *tg{ddx4:egfp}* transzgénikus vonal egyedeivel történő összehasonlítás (pl. szaporasági adatok, az utódok elhullásának mértéke, illetve a növekedési erély) révén.
3. Kísérletek hőkezeléssel történő ivarbillentésre a pigmentált transzgénikus és a *gáspár* vonalakon újabb hőre válaszoló családok azonosítása céljából.
4. További homozigóta *gáspár* egyedek azonosítása PCR alapú genotipizálással.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A zebradánió bemutatása

2.1.1 A faj általános jellemzése

Korunk egyik legnépszerűbb modell organizmusa a zebradánió (*Danio rerio*, Hamilton 1822). A zebradánió a pontyfélék családjába tartozó, kistermetű édesvízi halfaj. A dél-ázsiai, Himalája környéki régiókból származik és megtalálható a pakisztáni, indiai és bangladesi lassú vízfolyásokban. Tápláléka elsősorban különböző rovarok lárváiból és apró rákokból tevődik össze. Felnőtt korban a maximális testméretük 5-6 cm, a jellegzetes megjelenésüket pedig a testükben termelődő pigment sejtek alkotta hosszanti csíkok adják. A vadonból befogott zebradániókat, a magyar származású George Streisinger professzor és kollégái kezdték el az 1970-es évek végén mesterséges körülmények között tartani és szaporítani, és több házasított vonalat alakítottak ki belőle az évtizedek során (Trevarrow és Robison 2004). Ezek egyike az ún. AB, mely talán a leggyakrabban használt zebradánió vonalak egyike. A házasított vonalakban fellépő spontán mutációk és a random és/vagy célzott genetikai beavatkozások eredményeként mára már mutáns és transzgénikus zebradánió vonalak százai állnak a kutatók rendelkezésére (Choi és mtsai. 2021; Hawkins és Wingert, 2023). Laborunkban ezek közül három mutáns és három transzgénikus vonal áll rendelkezésünkre. A zebradánió laboratóriumi körülmények között 4-6 hónapos korban válik ivaréretté, ekkorra alakul ki az ivari dimorfizmus (**1. ábra**), egy éven át szaporodik és két-három évig képes élni.



1. ábra: A zebradánió ivari dimorfizmusa csak felnőttkorban nyilvánul meg.

Az ivarérett ikrások hasa kerekded, míg a hímek torpedó formájúak (A, B). Az utóbbiak színe sárgásabb (A), de ezt a táplálék és a tartási körülmények is befolyásolhatják. (Forrás: Zala, S., Vetmed. Univ. Vienna; www.akvaristalexikon.hu)

2.1.2 A zebradánió egyedfejlődése

A zebradániók szaporodása külső megtermékenyítéssel történik. A nőtényekben fejlődő petesejt (ikra) és a hímekben fejlődő spermium (haltej) a halak testfalán kívül egyesül és termékenyül meg. Az utódok száma akár több száz egyed is lehet szülőpáronként, de ezt több tényező befolyásolhatja: függ az ikrás és a tejes termékenyítő képességétől, valamint a biotikus és az abiotikus környezeti tényezőktől is. Utóbbiak közül egyik legfontosabb a hőmérséklet, melynek ideális értéke körülbelül 27-28 °C-nál van.

A zebradánió az egyedfejlődés során átalakulások során megy keresztül, ami az első sejtosztódásoktól az ivaréreségig tart **(2. ábra)**. Az egyedfejlődése négy életszakaszra osztható, melyek a következők: embrió, lárva, növendék és felnőtt kor (Kimmel és mtsai, 1995). Ezeknek az életszakaszoknak olyan jellemzőik vannak, amik lehetővé teszik az egymástól való elkülönítésüket.

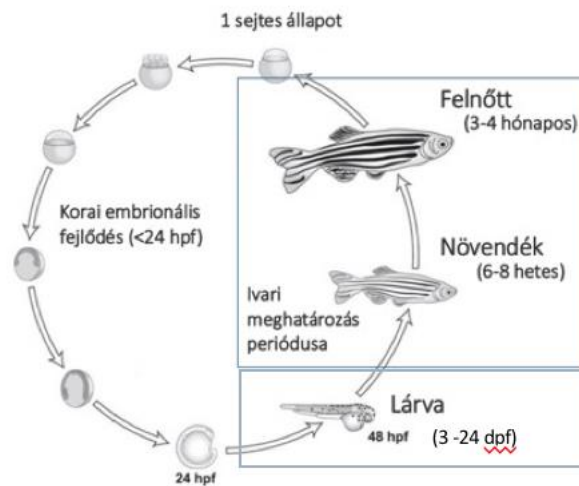
1) Embrió: A fejlődésük első szakasza az embrió állapot, mely a megtermékenyüléstől 72 órás (angolul: hours post-fertilization, rövidítve hpf) korig tart. Az embrió kezdetben átlátszó ikra burokokban fejlődik, amely védi az első pár nap során a kedvezőtlen külső behatásoktól. Ebben az állapotban a legnagyobb az elhullás aránya természetes és mesterséges körülmények között is, mert az egyedek ilyenkor a legérzékenyebbek az őket érő hatásokra. Az ikráról 2-3 napos korában válik le az ikraburok és kel ki belőle az embrió, ezután elkezd mozogni és reagálni a külső ingerekre.

2) Lárva: Ebben a 72 hpf-től 30 napig (angolul: days post-fertilization, rövidítve dpf) tartó szakaszban már intenzívebb az egyedek mozgása. Nagyjából 4-5 napos korukban kinyílik a szájuk, és elkezdenek táplálkozni. Ebben a szakaszban még nem meghatározható az egyedek ivara, mert a kialakuló ivarszerv átalakuláson mehet át ebben az időszakban és még nem vehetőek jól ki az adott ivarra jellemző fenotípusos jegyek sem.

3) Növendék: Ebben az időszakban, amely körülbelül 90 dpf korig tart, az egyedek egyre hasonlóbba válnak a felnőttekhez. Ebben az időszakban már javában zajlik az ivari differenciálódás, és kialakul a végleges pikkelymintázat. Két hónapos kortól (60 dpf) az erősödő ivari dimorfizmusnak köszönhetően már gyakran szabad szemmel is meghatározható a halak ivara, mivel a hímek sárgás, torpedó alakú, hosszúkás testfelépítésűek, míg a nőtények inkább kerekded, zömökebb testalkatúak. Az ivarérett kort azonban többnyire csak később, felnőtt korban érik el.

4) Felnőtt kor: Ebben a korban az egyedek küllemét tekintve már nem történik számottevő változás, ugyanakkor teljesen ivaréretté válnak, ez optimális tartási körülmények között 120-

180 dpf periódusban következnek be. A növekedési intenzitása drasztikusan lelassul, és megfelelő körülmények között akár 2-3 évig is élélhetne



2. ábra: A zebradánió egyedfejlődése négy szakaszra osztható: embrionális, lárva kori, növendék és felnőtt kor. Az embrionális fejlődés az első három nap során játszódik le. A lárvák még nem rendelkeznek a végleges testformával és pikkelyezettséggel. Ezt a hatodik hétre érik el, ahonnan növendéknek nevezzük őket. A növendék színe, pikkelyezettsége végleges, de hiányoznak a másodlagos szexuális jelek. Az ivarérett, szaporodásra képes 3-4. hónapos egyedeket tekintjük felnőttnek. (Forrás: Aluru, 2017, Hirt Mirella által módosítva)

2.2. A gerincesek ivarát kialakító mechanizmusok

Azt a folyamatot, melynek során egy egyednek eldől a neme, ivari determinációnak vagy ivari meghatározásnak (angolul: 'Sex Determination', rövidítve SD) nevezzük. Tanulmányozása azért fontos, mert jobb megismerése révén részletesebb ismereteket szerezhethetünk a fajok szaporodás biológiájáról, és ezt a tudást számos területen kamatoztathatjuk.

A kutatók számos SD mechanizmust találtak a különböző fajoknál, de bőven vannak olyan fajok – főleg a halak között – amelyeknél nem ismerjük az ivar kialakulását meghatározó és vezérlő folyamatokat (Devlin és Nagahama, 2002). A két ivar kialakulása elengedhetetlen a gerinces fajok szaporodásához és a fenntartásához, ezért fontos, hogy foglalkozzunk velük. Az ivarok kialakulásának vizsgálata segíthet ez emberekben lévő ehhez köthető betegségek megismerésében is, emellett gazdasági jelentőséggel is bír. A gazdaságilag fontos halaknál azért érdemes vizsgálnunk az ivarkialakító folyamatokat, mivel számos halfaj esetén nagy különbséget tapasztaltak a növekedésben és a betegségekre való ellenállóképességben (Campbell és mtsai., 2021).

Az emlősök túlnyomó többségében, így az emberben is az ivart elsődlegesen genetikai faktorok határozzák meg (angolul: 'Genetic Sex Determination', rövidítve GSD). Ezt a feladatot konkrétan az XY ivari kromoszómális rendszer végzi el. Az ivart az határozza meg, hogy az apától milyen ivari kromoszómát örökölnék az utódok, mivel az anya csak X ivari kromoszómát képes továbbadni utódainak. Ha az utód Y kromoszómát örököl az apától, akkor szintén hím (XY) lesz, ellenkező esetben nőstény (XX) (McLaren, 1998; Wilhelm és mtsai., 2007).

A madaraknál az ivart szintén genetikai tényezők határozzák meg, viszont az emlősökkel ellentétben a tojók, azaz a nőstények a heterogametikus ivar (ZW), míg a kakasok (hímek) a homogametikus ivar (ZZ) (Warner és Shine, 2008). A herék kialakulásához a *DMRT1* gén termékének adott koncentrációja szükséges, mert annak aktivitásának eredményeként fejlődik ki a hím ivarszerv. Érdekes, hogy itt az ivart a sejtek autonóm módon határozzák meg.

A hüllők esetében nem mindegyik fajnál GSD által történik az ivarok kialakulása, mivel egyes csoportokban hőmérséklet-függő ivari meghatározás (angolul 'Temperature-based Sex Determination', azaz TSD) vette át ezt a szerepet (Warner és Shine, 2008). A *DMRT1* ivari gén viszont nem csak a madaraknál, hanem más gerinceseknél is a segítségünkre lehet az ivar meghatározásában.

A halak 34 ezer fajában a fenti SD mechanizmusok mindegyike megfigyelhető, sőt azok kombinációi és komplex mechanizmusok is előfordulhatnak (Devlin és Nagahama, 2002). Vannak olyan hibrid fajok, ahol mindkét nem heterogametikus, más fajoknál pedig nincsen szükség ivari kromoszómapárra. Leírtak olyan fajokat is, amelynél kialakulhat hermafroditizmus, ebben helyzetben viszont nincsen klasszikus ivar meghatározás (Avisé és Mank, 2009). Így a fenti gerinces kládokhoz képest csoport szinten bonyolultabb az ivarmeghatározás. Halakban azért is nehéz az ivart kialakító tényezők vizsgálata, mivel a környezeti és szociális tényezők gyakran másodlagosan részt vesznek ennek befolyásolásában (Devlin és Nagahama, 2002).

