

Save what can be saved –
new possibilities in *in vitro*
gene preservation of poultry
species

Literature review

Barna Judit*
Liptói Krisztina
Patakiné Várkonyi Eszter

J. Barna*
K. Liptói
E. Patakiné Várkonyi

Haszonállat-génmegőrzési Központ
2100 Gödöllő, Isaszegi út 200.

* e-mail: barna.judit@hagk.hu

Mentsük a menthetőt – új lehetőségek baromfifélék *in vitro* génmegőrzésé- nek terén

Irodalmi áttekintés

ÖSSZEFOGLALÁS

Szerzők átfogó áttekintést nyújtanak a genetikai diverzitás megőrzésének jelentőségéről, az *ex situ/in vitro* génmegőrzés lehetőségeiről baromfiféléknél. Bemutatják a genetikai anyag megőrzésének módjait madarak esetében, az eddig elért eredményeket a nemzetközi kutatási szintéren, valamint a jelenlegi hazai fejlesztéseket, mellyel hazánkban egyedül a Haszonállat-génmegőrzési Központban, Gödöllőn foglalkoznak. Részletesen bemutatásra kerülnek az őshonos baromfifélék ondómélyhűtésének eddigi eredményei, a korai embrionális sejtek és a korai ivarszervszövetek tartósítási lehetőségei, valamint ezek génmegőrzési programokban való alkalmazásai.

SUMMARY

The authors present a comprehensive review about the significance of the maintenance of genetic diversity, the possibilities of *ex situ/in vitro* gene conservation in poultry species. There is an introduction of the various ways of the preservation of genetic material, the results achieved so far at international level, as well as the present developments in the Centre for Farm Animal Gene Conservation, in Hungary.

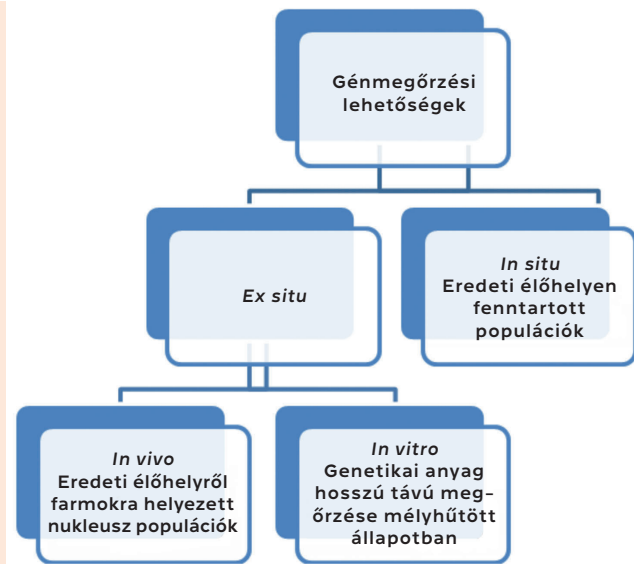
There is a detailed presentation of the difficulties and the results of sperm cryopreservation of the indigenous poultry breeds, which is the most effective and practical way for the long term storage of poultry genes at the present time, although in the case of spermatozoa only the haploid male genome can be preserved. However, by 6–8 re-crossing using frozen/thawed sperm the whole genome can be retained. The fertility rates obtained with frozen thawed semen are variable depending on the species and the employed protocols. According to the latest results chicken and gander spermatozoa seem to be more resistant to freezing damage than the spermatozoa of other domestic birds.

Since in the case of avian species neither the oocytes nor the embryos can be frozen due to the high content of non-freezable yolk, the long term conservation of the early embryonic cells (BCs and PGCs) is the only way to preserve the whole genetic material. In these methods the collection of cells from the donor eggs, their freezing/thawing and the injection of them into the germinal discs or the dorsal aorta of the fertile recipient eggs mean big challenges for the researchers. Presently, by the manipulation with early embryonic cells the rate of donor derived progenies is highly variable.

For long term maintenance of the female genome the only possibility is the dissection, freezing/thawing and grafting of the ovary of donor day old chickens into the recipient ones with the same age. This method is the newest and most complicated, however, really promising way of the avian gene conservation. Nowadays, the applications of all the mentioned methods in the gene conservation programs are achievable.

BAROMFI

A biodiverzitás fenntartására való törekvés világviszonylatban mind a növény-, mind az állatvilágot illetően ma már mindenki számára elfogadott igény. A kihalt és kihalással fenyegető fajok száma az elmúlt évszázadoktól napjainkig növekvő tendenciát mutat, a ritka gének megmentése a jövő számára kiemelkedő feladatunk (17).