2.3. A zebradánio ivarát meghatározó folyamatok

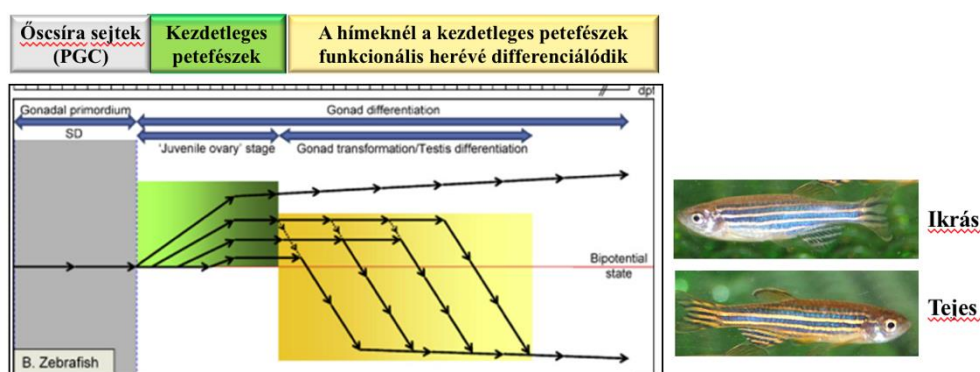
A zebradánó diploid faj, genomja 25 pár kromoszómát (2n) tartalmaz. A vadon élő zebradániókban a hímek – a madarakhoz hasonlóan – homogametikus ivari kromoszómapárral (ZZ) rendelkeznek, míg a nőstények heterogametikussal (ZW). A házasított vonalak közül több vonalban, így például az általunk használt AB-ben is, a házasítás során az ivari kromoszómapár feltételezéseink szerint elveszítette elsődleges funkcióját, ennek következményeként poligénes

ivarmeghatározási rendszer jött létre (Liew és Orbán, 2014). Ebben az ivart a genomban szétszóródva elhelyezkedő ismeretlen számú gén terméke együttesen határozza meg az ivart. Emellett az eddigi kutatások és megfigyeléseknek köszönhetően tudjuk, hogy a környezeti tényezők és a tartási körülmények is befolyásolhatják az ivar kialakulását (Von Hofsten and Olsson, 2004; Tzung és mtsai., 2015).

2.4. A zebradánió ivarszerv differenciálódásának folyamata

Az ivarszerv kialakulása egy bonyolult folyamat a zebradánióknál mivel az egyedek nagy többségénél - a végső ivartól függetlenül - növendék állapotban egy kezdetleges petefészkek alakul ki, mely később mindkét ivarszerv irányába fejlődhet (Sreenivasan és mtsai., 2014). A nőtényeknél ez a kezdetleges ivarszerv az idő múltával tovább fejlődik végleges funkcionális petefészkekké, és ivaréretté válik. A hímeknél viszont egy drasztikus átalakulási folyamat zajlik le, mely során a kezdetleges petefészkek 2-3 hét alatt átalakul funkcionális herévé (3. ábra) (Sreenivasan és mtsai., 2014).

Ez folyamat nem egyidőben zajlik le az egyedekben, és eltérő idő intervallum alatt is játszódik le. Eleinte az volt a feltételezés, hogy ez a folyamat minden egyedben végbe megy, de ma már úgy gondoljuk, hogy egyes zebradániókban nem a kezdetleges petefészkekből alakul ki a hím ivarszerv, hanem egyből egy kezdetleges here alakul ki az egyedekben, amely később funkcionális ivarszervé fejlődik, ahogy azt látjuk a kezdetleges petefészkek esetében is (Orbán László személyes közlése).



3. ábra: A zebradánió ivarának kialakulása a laboratóriumi vonalakban.

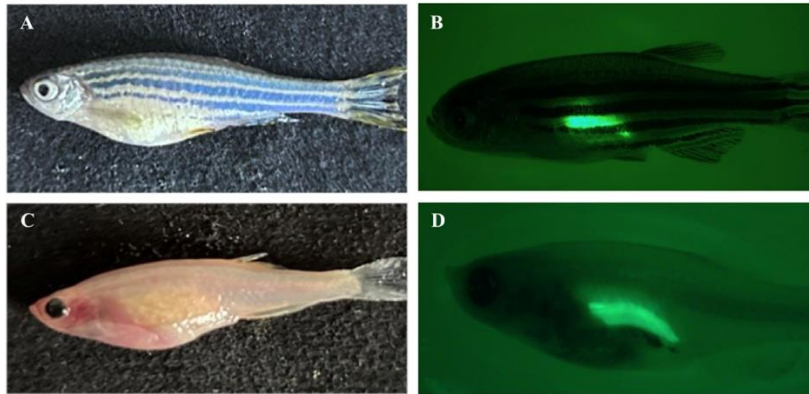
A zebradánió házasítása során az ivari kromoszómapár elvesztése következményeként poligénus ivarmeghatározás alakult ki. Az egyedek többségében az ősi varsejtekből egy kezdetleges petefészkek képződik, amely jelentős átalakuláson megy végbe a későbbi hímekben. Ez a folyamat egyedenként változó ritmusban zajlik le. (Forrás: Orbán, Sreenivasan és Olsson, 2009; Fotók: Zala, S., Vetmed. Univ. Vienna)

2.5. A hőmérséklet hatása az ivar kialakulására

A zebradániókat a laborban 27-28 °C-os vízben tartjuk, mivel ez a legideálisabb víz hőmérséklet számukra. A hőmérséklet 6-8 °C-os emelésével az ivadékok ivararányát a hímek felé lehet tolni (Ribas és mtsai., 2017). Ez a folyamat nem csak mesterséges körülmények között játszódhat le, hiszen természetes vizek felmelegedése miatt is eltolódhat a populációk ivararánya. Ez annak köszönhető, hogy a stressz hatása általában a hímek kialakulásának kedvez, mivel a here és hímvarsejtek előállításához kevesebb energia szükséges, mint a petefészekhez és a petesejtekéhez, mert utóbbiaknak jóval nagyobb az energia szükségletük. Így a környezeti tényezők (pl. magas hőmérséklet) egyes esetekben másodlagosan átírhatják a GSD által diktált ivararányt.

2.6. Transzgénikus vonalak az ivarszerv fejlődésének monitorozására

A fentebb részletezett folyamatot nagyon nehéz lenne nyomon követni transzgénikus riporter vonalak nélkül. A laboratóriumunkban mi is használunk ilyen vonalat, amelynek genomjába a *tg{ddx4:egfp}* (korábban *tg{vasa:egfp}*) jelzőgénés konstrukciót ültették bele (Krøvel és Olsen 2004; 2002). Innentől ezt a vonalat pigmentált transzgénikus vonalnak is nevezzük). Ez a konstrukció már a korai őscsira sejtekben ('Primordial germ cells', azaz PGC-k) megnyilvánul, amelyek az embrióban már az első napon fellelhetők. Az idő múlásával ezek a sejtek elkezdenek az ivarszerv kialakulási pontjához vándorolni. Egyedenként eltérő az az idő, ami alatt végbe megy ez a folyamat, amíg kialakul a korai ivarszerv. A jelzőgénés konstrukció a zöld fluoreszcens fehérje ('Green fluorescent protein', azaz Gfp) génjét tartalmazza, melynek fehérjeterméke kék fénnel megvilágítva élénk zölden világít. Ez a jelzőfehérje a petefészekben nagy mennyiségben, míg a herében alig-alig termelődik, emiatt a petefészek sokkal intenzívebb világít, mint a here (**4. ábra**).



4. ábra: A *tg{ddx4:egfp}* zebradánió vonal az ivarszerv kutatás fontos eszköze

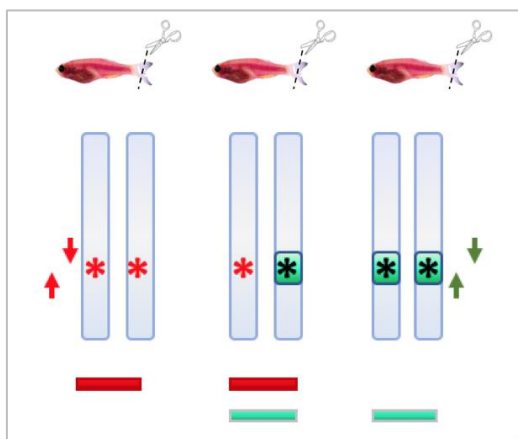
A pigmentált halakban jelen lévő melanofórák (fekete) és iridofórák (ezüst) leárnyékolják a petefészekből jövő, ivarspecifikusan expresszáldó fluoreszcens jelet (A-B). Ezeknek a pigmenteknek a hiányában a petesejtek már a test falon át is jól láthatók a *gáspár* ikrásban (C), a petesejtekben felhalmozódó fluoreszcens fehérje tökéletesen kirajzolja a petefészek formáját (D). (Saját képek)

A vad típusú zebradániók oldalán hosszanti csíkok figyelhetők meg, melyek külső megjelenéséért három pigment felelős. A fekete pigment az oldalán lévő csíkokért, a sárga pigment pedig a farokúszó előtti sárgás foltért, a reflektív pigment pedig a fényes szürkés árnyalatért. Ezek a pigmentek az ivarszervek által termelt Gfp megfigyelését zavarhatják. Ezen probléma megoldására hallgatótársam, Szabó Olivér Máté a témavezetőim irányításával létrehozott egy olyan vonalat, amelynek egyedei hordozzák a genomjukban a *ddx4:egpf* transzgént, azonban a fekete és reflektív pigmentek nem termelődnek a szervezetükben. Ezen pigment-mutáns transzgénikus vonal segítségével az ivarszervben zajló folyamatokat lényegesen részletesebben lehet megfigyelni. A vonal a *gáspár* (a továbbiakban: pigmentben szegény transzgénikus vonal) nevet kapta (Szabó és mtsai, 2023).

A *gáspár* vonal létrehozásához egy dupla pigment-mutáns vonalat (*casper; cas*) alkalmaztak, amelyben a fekete és reflektív pigmentek nem termelődnek (White és mtsai. 2008). A *tg{ddx4:egfp}* transzgént keresztezésekkel juttatták be az áttetsző *casper* zebradánióba. Mivel mindkét pigment mutáció recesszív módon öröklődik, ezért kidolgoztak egy többlépcsős szelekciós eljárást, ami kezdetben három generációt, majd a továbbfejlesztés során már csak kettőt igényelt. A szelekció felgyorsítása céljából újra-szekvenáltatták a fluoreszcens jel alapján *gáspár*-ként azonosított egyik egyed genomját. A szekvenálás egy 4 kb (kilobázis, ~4000 bázispár) hosszúságú deléciót tárt fel a transzgén integrálódása helyén a hármas kromoszómán. Erre a szakaszra tervezett PCR primerek felhasználásával sikerült a homozigóta és hemizigóta egyedeket azonosítani PCR-alapú tesztekkel (5. ábra).

Az én első feladatomban ebben a projektben az volt, hogy elvégezzem a *gáspár* (*gpr*) vonal összehasonlító jellemzését. Ennek során szülőpárokat és csoportokat kialakítva szaporítottam a pigmentált transzgénikus és a *gáspár* vonalak egyedeit. A szaporításokból származó ikraszámokat és túléléseket összehasonlítani, arra kérdésre igyekeztem válaszolni, hogy van-e különbség a két vonal egyedeinek robusztussága között. Ezek mellett elvégeztem a vonalak átlagolt testméretének és testtömegének összehasonlító elemzését is.

A feladatomban a *gáspár* tenyész állomány kialakítása volt új egyedek létrehozásával és az azokban levő transzgén kópiaszámának (hemi- vagy homozigóta) PCR-alapú meghatározásával. Szabó Olivér Máté hallgatótársam ugyanis korábban nem végezte el az összes kérdéses egyed tesztelését, így ezzel tudtam hozzájárulni a vonal kialakításához.



5. ábra: A $tg\{ddx4:egfp\}$ transzgén kópiaszáma a farokúszóból izolált DNS minta PCR-analízisével meghatározható. A transzgénmentes *casper* egyedekben nincs transzgén, ezért a 3. kromoszómára tervezett primerekkel (piros nyilak) felsokszorozható egy rövid termék (piros csík), de az *egfp* primerekkel (zöld nyilak) viszont nem. A hemizigóta egyedek (középen) csak egy kópiában hordozzák a transzgént, így mindkét primer párral végzett reakció ad terméket. A homozigóta egyedekben csak az *egfp* primerek adnak terméket (zöld csík), mert nincs a genomjukban vad típusú templát, mivel deletálódott a transzgén beintegrálódása során. (Forrás: Szabó, 2023)

3. Anyag és módszer

3.1. A laboratóriumban használt halak származása

A laborunkban jelen lévő AB vonalat két forrásból szereztük be: Dr. Varga Máté (ELTE) és Dr. Csenki-Bakos Zsolt (MATE) laborjaiból. A *tg{ddx4:egfp}* vonalat és a *gáspár* vonal létrehozásához szintén szükséges *casper* mutánsokat egyaránt Dr. Csenki-Bakos Zsolt gödöllői zebradánió laboratóriumából kaptuk.

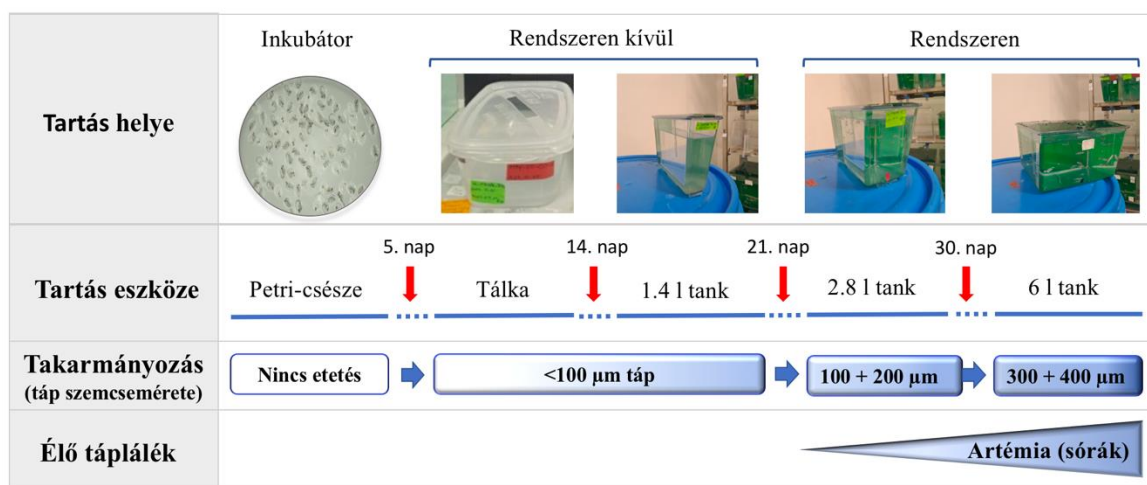
3.2. A halak tartási körülményei

A halakat a laboratóriumban a zebradánió tartás nemzetközileg elfogadott, sztenderd protokolljai alapján tartjuk és neveljük (Nusslein-Volhard és Dahm, 2002). A halak tartására létrehozott szobában 28 °C hőmérsékletet, 70%-os páratartalmat állítottunk be, valamint 14 óra világos – 10 óra sötét fényciklust alakítottunk ki, ami a faj számára a legmegfelelőbb. A vonalakat az Aquatic Housing cég által gyártott zárt, recirkulációs rendszeren tartottuk 1.4, 2.8, 6 és 9 literes tartályokban, a méretüktől függő egyedsűrűségben (**6. ábra**). A lárvák esetében 50-60 egyed/liter, a fiatal növények esetében 7-11 egyed/liter, míg az idősebb (1.5-4 hónapos) állományok esetében 5-6 egyed/liter sűrűséget alkalmaztunk. A rendszeren az elhasznált víz több tisztítási lépcsőn keresztül jut vissza a tartályokba, ezek között van mechanikai, kémiai és biológiai szűrés is.



6. ábra: Az Aquaneering recirkulációs haltartó rendszer. A rendszerben a víz folyamatosan keringve tisztul meg több lépésben. A rendszer alján mechanikai és biológiai szűrésen, a rendszer tetején pedig UV fertőtlenítésen megy át a keringetett víz. A rendszeren láthatóak a különböző térfogatú tartályok, amelyekben a különböző méretű halak csoportjait tartjuk (Fotó: Marton Csaba).

A halak takarmányozása során szintén a korcsoporthoz és az egyedsűrűséghez igazodtunk. Kétféle takarmánnyal etettük a halakat: granulált tápokkal és élő sórákkal (*Artemia salina*). A lárvákat még kizárólag táppal etettük, mivel ilyen fiatal korban még nem képesek felvenni a rendelkezésünkre álló élő takarmányt. A növekedés során változtattuk a tápok szemcseméretét, illetve a mennyiségét is, igazodva az adott korcsoport szájnyílásának méretéhez és a biológiai igényeihez (7. ábra). Az élő tápot egy hónapos korukban kezdtük el adagolni a halaknak.



7. ábra: A halak tartása és takarmányozása. A halak az első három hetet a rendszeren kívül töltötték, a vizüket két naponta cseréltük. Az edények és a táp méretét a növekedő halak méretéhez igazítottuk. Három hetes kortól kaptak élő táplálékot. (Saját ábra)

3.3. A halak szaporítása és az ivadékok gondozása

A kutatásom során számos esetben kellett elvégeznünk szülőpáros és csoportos szaporításokat az adott kísérleti körülményhez igazodva. A halakat az erre a célra kialakított edényekben szaporítottuk (8. ábra). A szaporítások során a környezet gazdagítására törekedtünk, hogy ezáltal is indukáljuk a halak ívását. Kavicsmintájú aljzatot imitáló lapot tettünk az ivatókádák alá, valamint műnövényt helyeztünk az edények belsejébe. Az ivatókádákat egy trópusi környezetet utánozó takaró fallal zártuk körbe, annak érdekében, hogy a körülöttük lévő mozgás ne zavarja a halakat a szaporodásban. A szaporítás során nagy szerepe van továbbá a fénynek is, ezért a szobában lévő fényidőztető segítségével a mennyezeti lámpák reggeltől kezdve fokozatosan kapcsolódtak be, mivel ez az inger is kiemelkedően fontos az íváshoz. Amennyiben a halak nem adták le az ikrát, az edénybe az ivatás kezdetétől mért egy óra elteltével hideg vizet

öntöttünk. Ezzel az eljárással a trópusi esőt igyekeztünk imitálni, ami természetes körülmények között ugyancsak hozzájárul az ívási inger kiváltásához.

A szaporításból származó ikrákat felfogtuk egy teaszűrő segítségével, majd a rendszerről származó vízzel belemostuk az ikrákat a szűrőről a Petri-csészékbe (**8. ábra**). Következő lépésként eltávolítottuk a meg nem termékenyült ikrákat, az elpusztult embriókat és az esetleges szennyeződések, majd szétválogattuk az ikrákat. Általában 50 db-ot raktunk egy Petri-csészébe, mert az előzetes tapasztalatok azt mutatták, hogy ennél az egyedszámnál még nem lesz az egyedsűrűség miatt számottevő elhullás. A csészéket az első öt nap során 28 °C-os inkubátorban tartottuk.

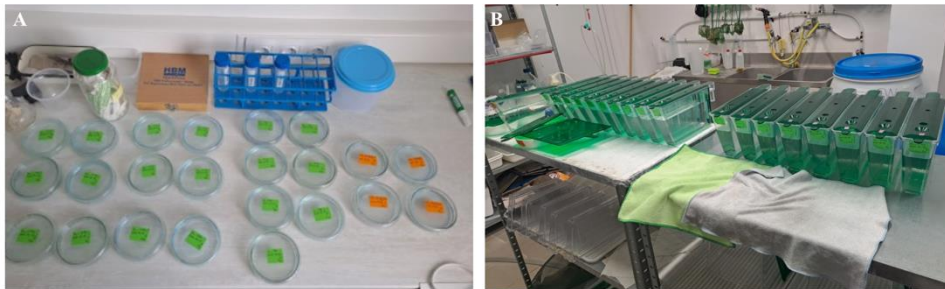


8. ábra: A halak szaporítása és az ivadékok gondozásának bemutatása. A) A szaporító tartályokba helyezett válaszfallal elválasztott tejes és ikrás környezetének gazdagítása céljából műnövényt és kavicsaljszatot helyeztünk. B) Az ikrák családonkénti begyűjtéséhez használt szűrők és feliratozott Petri csészék előkészítése. C-D) Ikrák leszűrése és metilénkéket tartalmazó vízzel történő fertőtlenítése. (Fotó: saját)

Az általános protokoll alapján naponta ellenőriztük az embriókat, eltávolítottuk az életképtelen egyedeket, a kelést követően pedig az ikraburkokat. Az inkubátorban töltött idejük során többször lecseréltük az embriókról, illetve lárvákról a vizüket. Az egyedek ebben a korban még csak a szikzacskóban lévő tápanyagokkal maradnak életben. Amint elérték az öt napos kort átkerültek a zebradániós szobába, ahol már egy nagyobb edényben tartottuk őket. A takarmányozásuk is ilyenkor kezdődik, <100 μ m szemcseméretű táppal. A növekedésükkel párhuzamosan változtatjuk a tartásuk helyét és takarmány szemcseméretét. A rendszerre egy hónapos korban kerülnek, egyedszámtól függően 1,4 vagy 2,8 literes tartályokba. Az élő táppal történő etetést is ebben a korban kezdjük meg.

3.4. A korai elhullások követése

A vonalak összehasonlítása során vizsgáltuk, hogy a *tg{ddx4:egfp}* vonal és a *gáspár* vonal között milyen különbségek fedezhetők fel a szaporaságban és az utódok elhullásában. Ezekhez a kísérleteimhez csoportokat és párokat is szaporítottam mindkét vonal esetében. Ezek a szaporítások és az utódok begyűjtése a fentiekben leírtak szerint történtek, a standard protokoll használatával. A szaporításból származó utódokat leszámoltam és ezt követően kezdtem el megfigyelni az elhullást a vonalak esetében (**9. ábra**). Az első öt nap során minden nap feljegyeztem az elhullást, ezt követően pedig a rendszerre való felkerülésükkor ellenőriztem az életben maradt egyedek számát. Ezeket a kísérleteket több csoporton és családon is elvégeztem, hogy meghatározzam a különbséget a két vonal között. A leadott ikrá mennyiségéről, valamint az elhullásokról az Excel programot felhasználva készítettem statisztikai elemzéseket.



9. ábra: A korai elhullások figyeléséhez kialakított csoportok. (A) A frissen begyűjtött ikrákból 50-50 db-ot külön Petri csészébe helyeztünk, amelynek az oldalára került a születési dátum, családnév és az A/B/C jel egyike. Az edény tetején a családra jellemző színkód látható (zöld, pigmentált, illetve narancssárga a pigmenthiányos vonalat jelzi). (B) A rendszerre kerülés előtt a növénydékek az asztalon fejlődnek. (Saját fotók)

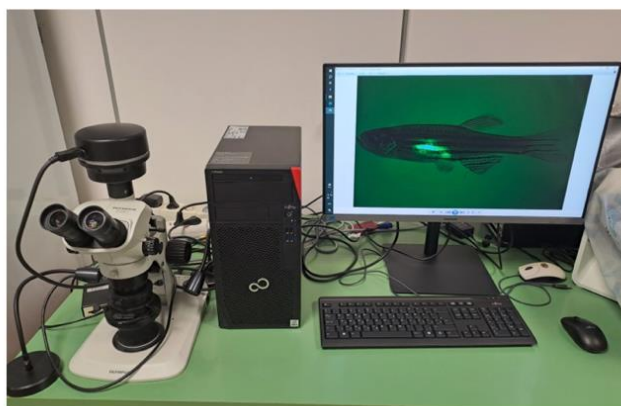
3.5. A transzgénikus egyedek mikroszkópos szexálása

A kifejlett zebradánióknál az ivari dimorfizmusnak köszönhetően jól elkülöníthetők a nőstények a hímeiktől. Az általunk használt transzgénikus vonalban ugyanakkor az ivar fiatalabb korban is meghatározható, mivel az ikrások petefészkében sokkal nagyobb mennyiségben termelődik a fluoreszcens fehérje, mely kék fénnel megvilágítva láthatóvá tehető (Wang és mtsai., 2007).