1. ÁBRA. A genetikai anyag megőrzésének lehetséges módjai

FIGURE 1. Possible methods of preservation of genetic material

A baromfifajokra szűkítve a téma fontosságára a '90-es évek elején Rómában egy FAO szakértői konzultáció keretében hívták fel a figyelmet, ahol CRAWFORD kanadai kutató foglalta össze először a baromfifélék genetikai erőforrásainak globális helyzetét (14). 1999-ben egy részletesen kidolgozott baromfi génmegőrzési stratégiai javaslat született az USA és Kanada térségére, amely később alapul szolgált a globális teendők kialakításához is (37).

A FAO legfrissebb jelentése szerint az állatfajok 8%-a kihalt és 22%-a kihalással fenyeget. Ezen belül a madárfajok 24%-a, azon belül pedig a házityúkfaják 32%-a kritikusan veszélyeztetett kategóriában van. Csak az elmúlt 10 évben 14 tyúkfajta tűnt el véglegesen a földről (15). Mindezek alátámasztják a szükségességét olyan intenzív fejlesztéseknek, amelyek a minél hatékonyabb konzervációs stratégiák kialakítását eredményezik.

A génmegőrzési lehetőségeket, ill. annak legújabb nomenklatúráját az 1. ábra szemlélteti. Alapvetően két formát különböztetünk meg (1): az élő populációk fenntartását (*in situ* és *ex situ in vivo* módszer), ill. (2) az ivari anyag mélyhűtött formában történő hosszú távú megőrzését (*ex situ in vitro* módozat).

EURÓPAI ÉS HAZAI HELYZETKÉP

Az Állati Genetikai Források Európai Regionális Központja az őshonos állatok konzervációjával és fenntartásával foglalkozik

A nemzetközi példákat követve Magyarországon is szükségessé vált regisztrált nemzeti *in vitro* génbank kialakítása haszonállatok megőrzése céljára

Az *in vitro* génmegőrzés témájában európai szinten 2000-ben indult el a szerveződés. 2003-ban Párizsban tartották az első workshopot, amelyet az Állati Genetikai Források Európai Regionális Központja [European Regional Focal Point (ERFP) for Animal Genetic Resources (AnGR)] szervezett és támogatott. A szervezet, amely a FAO része, 2000-ben alakult azzal a céllal, hogy szorosabb és hatékonyabb együttműködésre ösztönözze az európai államokat, valamint támogassa azokat a nemzeti programokat, amelyek az őshonos állatok konzervációjával és fenntartásával foglalkoznak. Napjainkban más-más szintű és hatékonyságú erőfeszítések történnek a vad-, ill. a háziasított állatfajok esetében, sőt az emlős és madárfajok genetikai anyagának konzervációja is eltérő stratégiákat igényel.

Európában jelenleg Franciaország és Hollandia rendelkezik regisztrált nemzeti kriobankkal a '90-es évek elejétől, de egyre több országból hallani a rendszerbe még be nem kapcsolódott, de már működő kriobankokról őshonos és ritka haszonállatok génállományának megőrzésére (Spanyolország, Németország, stb.) (9, 39, 58).

Egyértelmű, hogy a fenti példákat követve Magyarországon is szükségessé vált regisztrált nemzeti *in vitro* génbank kialakítása haszonállatok megőrzése céljára, intézetünk az őshonos baromfi kriobank létesítésével vesz részt ebben a tevékenységben.

A gödöllői Haszonállat-génmegőrzési Központ (HÁGK) elsődleges feladata az őshonos és régen honosult magyar baromfifajok és fajták, valamint a krajnai méh

2. ÁBRA. HáGK In vitro génmegőrzési laboratórium hűtőhelyisége

FIGURE 2. Cold room of the Laboratory for In vitro Gene Conservation in HáGK



A genetikai anyag élő állományok formájában való megőrzése a legtermészetesebb, de a legsérülékenyebb módszer is egyben

A biztonságos fennmaradáshoz elengedhetetlen az ivarsejtek, valamint az embrionális sejtek hosszú távú megőrzése mélyhűtött formában

pannon változatának *ex situ in vivo* fenntartása nukleuszpopulációkban. 2010 óta ez a tevékenység őshonos emlős haszonállatfajok *in vivo* megőrzésével bővült. A ritka és értékes genetikai anyag megőrzésének legteljesebb, legtermészetesebb és legkézenfekvőbb módja e populációk élő állományok formájában való fenntartása, annak összes előnyével és hátrányával. A hátrányok elsősorban az élő populációk sérülékenységében vannak, a környezeti ártalmak, a hiányos tartási körülmények, a helyi, ill. természeti katasztrófák valamint a járványos megbetegedések megtizedelhetik az állományokat, rosszabb esetben ki is pusztulhat egy-egy nukleuszpopuláció.