Erre a célra egy Olympus SZF61 típusú sztereomikroszkópot használtunk, amelyre BLS Kft. fluoreszcens adapterét szereltük fel. A mikroszkópot vezérlő számítógép nagyfelbontású

monitoron az elkábított élő egyedekben is jól megfigyelhető volt az Egfp megnyilvánulása az ivarszervben (**10. ábra**).

A szexálást altatásban lévő halakon végeztük, amihez 325 mg/L koncentrációjú MS-222 oldatot használtuk. Az altatáshoz egy úgynevezett altató tálat használtunk. A halakat nem egyesével, hanem egyszerre 3-4 db-ot tettünk egy háló segítségével az altatóvízbe. Abban addig tartottuk bent az egyedek amíg a mozgásuk lelassult és elkezdtek az oldalukra billenni. Ezt követően áthelyeztük a halakat egy óraüvegre, amivel a mikroszkóp alá helyeztük a vizsgálat idejére az egyedeket. Mikor elkészült a kép, akkor egy élesztő táliba kerültek, melynek vize már nem tartalmazott altatót, ebben a halak magukhoz tértek, mielőtt visszakerültek a rendszerre.



10. ábra: A transzgénikus egyedek mikroszkóp alapú ivarmeghatározása. A kép bal oldalán a speciális feltéttel és digitális kamerával ellátott sztereómikroszkóp, középen az azt vezérlő számítógép, míg a jobb szélén a monitor látható. (Fotó: saját)

3.6. A $tg\{ddx4:egfp\}$ és a gáspár vonal egyedei testméretének és testtömegének összehasonlítása

A méréseket hallgatótársam Szabó Olivér Máté végezte, Dr. Csenki-Bakos Zsolt laboratóriumában (MATE Környezettoxikológiai Tanszék, Gödöllő), mert a nekik átadott halak a több rendelkezésre álló edény miatt gyorsabban elérték a felnőtt kort. A méréseket a halak altatásával kezdte, amelyhez MS-222 (325 mg/L) oldatot használt. Ezt követően mérleggel lemérte a halak testtömegét, majd milliméterpapíron meghatározta a testméretet. A két vonal egyedeiből származó adatok összehasonlítását és statisztikai elemzését én magam végeztem el.

3.7. A hőkezelések körülményei

A hőkezelések körülményeinek kidolgozását már a korábbiakban elvégezték kollégáim, Pethő Cintia és Hirth Mirella (Pethő, 2023). A kísérleteim során az ő általuk stabilizált körülményeket alkalmaztam. Ennek az volt az előnye, hogy a hőkezelések során jobb túlélési arányokat tudtam elérni, így a statisztikai elemzéseim is pontosabbak voltak.

A kiválasztott szülőpárokat vagy csoportokat a standard protokoll alapján szaporítottam. Az utódok tartásában sem alkalmaztam eltérő rendszert, egészen a második hetes korig. Ebben a korban kezdtem el ugyanis a hőkezeléseket. Első lépésben kiválasztottam 4x15 egyedet és ezekből képeztem két kontroll és két kezelt csoportot. A négy csoportot a kezelés végéig azonos víztérfogatban tartottam (250-300 ml), ugyanolyan edényekben (**11. ábra**). A kezelt csoportokat 36 °C-os inkubátorba helyeztem a kéthetes kezelés végéig. Ez idő alatt igyekeztem maximalizálni a túlélést. A csoportokban naponta ellenőriztem az elhullást, valamint két naponta elvégeztem a vízcserét is. A kezelt csoport esetében oxigénnel dúsított vízzel cseréltem ki az edényekben lévő vizet, mivel a magas hőmérséklet hatására csökken a koncentrációja, ez pedig további elhullásokat eredményezett volna. A kísérlet ideje alatt a kezelt és kontroll csoportot egyaránt szuszpenziós táppal takarmányoztam.

A kezelés végeztével a kezelt egyedeket kivettem az inkubátorból, majd nyolchetes korig tartottam őket a rendszeren kívül. Ezt követően kerültek fel a rendszerre. A 10-12 hetes egyedfejlődési korban, az ivarérettséget követően pedig ellenőriztem az egyes csoportok ivararányát, hogy meghatározzam sikeres volt-e a hőkezelés és történt ivararány eltolódás.



11. ábra: A hőkezelésekhez használt inkubátor és edények. A hőkezelések során az inkubátorban 14 napos kezeléseket végeztünk, ennek során 35-36 °C-os hőmérsékleten tartottuk a halakat. (Forrás: Saját fotó)

3.8. Genomi DNS izolálása

Az új *gáspár* egyedek azonosításához végeztem el a PCR alapú teszteket. A reakciókhoz szükséges genomi DNS-t, Chelex alapú eljárással izoláltam felnőtt egyedek farokúszójából. Az izolálást a halak altatásával kezdetem, majd ezt követően vágtam le egy kb. 3-4 mm²-es darabot a farokúszóból. Ezt helyeztem 70 uL Chelex oldatba, hozzáadtam 5 uL Proteináz K oldatot, két órán át emésztettem 55°C-on, majd hővel inaktiváltam. Az így kapott oldatot lecentrifugáltam, majd ebből adtam 1.5-3 uL-t a PCR reakciókhoz templátként. A mintázott halakat egyedi jelölés alapján tartottam a reakciók végéig, amíg meg nem határoztam a genomjukban hordozott transzgén kópiaszámát.

3.9. A transzgén kópiaszámának kimutatása PCR-alapú genotipizálással

A polimeráz láncreakció (PCR) során célzott DNS szakaszokat lehet felsokszorozítani. A PCR reakciót a következő komponensek felhasználásával állítjuk össze: 10X PCR puffer, víz, nukleotidok (dNTP), magnézium, primerek és polimeráz enzim. Az új *gáspár* egyedek azonosítására két primer párt használtunk fel, egy ún. duplex PCR reakcióban (**5. ábra**). Az egyik primer pár a transzgén szekvenciájára tapad fel (EGFP2-F1 5' ACC ACA TGA AGC AGC ACG ACT 3' T_M 61 °C; EGFP-R1 5' CTT CTC GTT GGG GTC TTT GC 3' T_M 58 °C), a másik a transzgén beépülése során kiesett genomi régióra (chr3del-F2 5' ACA GCA GCG

TCC TTG TCC CAG C 3' T_M 70 °C; chr3del-R2 5' CGC GGA GTC CCC TGG CTC TC 3' T_M 69.3 °C) tapad fel.

A reakciót a következő komponensekkel, térfogatokkal és koncentrációban állítottam össze: 10 uL 2X High Fidelity PCT Mater Mix, 2 uL 'forward primer' (1 uM), 2 uL 'reverse primer' (1 uM), 4.5 uL víz, 1.5 uL DNS'.

A PCR-es sokszorosítást az Analytik Jena GmbH cég Biometria TAdvanced típusú készülékén végeztük, korábban beállított hőmérsékleti profil mellett: kezdeti denaturáció ('denaturation') 98 °C 30 másodperc; 30 cikluson ismétlődve – denaturáció ('denaturation') 98 °C 10 másodperc; primerek kötődése ('annealing') 66 °C 30 másodpercig; lánc hosszabbítás ('extension') 72 °C 30 másodpercig; végső lánc hosszabbítás ('extension') 72 °C 10 percig.

A PCR termékek egy részét felhasználva (18 uL) 2%-os agaróz gélben és TBE pufferben végeztem gélelektroforézissel az elválasztást. A géltre továbbá a 100 bázispáros markert (New England Biolabs) vittem fel molekulasúly sztenderdként. A gélekről az Uvitec Cambridge Essential típusú digitális kamerával készítettem képeket.

3.10. Statisztikai analízis

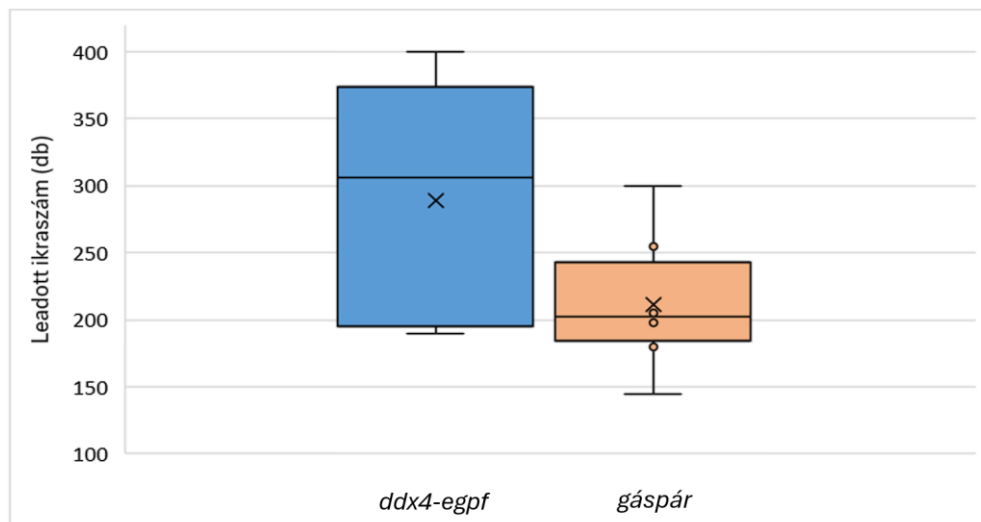
Az adatok statisztikai vizsgálatára több módszert is alkalmaztunk. F-próbát használtunk az eredmények átlagainak összehasonlítására, T-próbát pedig annak megállapítására, hogy van-e szignifikáns különbség az adatok közt. A szignifikancia szintet 0,05-ben határoztuk meg, így ahol a különbség elérte ezt a szintet azt szignifikáns eredményként kezeltük. Emellett használtunk még variancia analízist is, amellyel megvizsgáltuk az adatok sokasági szórását. Az adatok analizálására az Excel programot használtam (Microsoft).

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A pigmentált transzgénikus családok több ikrát produkáltak a pigmenthiányos családoknál

A pigmentált *tg{ddx4:egfp}* és a pigmenthiányos *gáspár* vonalak összehasonlító elemzése során először a szaporaságot vizsgáltam. Munkám során nyolc (4+4) szülőpárt szaporítottam, melyek a következő jelöléseket kapták: *tg{ddx4:egfp}* szülőpárok: DDX4.1, DDX4.2, DDX4.3, DDX4.4; *gáspár* szülőpárok: GPR.1, GPR.2, GPR.3, GPR.4. Ezeket összesen 13 alkalommal sikerült leszorítanom. A négy *tg{ddx4:egfp}* szülőpár öt alkalommal adott ikrát, összesen 1.444 darabot. A *gáspár* szülőpárok esetében nyolc sikeres ivatást tudtam elvégezni, összesen 1.691 darab ikrát raktak le (**Mellékletek 1. táblázat**).

A szaporításonkénti átlagos ikraszám összehasonlítása azt mutatta, hogy a *tg{ddx4:egfp}* szülőpárok jóval termékenyebbnek mutatkoztak, mint a *gáspár*-ok. Az előbbieket szaporításonként átlagosan 289 ikrát, míg az utóbbiak csak átlagosan 211 ikrát adtak (**12. ábra**). A statisztikai analízisekhez a családokat összevontam és egységesen kezeltem, hogy még pontosabb legyen az összehasonlító elemzés. Mivel a két vonal esetében eltérő számú volt a sikeres szaporítás, ezért ezekből véletlenszerűen kiválasztottam 4-4 szülőpár szaporításából származó ikrákat, ezekkel számoltam a túlélési szignifikancia szint meghatározásánál is (4.2. alfejezet). A kiválasztott szaporításokból származó ikraszám a két vonal között nem mutatott szignifikanciát a Student t-próba alapján.



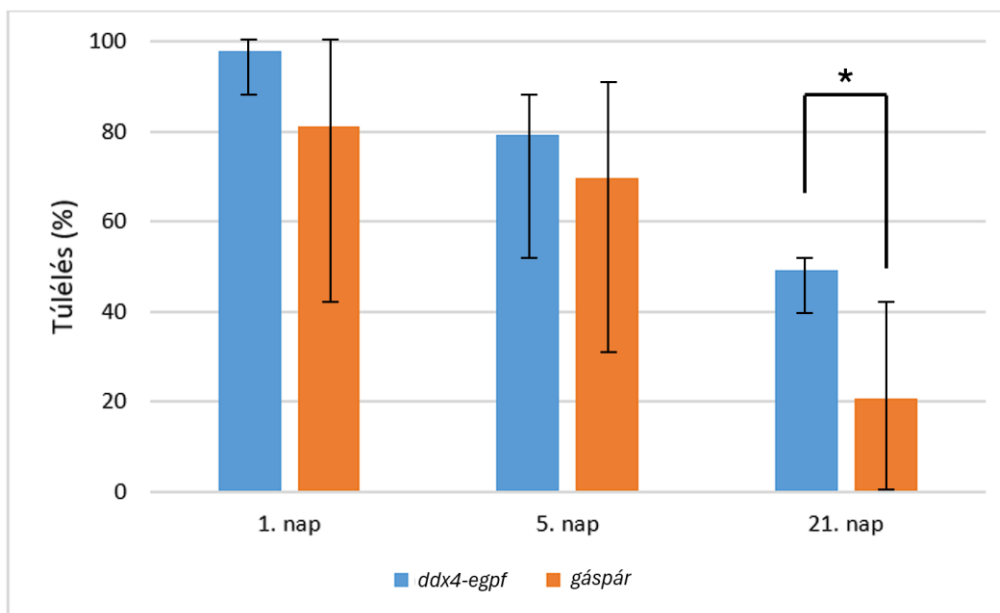
12. ábra: A pigmentált *tg{ddx4:egfp}* szülőpárok több ikrát adtak le, mint a pigmenthiányos *gáspár* szülőpárok, de az eltérés nem volt szignifikáns. A 'box plot'-okban vonalanként négy-négy páronkénti ivatásból, és a *tg{ddx4:egfp}* vonal (kék, bal) esetében öt, míg a *gáspár* vonal (narancs, jobb) esetében nyolc ivatásból származó adatokat összegeztünk. A statisztikai analízist a véletlenszerűen kiválasztott 4-4 sikeres ivatás ikraszámai alapján Student t-próbával végeztük.

4.2 A pigmentált egyedek túlélési aránya három hetes korban szignifikánsan magasabb volt a pigmenthiányosokénál

A szaporításokból származó ikrákat minden család esetében felneveltük, hogy megállapítsuk tapasztalható-e szignifikáns különbség a két vonal között a túlélés során. A szülőpárok által leadott ikrákat először három csoportba osztottam szét, amelyek az A/B/C jelölést kapták, ezekbe a kísérleti csoportokba 50-50 ikrát tettem és figyeltem meg. Amennyiben az adott szaporításból rendelkeztem több embrióval is, úgy képeztem egy M (vagyis maradék) csoportot is. Első körben az A/B/C csoportok túlélését figyeltem meg és hasonlítottam össze a két vonal között. A túléléseket az első-, az ötödik-, és a 21. egyedfejlődési napokon ellenőriztem minden csoport esetében (**Mellékletek 2. táblázat**).

Az eredmények azt mutatták, hogy az átlagos túlélés az ötödik egyedfejlődési napra a pigmentált családok esetében 79 %, a pigment szegény vonal esetében pedig 69 % volt, azaz nem volt számottevő különbség a *tg{ddx4:egfp}* és a *gáspár* vonal egyedeinek túlélése között. A különbségek a két vonal között a 21. egyedfejlődési napon lettek egyértelműek. Ekkor kerültek ugyanis fel az egyedek a haltartó rendszerünkre, ezért ezt a pontot tekintettem a kísérletek végének, ezután végeztem el a statisztikai elemzéseket. A *tg{ddx4:egfp}* szülőpárok esetében a csoportok átlagosan 49 %-os arányban, a *gáspár* családok 20.8 %-ban éltek túl (**13.**

ábra). A túlélések statisztikai elemzése során az előző fejezetben említett 4-4 sikeres szaporítás adataival számoltam. Az 21. napon tapasztalt túlélések Student t-próbával történt elemzése során azt kaptam, hogy a *tg{ddx4:egfp}* szülőpárok utódai szignifikánsan jobb túlélést mutattak.

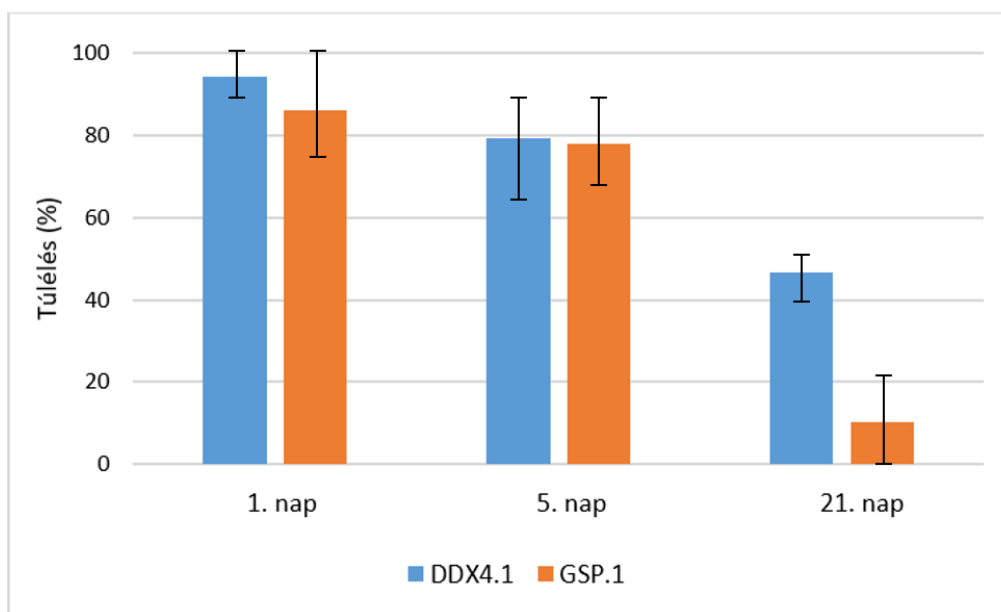


13. ábra: A *tg{ddx4:egfp}* és *gáspár* utódok túlélése a korai időpontoknál nem különbözött, de 21 dpf korban szignifikánsan magasabb volt pigmentált egyedekben. Az oszlopokban négy-négy szülőpártól, és a *tg{ddx4:egfp}* vonal (kék, bal) esetében öt, míg a *gáspár* vonal (narancs, jobb) esetében nyolc ivatásból származó adatokat összegeztünk. A statisztikai analízist Student t-próbával végeztük a kiválasztott szaporítások alapján (* - $p < 0.05$).

A továbbiakban nem csak az összes család átlagát vizsgáltam, hanem összehasonlítottam egy-egy kiemelt családot mindkét vonalból. Azokat a családokat választottam, amelyeket a legtöbbször szaporítottam sikeresen, hogy meghatározzam azt, hogy család szinten is jelen van-e a túlélési tendencia a vonalak között. A kiválasztott *gáspár* család (GPR.1) esetében ez három, míg a *tg{ddx4:egfp}* család (DDX4.1) esetében két szaporítást jelentett. A két családnál meglévő szaporítások eredményeit átlagolva elemeztem. Ennél az analízisnél azt tapasztaltam, hogy a két családban alacsonyabb volt a túlélés, mint az egész átlag esetében, azonban a tendencia megegyezett. A *gáspár* család túlélése az ötödik egyedfejlődési napig hasonló volt, mint a *tg{ddx4:egfp}* családnak. A 21. napos korra azonban a túlélési egyedszám nagy különbségeket mutatott. A *tg{ddx4:egfp}* család egyedeinek 46.5 %-a, a kiemelt *gáspár* családnak pedig csupán 10.33 %-a élt túl a kísérlet lezárásáig (**14. ábra**). Mivel az adatsor eltérő

hosszúságú volt, így nem tudtam statisztikai számolást végezni a szignifikancia szint megállapítására.

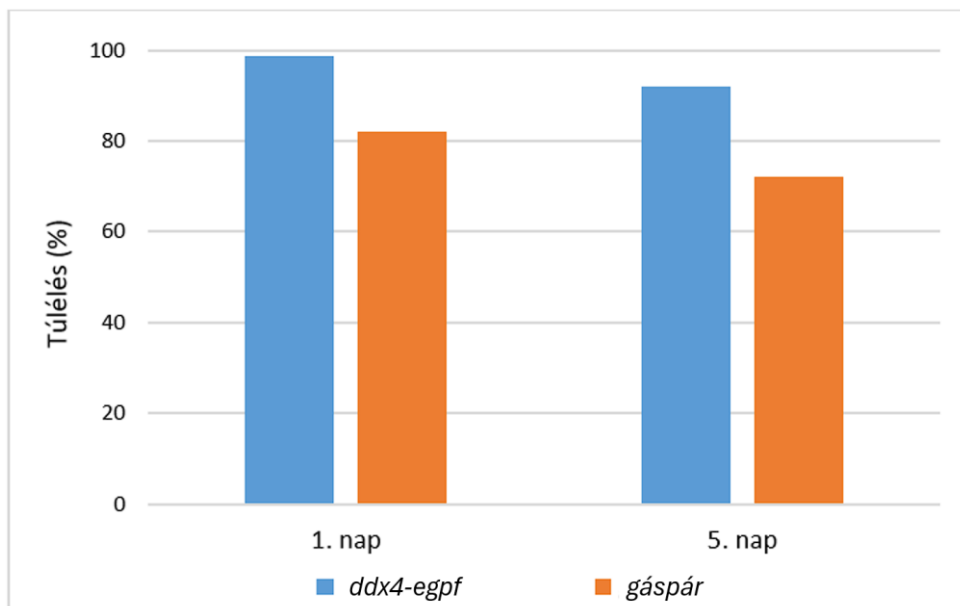
Összegezve, a két vonal szaporaságának és túlélési arányának elemzésével bebizonyítottam, hogy a *gáspár* vonal egyedei valóban gyengébben teljesítenek a pigmentált transzgénikus vonalhoz képest. Ez egy újabb bizonyíték lehet arra, hogy a pigmentek hiánya, amelyek fontos védekezési folyamatokban vesznek részt, nagyban hathatnak a túlélésre és az ellenállóságra is (Patterson és Parichy, 2019).



14. ábra: A legtöbbször sikeresen szaporított családok hasonló tendenciát mutattak a túlélésben, mint a családok átlaga. Az oszlopok egy-egy család értékeit ábrázolják: *tg{ddx4:egfp}* vonal (kék, bal), *gáspár* vonal (narancs, jobb).

A korai elhullások az egyedfejlődési első öt napján nem mutattak olyan drasztikus különbséget a két vonal között, mint a kísérletek végeztével. Annak érdekében, hogy biztosan ki tudjam jelenteni, hogy a két vonal túlélése valóban hasonló a korai napokban és nem csak a családok esetében figyelhető ez meg, elvégeztem a kísérleteket csoportos szaporításokból származó embriókon és lárvákön is. A *tg{ddx4:egfp}* és a *gáspár* vonal esetében is összesen öt-öt tenyészegyedet szaporítottam kis csoportos ivatással (3 tejes + 2 ikrás). Az ikrákat hasonlóan kezeltem és képeztem belőlük csoportokat, mint a páros szaporítások esetében. Ezen csoportok túlélését csak az első öt napon követtem. Az eredmények azt mutatták, hogy a két vonal között valóban nem volt szignifikáns különbség a korai fejlődés során. A *tg{ddx4:egfp}* csoportból származó ikráknak első napra 98.6 %-a, míg az ötödik napra 92 %-a élte túl. A *gáspár* csoport

esetében az első napon 82 %-ot, az ötödik napon 72 %-ot jelentett (15. ábra). A kísérlet során egy szaporításból származó adatok álltak a rendelkezésemre, így a Student t-próbát nem tudtam elvégezni. A későbbiekben több csoportos ivatást is el fogok végezni, hogy pontosabb statisztikai elemzést tudjak készíteni.