Mindezekből egyértelműen következik, hogy a genetikai anyag biztonságos fenntartásának elengedhetetlen része az ivarsejtekben, valamint az embrionális sejtekben tárolt információk hosszú távú megőrzése mélyhűtött formában (*ex situ in vitro* konzerváció).

2012-ben uniós, valamint hazai támogatással, külső-belső felújításra és átalakításra került a HáGK *In vitro* Génmegőrzési és Szaporodásbiológiai Laboratóriuma. A szakmai előírásoknak megfelelően kialakítottuk azt a hűtött helyiséget, ahol a mélyhűtési folyamatok megvalósíthatók, valamint a minták tárolhatók. Két mélyhűtő berendezéssel (PLANER Kryo-10, angol és DIGITCOOL IMV, francia gyártmányú készülékek), és az ezeket ellátó nitrogéntartályokkal rendelkezünk, valamint a legújabb beszerzésű CBS gyártmányú (USA), automata utántöltésű, 4600 minta hosszú távú tárolására alkalmas tárolóegységgel, amelyhez szintén kapcsolódik egy 210 literes utántöltő nitrogéntartály (2. ábra). Laboratóriumunkban rendelkezésre állnak a minták mélyhűtésének előkészítéséhez szükséges eszközök és berendezések, valamint az itt dolgozók sokéves szakmai tapasztalata is.

A hazai baromfi kriobank kialakítása Gödöllőn az őshonos magyar baromfifajták spermájának tárolásával indult (250–300 minta/faj, ill. fajta) 2013-ban, továbbá folyamatban van e fajok embrionális sejtjeinek és korai ivarszerveinek hosszú távú tárolása is. A jövőben szándékunkban áll bővíteni a tevékenységet (valamint a tárolókapacitást) a genetikai szempontból értékes kereskedelmi baromfifajták, vonalak és hibridek bizonyos genetikai anyagának (sperma, DNS) tárolásával is.

IN VITRO GÉNMEGŐRZÉS – A MODERN „NOÉ BÁRKÁJA”

Emlősök esetében a genetikai anyag hosszú távú tárolásában már jelentős előrehaladás történt az elmúlt 50 évben. A hímivar oldaláról a spermiumban található haploid genom mélyhűtött tartósítása sok faj esetében megoldottnak tekinthető, emellett a petesejt, ill. a barázdálódásnak indult embriók vitrifikációs módszerrel végzett tartósítása ma már bevált gyakorlat (13, 51).

A HÍMIVARÚ MADARAK GENETIKAI ANYAGÁNAK HOSSZÚ TÁVÚ MEGŐRZÉSE

A madárondó mélyhűtése

Madaraknál, ellentétben az emlősökkel, a hímivar rendelkezik a homogametikus ZZ kromoszómával, míg a nőivar a heterogametikus ZW kromoszómapárral. Mivel a spermiumok esetében csak a haploid genetikai anyagot tudjuk megőrizni, ezért az eredeti genom rekonstruálásához 6–8-szoros visszakeresztezésekre van szükség (9).

A baromfifélék spermamélyhűtésével a múlt század '70-es éveitől kezdtek intenzívebben foglalkozni, jóllehet az első sikeres spermamélyhűtést – glicerol alkalmazásával – éppen kakasspermával végezték 1951-ben, ami – mint minden jelentősebb felfedezés – a véletlennek volt köszönhető (38). A kriobiológia mint tudomány megjelenését ennek a felfedezésnek köszönhetjük. Ezt követően egyre több kutatócsoportban folytattak baromfisperma mélyhűtését célzó kutatásokat, amelyekről számos áttekintés beszámol (5, 9, 19, 24, 47). Az első sorban tapasztalati úton fejlesztett mélyhűtési protokollok kidolgozásánál és alkalmazásánál szem előtt kell tartani, hogy a különböző baromfifajok más-más ondóhígítót, hűtési rátát és krioprotektánst igényelnek, a sikeres mélyhűtési módszer tehát fajspecifikus (21). Két biofizikai tényező – a spermiumok ozmotikus stresszel szembeni ellenálló képessége és a membránfluiditása – hozható kapcsolatba az egyes fajok mélyhűtéssel szembeni eltérő toleranciájával (7, 8).