15. ábra: A *tg{ddx4:egfp}* és *gáspár* egyedek túlélési aránya csoportos szaporításból származó embriók és lárvák esetében sem mutatott különbséget az első öt nap során. A kék oszlopok a *tg{ddx4:egfp}* vonalból, míg a narancs oszlopok a *gáspár* vonalból származó adatokat összegzik.

4.3 A tartási sűrűség meghatározó lehet a túlélés mértékére

A két vonal összehasonlítása során a szaporításokból több esetben is jóval több embriót kaptunk, mint amennyire az 50 egyedes A/B/C csoportok kialakításához szükségünk volt. Ezekből az ikrákból maradék csoportot képeztünk (M csoport). A kutatásom során ezeknek a csoportoknak az elhullását is követtem annak érdekében, hogy megtudjam: az egyedsűrűség növelése hogyan befolyásolja a túlélést. A kísérlet során két *tg{ddx4:egfp}* (DDX4.1, DDX4.2) család és három *gáspár* (GPR.1, GPR.2, GPR.3) család adatait vettem figyelembe, mivel csak ezeknél a kiemelt szaporításoknál volt elég nagy az 'M' csoport egyedszáma és ezáltal a nevelési egyedsűrűsége (1. táblázat)

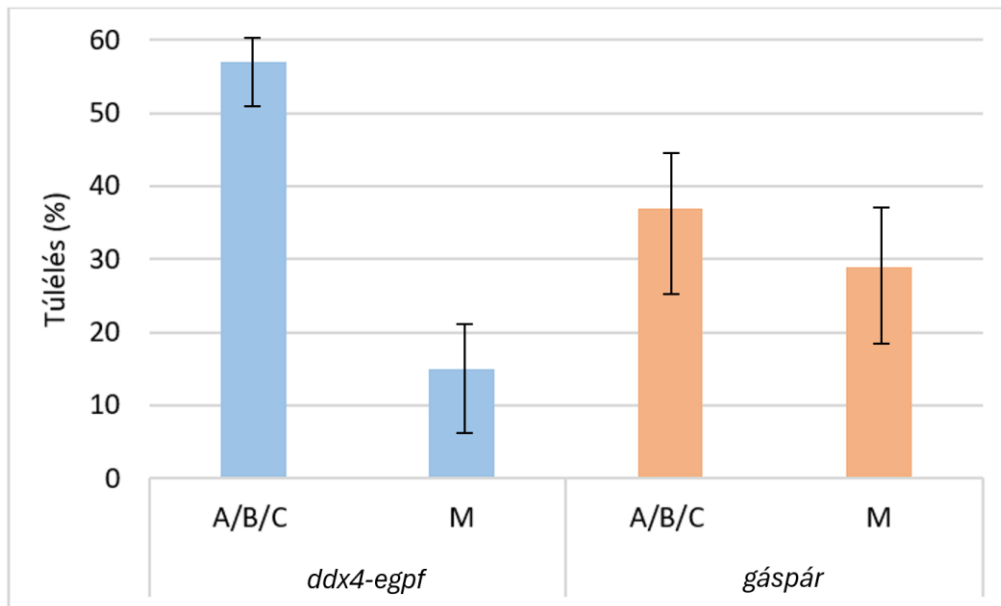
1. táblázat: Az egyedsűrűség jelentősen befolyásolja a túlélést

Szülőpár	Csoport	Csoportonkénti egyedszám	Túlélés a 21. napon (%)
DDX4.1*	A/B/C	50	59.66
	M	250	7.2
DDX4.2	A/B/C	50	53.33
	M	156	21.8
GPR.1**	A/B/C	50	25.3
	M	150	30
GPR.3	A/B/C	50	48
	M	105	37.1
GPR.4	A/B/C	50	36.6
	M	100	19

* a kék kiemelés a *tg{ddx4:egfp}* szülőpárokat jelzi

** a sárga kiemelés a *gáspár* szülőpárokat jelzi

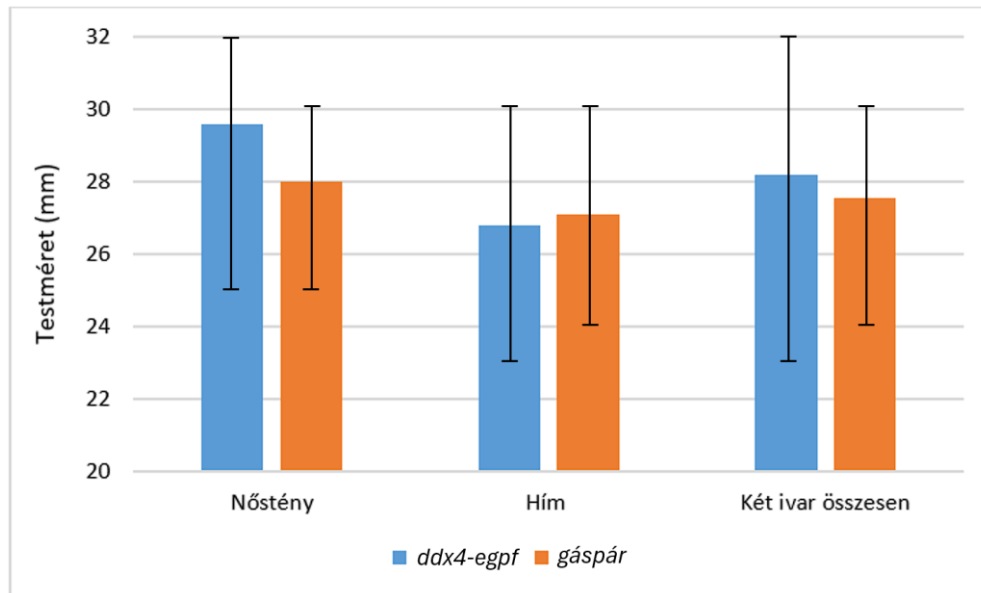
A maradék csoport kiindulási egyedszáma a két *tg{ddx4:egfp}* család esetében volt a legnagyobb (n=250 és 156), míg a *gáspár* csoportok esetében jóval alacsonyabb (n=150, 105 és 100) (**1. táblázat**). A megfigyeléseim során azt tapasztaltam, hogy arányaiban az első két csoportnál volt a legnagyobb elhullás 21. napos korban az A/B/C csoportokhoz hasonlítva (**16. ábra**). A *gáspár* családok esetében az elhullás mértéke arányaiban jóval kisebb volt, mint a nagyobb egyedszámú csoportok esetében (**16. ábra**). Ennek fényében valószínű, hogy a magas sűrűség jelentősen csökkenti a korai túlélés esélyeit. Sajnos az alacsony kísérleti egyedszám miatt ezek az eredmények nem tekinthetők véglegesnek, inkább csak jelzik, hogy ezt később érdemes lehet több család esetében megvizsgálni.



16. ábra: A magas tartási sűrűség csökkentheti a túlélés esélyeit. A kiemelt családok utódainak A/B/C csoportjait ötven egyedenként, míg a maradék (M) csoportjait ugyanakkora csészében magasabb (átlagosan 203, illetve 118) egyedszámmal neveltük, a kék oszlopok a *tg{ddx4:egfp}* vonalból, míg a narancs oszlopok a *gáspár* vonalból származó adatokat összegzik az átlagos túlélés alapján.

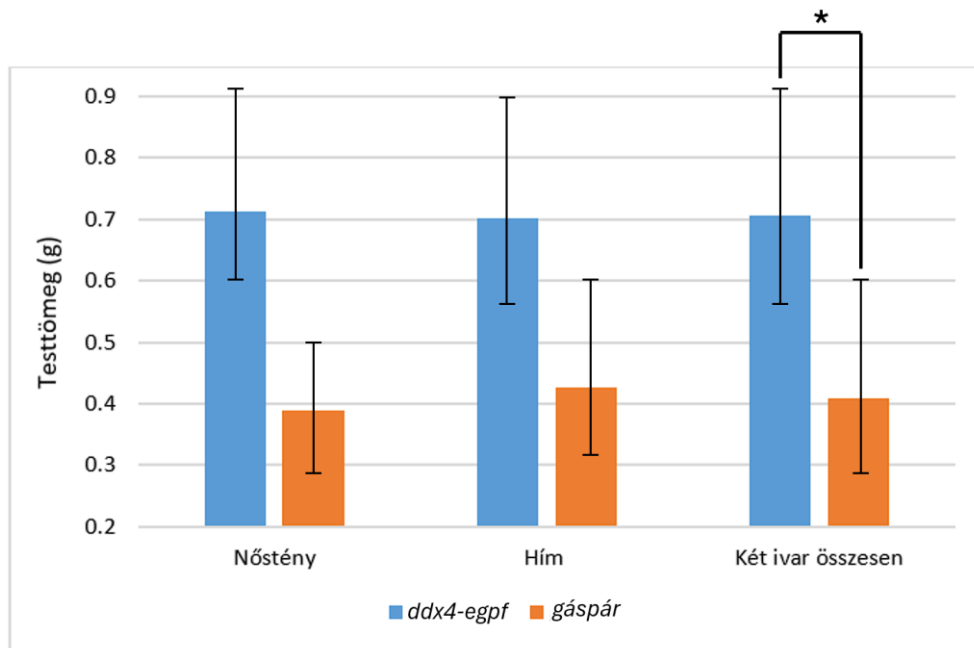
4.4 A *tg{ddx4:egfp}* egyedek nem mutattak szignifikánsan nagyobb növekedési erélyt, mint a *gáspár* egyedek

A halak növekedési erélyének megállapításához a két vonalból 10-10 nőtényt és hímeket hasonlítottunk össze testméret és testsúly alapján (**Mellékletek 3. táblázat**). A méréseket Szabó Olivér végezte, míg az adatok statisztikai analízisét én végeztem el. Az analízis során először összehasonlítottam a mindkét ivar adatait a két vonal között. Az adatok alapján a nőtények esetében volt nagyobb különbség a két vonal között, azonban az elhanyagolható mértékűnek mondható, mindössze 1.6 mm. A két vonalat az ivarok átlagolásával is összehasonlítottam, ennek eredménye sem adott számottevő különbséget a *tg{ddx4:egfp}* és a *gáspár* vonal között. A hímek összehasonlítása során látható, hogy nincsen nagy különbség, míg a nőtények esetében már számottevőbb. Ezért a nőtényeken külön elvégeztem a statisztikai analízist Student t-próbával, de ennek az eredménye sem mutatott szignifikáns különbséget (**17. ábra**).



17. ábra: A $tg\{ddx4:egfp\}$ és $gáspár$ vonalak egyedeinek a testhossza felnőtt korban hasonló volt. A kék oszlopok a $tg\{ddx4:egfp\}$ vonalból, míg a narancs oszlopok a $gáspár$ vonalból származó adatokat összegzik. A különbségek Student t-próbával vizsgálva egyik ivar esetében sem bizonyultak szignifikánsnak.

A két vonal testtömegének vizsgálatát ugyanilyen formában ellenőriztem. A két vonal közötti különbség itt már jóval észrevehetőbb. A $tg\{ddx4:egfp\}$ vonal esetében a nőstények és hímek együttes átlagtömege 0.707 gramm volt, ugyanez az érték a $gáspár$ vonal esetében jelentősen alacsonyabb, mindössze 0.408 gramm. A két vonal testtömege közötti különbség az egyes ivarok esetében nem mutatott szignifikáns eltérést ($n=10$), ugyanakkor az összevont ivarok esetében statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($n=20$) ($p<0.05$; **18. ábra**). Ennek oka feltehetően az volt, hogy az összevonást követően már kellően magas volt az egyedszám, míg a külön vizsgált ivarok esetében nem.



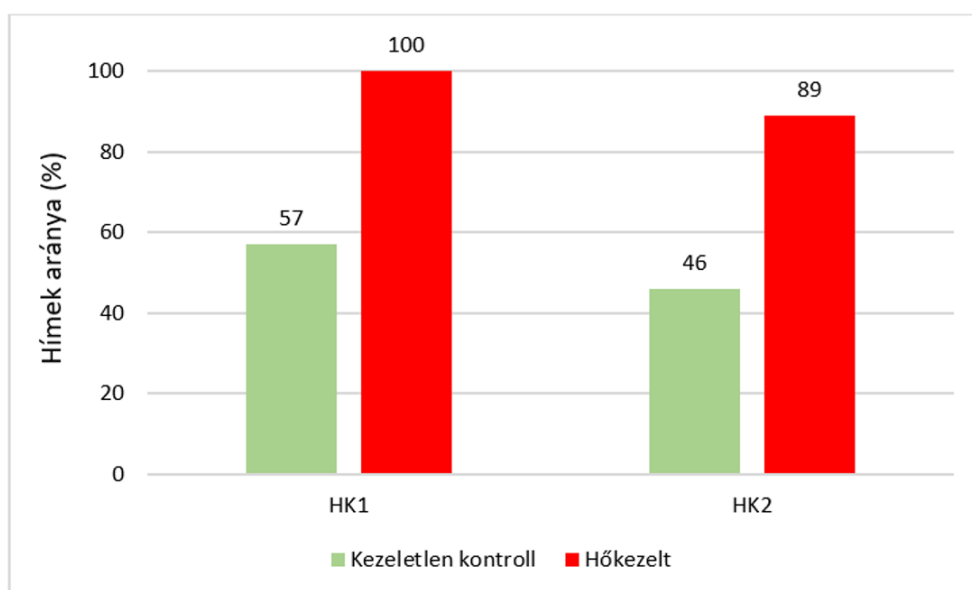
18. ábra: A testtömeg összehasonlítása szignifikáns különbséget mutatott a *tg{ddx4:egfp}* vonal javára. A kék oszlopok a *tg{ddx4:egfp}* vonalból, míg a narancs oszlopok a *gáspár* vonalból származó adatokat összegzik. A statisztikai analízist Student t-próbával végeztük (* - $p < 0,05$).

4.5 A hőkezelt családnál jelentős ivararány eltolódást tudtam kimutatni a hímek irányába

A hőkezeléseket a túlélési megfigyeléseknél már ismertetetett DDX4.1 család utódain kezdtem el. Eddig három hőkezelést indítottam (HK1, HK2 és HK3). Az első kettő esetében rendelkezem eredményekkel (HK1 és HK2), a legutolsó hármasként HK3 folyamatban van és két hónap múlva érik el az ivarérett kort, ekkor lehet meghatározni az ivararányukat és ezáltal a kezelés eredményét.

A HK1 és HK2 kezelések esetében is ki tudtam mutatni a hőkezelés okozta ivararány eltolódását a hímek irányába. Az ivararány ellenőrzés során a HK1-es kezelésben résztvevő halak 100% volt hím ($n=21$), a kontroll halaknak pedig csupán az 57 %-a ($n=14$). Ebben a kísérletben ez egy 43 %-os eltolódást jelentett a hímek irányába. A HK2 esetében szintén sikerült elérni a hímek arányának növekedését. A kezelt csoportban 89 % volt a hímek aránya ($n=18$), míg a kontroll csoportban pedig 45.5 % ($n=22$), ez 44.5 %-os eltolódást jelentett (**19. ábra**). Az eredmények alapján sikeresen azonosítottam egy hőre válaszoló családot (DDX4.1) és két sikeresnek mondható hőkezelést végeztem el az eddigi kísérleteim során. A továbbiakban

tervezek ezen a családon további kezeléseket elvégezni, valamint új hőre válaszoló családokat azonosítani, a *ddx4:egfp* és a *gáspár* vonalakból egyaránt.



19. ábra: A korai hőkezelések során azonosítottam egy hőre válaszoló családot, melyben a hímek aránya a kezelés hatására jelentősen megemelkedett. A zöld oszlopok a kezeletlen kontroll csoportok, míg a piros oszlopok a hőkezelt csoportok értékeit mutatják. (Rövidítések: HK1- első hőkezelés; második kezelés; HK2 – második hőkezelés)

4.6 Új *gáspár* egyedek azonosítása az állomány bővítése céljából

Egyik fontos feladatom a *gáspár* tenyészállomány egyedszámának bővítése volt annak stabilitásának növelése és a genetikai változatosság fokozása céljából. Hallgatótársam, Szabó Olivér Máté korábbi munkája során nem azonosította be pontosan az összes *gáspár* halat a transzgén kópia száma alapján (Szabó, 2023). Mivel ezek a halak rendelkezésemre álltak és megfelelőek voltak az állománybővítésére ezért elvégeztem ezeknek rajtuk egy a korábbi munkából átvett és beállított duplex PCR alapú analízist, hogy megtaláljam a transzgént homozigóta formában hordozó egyedeket.

Összesen 83 *gáspár* egyedet vizsgáltam meg. A duplex PCR reakció termékeit 2%-os agaróz gélen futtattam meg (**20. ábra**). Ezekből az egyedekből 78 homozigóta *gáspár* egyedet azonosítottam. Ezeket az újonnan kiválasztott homozigóta *gáspár* egyedeket a továbbiakban fel fogom használni állománybővítési és kísérleti célokra egyaránt.



20. ábra: Új homozigóta *gáspár* egyedek azonosítása kettős PCR reakcióval. A kópiaszám meghatározásához a két olyan primert használtunk, ami korábbi PCR tesztek során biztosan működtek. A transzgén jelenlétét mutató *egfp* primer párt (alsó csík, 415 bp) és a kiesett genomi régiót célzó primer párt (felső csík, 815 bp) együtt sokszoroztunk fel PCR reakciókban. (Rövidítések: Hem – hemizigóta, Hom – homozigóta, Chr3 – a 3. kromoszómáról felsokszorozott fragment, *egfp* – a transzgénről felsokszorozott fragment, AB – transzgénmentes kontroll, H₂O – templátmentes kontroll, 1 kb – molekulásúly marker).

4.7 Hozzájárulások

A kísérletek megtervezését és az utódok túlélési arányának elemzését témavezetőim Dr. Szeverényi Ildikó és Dr. Orbán László hozzájárulásával végeztem.

A napi munkámhoz szükséges alapvető ismereteket Szabó Olivér Mátétól és Hirth Mirellától tanultam meg. A PCR-es kísérleteket Szabó Olivér Máté irányításával, vele együtt dolgozva végeztem el.

A hőkezelésben és a mikroszkóppal való szexálásban Hirth Mirella segített, akinek korábbi munkája a hőkezelések körülményeinek beállításában nagymértékben hozzá járult az itt kapott eredményeimhez.

A halak gondozásában, etetésében, szaporításában és megfigyelésében nagy segítségemre voltak Horváth Kornél, Marton Csaba és az Élvonal Halgenomikai Kutatócsoport munkatársai.

A többi munkát én magam végeztem.

5. Limitációk

5.1. A túlélési arány összehasonlítását hátráltató tényezők

A szaporítás mind a *tg{ddx4:egfp}* és a pigment hiányos *gáspár* vonalon nehéznek bizonyult mivel több esetben nem adtak a tenyészpárok ikrát. A szülőpárokat esetenként akár nyolcszor is felraktuk ivatni, azonban a sikeres ivatások száma egy-egy családnál maximum három volt. A kísérletem során kiemelkedően fontos lett volna a családok minél többszöri szaporítása, hogy pontosabb eredményeket kaphassak. Ennek hiányában kisebb adatsorral tudtam csak dolgozni.

5.2. A vizsgált halak ivarát csak később tudtuk meghatározni

A zebradánió esetében az eddigi tudományos publikációk alapján (Von Hofsten és Olsson, 2005) csak az egyedfejlődés harmadik hónapja során határozható meg biztosan, mert az ivarszervek transzformációja akkorra fejeződik be biztosan. A mi transzgénikus vonalainkban ez az időpont 2-4 héttel korábbra tolható, azonban ez még mindig késleltette a hőérzékeny családok azonosítását.

5.3. A hőkezelésekre használt inkubátor befogadási képessége

Az inkubátorba egyszerre csak két hőkezelésre használt tartályt tudtunk behelyezni, azaz csak egy csoport hőkezelésére volt egyszerre elegendő hely. Ezért a kezeléseket lassabban tudtuk elvégezni, az előző kezelések végeztével. Ez jelentősen lelassította az új hőre válaszoló családok azonosításának folyamatát.

6. Következtetések és javaslatok

A fenti eredményekből a következő következtetéseket vontam le és a következő javaslatokat teszem:

- (1) Ahhoz, hogy a $tg\{ddx4:egfp\}$ vonalhoz hasonló túlélő egyed számot tudjunk produkálni a *gáspár* vonalon is, meg kell növelnünk a szülőpárok és szaporítások számát. Kéthetes intenzitással kell majd szaporításokat elvégezni, hogy megfelelő ikra mennyiség álljon rendelkezésünkre. Továbbá növelni kell a csoportos szaporítások számát is, mivel nagyobb eséllyel lesznek sikeresek és több ikrát eredményeznek, ezáltal stabilizálható az új generáció száma.
- (2) Az ötödik naptól számottevő különbség mutatkozott a két a vonal túlélési aránya között. Ennek oka, hogy pigment hiánya kihat az ellenállóképességre és ezáltal a túlélésre is. Megoldás lehet erre a problémára a *gáspár* vonalon az egyedsűrűség csökkentése, mivel az eddigi tapasztalatok azt mutatják, hogy kihatással van a túlélő egyedek arányára. Emellett az is elősegítheti a probléma megoldását, ha fokozatosan szoktatjuk át az új környezethez, vagy esetlegesen a táp változtatáshoz. Kellő figyelemmel kell lennünk arra is, hogy vízminősége is megfelelő legyen és az etetési protokoll megválasztására is, amelyet befolyásol az egyedek mérete és a tartási sűrűség is.
- (3) A két vonal fejlődésének összehasonlításához elengedhetetlen, hogy a hasonlítandó szaporítások egyidejűleg legyenek elvégezve, mivel így tudunk majd őket jól összevetni. Ehhez az szükséges, hogy kellő mennyiségű szülőpárt kell egyszerre felrakni, hogy növeljük a sikeres ivatások esélyét.
- (4) Eredményeink azt jelzik, hogy a nevelési egyedsűrűség növelése negatívan hat a sűrűsége, mert csökkenti az életteret, növeli a csoporton belüli stressz, megbetegedés vagy elhullás esélyét. Emiatt, ha növelni akarjuk egy csoport túlélési egyed számát akkor érdemes őket ikra állapotól kezdve még kisebb csoportokban tartani.

7. Összefoglalás

A kutatásaimat az Élvtal Halgenomikai Kutatócsoport keszthelyi laboratóriumában végeztem a zebrafaló modellen. Csoportunkban ennek a fajnak a szaporodásbiológiáját vizsgáljuk, elsősorban azt, hogyan alakulnak ki az ivarok az ún. $tg\{ddx4:egfp\}$ pigmentált transzgénikus vonalat használva. Emellett alkalmam volt vizsgálatokat végezni a korábban hallgatótársam, Szabó Olivér Máté által létrehozott pigmenthiányos *gáspár* vonalon is, mely ugyanazt a transzgént tartalmazza. Ennek az újonnan létrehozott vonalnak az a nagy előnye, hogy mivel átlátszó az ivarszervek kialakulása és fejlődése sokkal jobban nyomon követhető, mint a pigmentált transzgénikus vonal esetében.