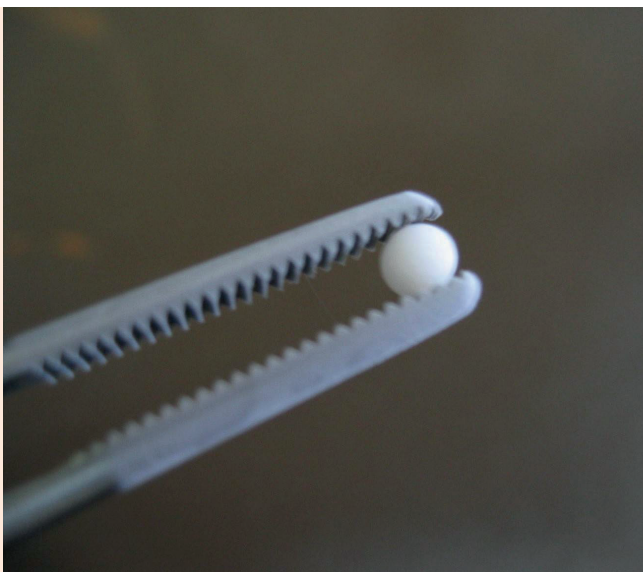
Az őshonos tyúkfajták spermiumainak génbanki tárolására Európában jelenleg két módszert adaptáltak (16): az egyik glicerol használatával és egy lassú hűtési rátával (7 °C/perc) (9), a másik dimetil-acetamid (DMA) krioprotektánszal és egy mag-

sabb hűtési rátával (kb. 200 °C/perc) működik (59). A többi baromfifaj ondómélyhűtésére egyelőre nincs hivatalosan ajánlott eljárás, erre az egyes laboratóriumok saját protokollokat használnak, hasonlóan egyes nem háziasított madárfajok esetében, ahol szintén sikerült már élő utódokat produkálni mélyhűtött sperma alkalmazásával (6).

A kutatások során bebizonyosodott, hogy a madárspermiumok esetében az ultragyors hűtési technikák jobban működnek, mint a lassú fagyasztási protokollok (3. ábra). Ennek egyik magyarázata, hogy a madárspermiumok intracelluláris víztartalma nagyon kicsi összevetve egyéb gerinces fajok spermiumaival, ami kedvez a folyékony állapot üvegszerű dermedésének (vitifikáció), ha a hűtési ráta elég gyors ehhez (10, 50). A mélyhűtött madárondó termékenyítőképessége egyes szerzők állítása szerint a friss ondónak csupán 1,6%-a, amelynek hátterében többek között a madarakra jellemző élettani és szaporodásbiológiai különbségek állnak (30). Ezek közül kiemelendő a petevezetőben található spermiumtároló tubulusok szerepe, amelyekben szigorú szelekció eredményeképpen csupán a spermiumok 1-2%-a rakódik be (ún. fitt spermiumok) az inszeminálást követően (1). Emellett – eltérően

Madaraknál a hímivar rendelkezik a homogametikus ZZ, míg a nőivar a heterogametikus ZW kromoszómapárral

A különböző baromfifajok más-más ondóhígítót, hűtési rátát és krioprotektánst igényelnek, a sikeres mélyhűtési módszer tehát fajspecifikus



3. ÁBRA. Ultragyors ondómélyhűtés pellet formában

FIGURE 3. Sperm cryopreservation in pellet form

A gyöngytyúkspermiumok kevésbé tolerálják a mélyhűtést, mint a házityúk-, ill. a pulyka-hímivarsejtek

A hímivar genetikai anyagának megőrzésére alternatív lehetőség a hereszövet tartós tárolása

Madarak esetében a petesejt összetett szerkezete, mérete, biofizikai tulajdonságai nem teszik lehetővé annak mélyhűtését

Napjainkra sikerült hatékony módszert kidolgozni madarak petefészkekének mélyhűtésére és transzplantációjára

az emlősöktől, ahol a mélyhűtött, felolvasztott spermiumnak csak néhány órát kell életben maradnia a termékenyítésig – a madarak petevezetőjében tárolódó spermiumoknak a mélyhűtést követően akár 1 héttel is képesnek kell lennie termékenyítésre.

A gyöngytyúkspermiumok az eltérő membránszerkezetüknek köszönhetően kevésbé tolerálják a mélyhűtést, mint a házityúk-, ill. a pulyka-hímivarsejtek, amit saját tapasztalatainkkal is megerősíthetünk. Laboratóriumunkban sikeres mélyhűtési protokollok kidolgozása történt az utóbbi években elsősorban gyöngytyúk- és lúdspermiumokkal (3, 53).

A hereszövet tartós tárolása

A hímivar genetikai anyagának megőrzésére alternatív lehetőség a hereszövet tartós tárolása olyan – elsősorban a ritka, kevés egyedszámú, ill. vad – fajok esetében, ahol az ondóminőség gyenge ahhoz, hogy mélyhűthető legyen, vagy nincs lehetőség ismételt ondóvételekre és inszeminálásokra a rövid szaporodási időszak, ill. a spermagyűjtéssel járó kedvezőtlen stresszhatás miatt (6). Továbbá, tekintettel arra, hogy spermatogoniumok bármilyen korú herében jelen vannak, annak mélyhűtött tárolásával lehetőség van egy-egy értékes egyed hím genetikai anyagának megőrzésére akár egy váratlan elhullás esetén is. Kanadai kutatócsoportok vizsgálatai igazolták, hogy a donor naposcsibe hereszövetének a recipiens madár bőre alá, ill. hasüregbe történő átültetésével, majd annak kipreparálásával donortól származó spermium nyerhető az ivarérettség elérésekor, amelyeknek a petevezető magnum szakaszába történő inszeminálásával termékeny tojások állíthatók elő (26, 43). Az átültetett hereszövet biztosabb megtapadásának feltétele a recipiens herék transzplantációval egy időben történő eltávolítása. Egy másik kutatócsoport vizsgálatai alapján, a korábban gamma-sugárzással sterilizált kakasok esetében, 9 héttel a transzplantáció után megkezdődik az átültetett here spermium termelése (49). Sikeres naposkori hereszövettel végzett mélyhűtési eljárásokat igazolt már saját laboratóriumunk is (25).

NŐIVARÚ MADARAK GENETIKAI ANYAGÁNAK HOSSZÚTÁVÚ MEGŐRZÉSE

Petefészek szövetek mélyhűtési tartósítása

Madarak esetében a nőivar genetikai anyagának megőrzésére is több alternatíva létezik, amelyből az egyik célszerűen a korai petefészek tartós tárolása, mivel a petesejt összetett szerkezete, mérete a nagy tömegű szikanyag, ill. biofizikai tulajdonságai miatt nem teszik lehetővé annak mélyhűtését. A naposkori petefészek a petesejtek kiindulási fejlődési alakjait, az oogoniumokat, valamint a primer oocytákat tartalmazza, így annak mélyhűtése, majd felolvasztása után recipiens csibébe való transzplantációját követően a megtapadt petefészek az ivarérettség követően a donortól származó petesejteket fog termelni.

Bár házityúk petefészkekének átültetésére már a 20. század elején történtek próbálkozások (12, 18), majd fürjjeccék petefészkekének átültetésével is kísérleteztek (11), csak napjainkra sikerült hatékony módszert kidolgozni madarak petefészkekének mélyhűtésére és transzplantációjára (23, 44, 45, 46).

Kezdetben a hímivarsejtek mélyhűtésénél alkalmazott lassú, programozott protokollokat használták korai ivarszervszövetek mélyhűtésére, majd egyre inkább előtérbe került a vitrifikációs eljárások alkalmazása. Az emlőspetefészkekkel végzett egyre hatékonyabb vitrifikációs eljárásokat (58) adaptálták később a madárpetefészkek tartósítására is, majd a lassú, programozott és a fenti vitrifikációs eljárás hatékonyságát hasonlították össze japán fürj petefészkek mélyhűtésénél (29). A vitrifikációval mélyhűtött petefészkek életképesebbek voltak, több morfológiailag normális tüszőt tartalmaztak és a recipiens donor eredetű utódokat produkáltak. Megállapították továbbá, hogy sem a fenti mélyhűtési eljárás,

sem az átültetés nem befolyásolja negatívan a recipiens csibék növekedését és későbbi tojástermelését (27). A módszert sikeresen alkalmazták tyúkpetéfészkek mélyhűtéses tartósítására is, a transzplantációt követően donor eredetű utódokat produkáltak (28). Ugyanez a kutatócsoport sikeresen továbbfejlesztette az előbbi módszert, amely során a petefészkekdarabokat tartalmazó akupunktúrás tűket fagyasztócsövek helyett műszalmákba helyezték a hatékonyabb génbanki tárolás érdekében (26). Ennek köszönhetően Kanadában és az USA-ban napjainkban ezt a módszert alkalmazzák a madár-ivarszervszövetek tárolásához a génmegőrzési programokban.