A kutatásom lényege az volt, hogy ezt a két transzgénikus vonalat összehasonlítsam több tényező figyelembe vételével és ezáltal elvégezzem a *gáspár* vonal alapszintű jellemzését is. A kísérleteim során vizsgáltam a két vonal utódainak túlélését, és kimutattam, hogy a pigmentált $tg\{ddx4:egfp\}$ vonal esetében szignifikánsan magasabb az utódok túlélési aránya. A két vonal súlygyarapodásának összehasonlításával szintén ki tudtam mutatni szignifikáns különbséget a két vonal között. Elvégeztem továbbá hőkezeléseket az ivararány hímek irányába billentése céljából, ennek során sikeresen azonosítottam egy hőre válaszoló családot. A munkám során elsajátítottam az alapvető molekuláris technikákat is a korábban nem tesztelt *gáspár* egyedek genotipizálásával, vagyis a transzgén kópia számának meghatározásával. Ennek során számos új homozigóta egyedet azonosítottam, amelyekkel bővíteni tudtam a *gáspár* állományt.

A kutatásom során több olyan eredményt kaptam, amivel hozzájárulhattam a laboratóriumban zajló folyamatokhoz. Emellett a munkám során számos ismeretet és tudást sajátíthattam el, ami nagyon hasznos lesz a későbbi tudományos munkáim során. Továbbá folynak olyan kísérleteim, amiket a dolgozat leadása után is folytatni szeretnék, ezáltal az adataim és eredményeim és ezzel együtt a tudásom is remélhetőleg folyamatosan bővülnek és frissülnek majd.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani téma vezetőimnek, Dr. Szeverényi Ildikónak és Dr. Orbán Lászlónak, akik a munkám során rengeteg tanáccsal láttak el, és segítettek a TDK-dolgozatom megírását.

Köszönöm továbbá a két mentorom Hirth Mirella és Szabó Olivér Máté segítségét, akik megtanították a mikroszkóppal, hőkezelő inkubátorral történő munkákat és PCR-kísérletek elvégzését. Továbbá a rengeteg szakmai tanácsot is, amivel elláttak a munkám során. A dolgozatom megírása során kiemelkedő segítséget kaptam Szabó Olivér Mátétól, melyet külön köszönök.

Köszönet illeti továbbá az Alkalmazott Halbiológia tanszék munkatársait, akik tanácsaikkal és az ügyeletek során végzett munkájukkal hozzájárultak a kutatásom sikeréhez. Köszönettel tartozom Horváth Kornélnak és Marton Csabának, akik az eltelt idő alatt segítették a kísérleti halaimat tartani és felnevelni.

Köszönöm a családomnak és a barátaimnak, hogy a munkám és tanulmányaim alatt folyamatos támogatást nyújtottak.

8. Irodalomjegyzék

- Avise, J.C and J.E. Mank (2009). Evolutionary perspectives on hermaphroditism in fishes. *Sexual Development* 3 (2-3): 152-163. <https://doi.org/10.1159/000223079>
- Campbell, C.A., O. Fursova, X. Cheng, E. Snella, A. McCune, L. Li, B. Solchenberger, et al. (2021). A zebrafish model of granulin deficiency reveals essential roles in myeloid cell differentiation. *Blood Advances* 5 (3): 796–811. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003096>.
- Choi, T-Y., T-I. Choi, Y-R. Lee, S-K. Choe, and C-H. Kim (2021). Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine* 53 (3): 310–17. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5>.
- Devlin, R.H. and Y. Nagahama (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences” *Aquaculture* 208: 191-364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1).
- Hawkins, M.R., and R.A. Wingert (2023). Zebrafish as a model to study retinoic acid signaling in development and disease. *Biomedicine* 11 (4): 1180. <https://doi.org/10.3390/biomedicine11041180>.
- Kimmel, C.B., W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, and T.F. Schilling (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203 (3): 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Krøvel, A.V. and L.C. Olsen (2002). Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ Cells of the zebrafish”. *Mechanisms of Development* 116 (1–2): 141–50. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00154-5).
- Krøvel, A.V. and L.C. Olsen (2004). Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development”. *Developmental Biology* 271 (1): 190–97. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.004>.
- Liew, W.C., and L. Orbán (2014). Zebrafish Sex: A complicated affair. *Briefings in Functional Genomics* 13 (2): 172–87. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt041>.
- Liew, W.C., R. Bartfai, Z. Lim, R. Sreenivasan, K.R. Siegfried, and L. Orbán (2012). Polygenic sex determination system in zebrafish”. *PLoS ONE* 7 (4): e34397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034397>.
- McLaren A. (1988). Sex determination in mammals. *Trends in Genetics* 4(6): 153-157. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(88\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0168-9525(88)90020-0)
- Nusslein-Volhard, C., and R. Dahm (2002). *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford University Press (Book).
- Orbán, L., R. Sreenivasan and P-E. Olsson: Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312: 35-41(2009; <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.014>)
- Patterson, L.B. and D.M. Parichy (2019). Zebrafish pigment pattern formation: Insights into the development and evolution of adult form. *Annual Review of Genetics* 53 (1): 505–30. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043741>.
- Pethő Cintia: Hőmérséklet okozta ivararány változásvizsgálata zebradánió modellen. OTDK, Kaposvár, 2023

- Ribas, L., W.C. Liew, N. Díaz, R. Sreenivasan, L. Orbán, and F. Piferrer (2017). Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 114 (6). <https://doi.org/10.1073/pnas.1609411114>.
- Sreenivasan, R., J. Jiang, X. Wang, R. Bártfai, H.Y. Kwan, A. Christoffels, and L. Orbán (2014). Gonad differentiation in zebrafish is regulated by the canonical Wnt signaling Pathway1. *Biology of Reproduction* 90 (2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110874>.
- Szabó, O.M. (2023) Ivar-specifikusan expresszálódó transzgén bevitele átlátszó zebradánióba korai szelekciós eljárással. OTDK Kaposvár, 2023.
- Szabó, O.M., Hirth M., Szabó Gy., Orbán L. and Szeverényi I. (2023) Early selection allows for efficient and rapid introgression of a reporter construct into a partially transparent zebrafish line. 'Flash-talk' at the European Zebrafish Conference, Krakko, Lengyelország, 2023.
- Trevarrow, B., and B. Robison (2004). Genetic backgrounds, standard lines, and husbandry of zebrafish. In *Methods in Cell Biology*, 77:599–616. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)77032-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)77032-6).
- Tzung, K.-W., R. Goto, J.M. Saju, R. Sreenivasan, T. Saito, K. Arai, E. Yamaha, M.S. Hossain, M.E.K. Calvert, and L. Orbán (2015). Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem Cell Reports* 4 (1): 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.011>.
- Von Hofsten, J., and P-E. Olsson (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-63>.
- Wang, X. G., R. Bartfai, I. Sleptsova-Freidrich, and L. Orban (2007). The timing and extent of 'juvenile ovary' phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. *Journal of Fish Biology* 70 (sa): 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01363.x>.
- Warner, D. A., and R. Shine (2008). The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile". *Nature* 451 (7178): 566–68. <https://doi.org/10.1038/nature06519>.
- White, R.M., A. Sessa, C. Burke, T. Bowman, J. LeBlanc, C. Ceol and C. Bourque (2008). Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2 (2): 183–89. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>.
- Wilhelm D., Palmer S. és Koopman P (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Review* 87: 1-28. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2006>

9. Mellékletek

Mellékletek 1. táblázat: A sikeres szaporítások során a $tg\{ddx4:egfp\}$ vonal családjai (DDX4) átlagosan több ikrát adtak le, mint a *gáspár* (GPR) egyedek.

Szülőpár	Szaporítás ideje	Leadott ikraszám (db)	Összes ikraszám (db)	Szaporításonként átlag leadott ikraszám (db)
DDX4.1	2024.04.25	348	1444	288.8
	2024.05.28	306		
DDX4.2	2024.05.28	400		
DDX4.3	2024.05.28	190		
DDX4.4	2024.05.28	200		
GPR.1	2024.04.25	208	1691	211.375
	2024.05.10	300		
	2024.05.28	198		
GPR.2	2024.05.10	145		
	2024.05.28	180		
GPR.3	2024.05.10	255		
GPR.4	2024.05.10	200		
	2024.05.28	205		

Mellékletek 2. táblázat: A $tg\{ddx4:egfp\}$ vonal egyedei (DDX4) jobb túlélést mutattak, mint a *gáspár* (GPR) egyedek.

Szülők	Születési dátum	Csoportok	Kiindulási ikraszám db (%)	Túlélés db (%)			Átlagos túlélés (%)		
				1. nap	5. nap	21. nap	1. nap	5. nap	21. nap
★ DDX4.1	2024.04.25	A/B/C	150 (100%)	150 (100%)	140 (93,3%)	60 (40%)	97.7	79.1	49
	2024.05.28	A/B/C	150 (100%)	133 (88,6%)	99 (66%)	80 (53,3%)			
DDX4.2	4/25/2024	A/B/C	150 (100%)	150 (100%)	85 (56,6%)	79 (52,66%)			
DDX4.3	4/25/2024	A/B/C	150 (100%)	150 (100%)	140 (93,3%)	79 (52,66%)			
DDX4.4	4/25/2024	A/B/C	150 (100%)	150 (100%)	125 (83,3%)	70 (46,6%)			
★★ GPR.1	2024.04.25.	A/B/C	150 (100%)	150 (100%)	140 (93%)	0 (0%)	81	69.5	20.75
	2024.05.10	A/B/C	150 (100%)	121 (81%)	102 (68%)	15 (10%)			
	2024.05.28	A/B/C	150 (100%)	115 (77%)	110 (73%)	31 (21%)			
GPR.2	2024.05.10	A/B/C	150 (100%)	66 (44%)	51 (34%)	18 (12%)			
	2024.05.28	A/B/C	150 (100%)	108 (72%)	93 (62%)	22 (15%)			
GPR.3	2024.05.10	A/B/C	150 (100%)	130 (87%)	105 (70%)	48 (32%)			
	2024.05.28	A/B/C	150 (100%)	139 (93%)	113 (75%)	62 (41%)			
GPR.4	2024.05.10	A/B/C	150 (100%)	141 (94%)	122 (81%)	52 (35%)			

* A $ddx4-egfp$ vonal szülőpárjai között legtöbb alkalommal (n=2) sikeresen szaporított pár

** A *gáspár* vonal szülőpárjai között legtöbb alkalommal (n=3) sikeresen szaporított pár

Mellékletek 3. táblázat: A *tg{ddx4:egfp}* és *gáspár* vonal növekedési erélyének összehasonlítása során találtunk szignifikanciát a két vonal között.

Vonal	Születés	Hal ID	Ivar	Testméret (mm)	Testsúly (g)
<i>tg{ddx4:egfp}</i>	2024.01.10 (7 mpf)	1	Nőstény	30	0.7
		2	Nőstény	30	0.91
		3	Nőstény	28	0.6
		4	Nőstény	30	0.9
		5	Nőstény	31	0.73
		6	Nőstény	30	0.83
		7	Nőstény	25	0.46
		8	Nőstény	31	0.6
		9	Nőstény	29	0.64
		10	Nőstény	32	0.76
		11	Hím	23	0.78
		12	Hím	24	0.56
		13	Hím	28	0.77
		14	Hím	28	0.9
		15	Hím	27	0.8
		16	Hím	28	0.6
		17	Hím	26	0.65
		18	Hím	28	0.63
		19	Hím	26	0.62
		20	Hím	30	0.7
<i>gáspár</i>	2023.10.30 (9 mpf)	1	Nőstény	28	0.4
		2	Nőstény	28	0.43
		3	Nőstény	30	0.48
		4	Nőstény	30	0.5
		5	Nőstény	29	0.41
		6	Nőstény	29	0.41
		7	Nőstény	27	0.34
		8	Nőstény	27	0.33
		9	Nőstény	27	0.31
		10	Nőstény	25	0.29
		11	Hím	27	0.4
		12	Hím	26	0.41
		13	Hím	27	0.36
		14	Hím	25	0.35
		15	Hím	29	0.6
		16	Hím	28	0.48
		17	Hím	24	0.31
		18	Hím	28	0.44
		19	Hím	27	0.36
		20	Hím	30	0.55