Kutatócsoportunk szintén végzett sikeres naposkori ivarszerv-transzplantációt (25) és mélyhűtések is WANG és mtsai (2008) módszerének adaptálásával, ahol akupunktúrás tűre helyeztük a petefészkek-, ill. hereszövetdarabokat, és így kerültek közvetlenül folyékony nitrogénbe, majd fagyasztócsövekbe (4. ábra) (58). A mélyhűtés sikerességét szövettani és szövettenyésztési vizsgálatokkal igazoltuk (52).

MADARAK TELJES GENETIKAI ANYAGÁNAK MEGŐRZÉSE

Mivel mind a spermiumok, mind a petefészkekben levő oogóniumok esetében csak a haploid genetikai anyagot tudjuk tárolni, korábban már megindultak a vizsgálatok a madár embrionális sejtekben levő teljes genetikai anyag megőrzésének céljából. Kétféle embrionális sejtípus hosszútávú tárolására van lehetőség:

1. Blasztodermális sejtek

A frissen letojott termékeny tojásokban az embrionális fejlődés blasztoderma és korai gasztrula állapotban van, ezeknek a pluripotens sejteknek a száma tyúkfajban 40–60 ezer (5. ábra). Ebben a sejtpopulációban már megvannak az őscsírasejtek előfutárai, ezért ezeknek a sejteknek friss recipiens tojásba való juttatásával elérhető, hogy az utódok ivarsejtjei a donortól származzanak (6. ábra).

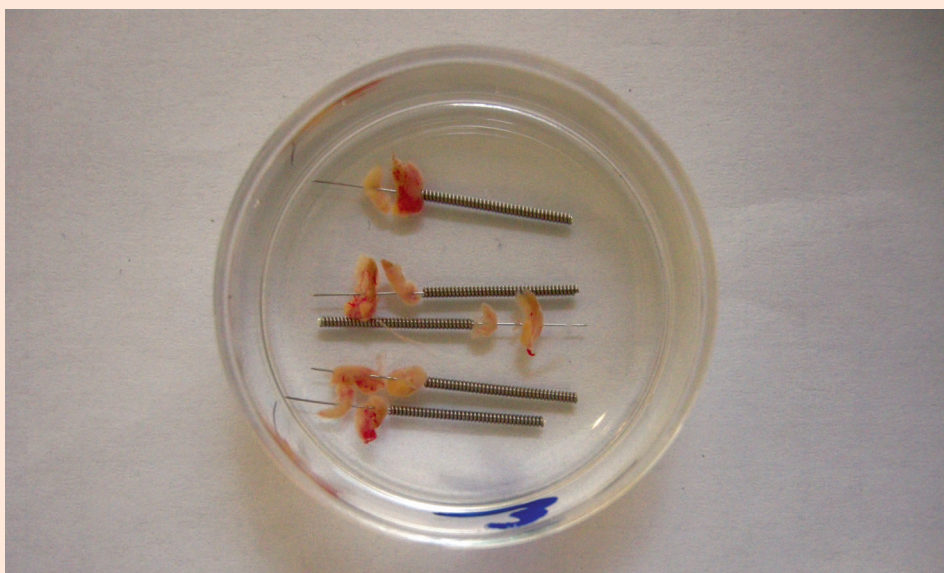
2. Primordiális csírasejtek

A másik sejtípus, ami alkalmas a genetikai anyag visszanyerésére, az az inkubáció korai szakaszában (tyúkfajban a 2,5–3. napon) az embrionális véráramba került cirkuláló (cPGC), vagy a fejlődés 5. napján a már kolonizált őscsírasejt (GGC). Ezek kinyerésével és azonos korú recipiens embrió vérkeringésébe juttatásával szintén megvalósítható a donortól származó ivari anyag fenntartása (7. ábra) (33, 34). Mindezen eljárások célja ivarszervi/csíravonalas kimérák előállítása. A kimérák két vagy több eltérő genotípusú sejtvonalból álló szervezetek, amelyek természetes úton is létrejöhetnek és mesterségesen is előállíthatók. Amennyiben a megőrzendő (donor) sejtek az ivarszerv kialakításában is részt vesznek, ivarszervi kimérákról beszélhetünk. Az ivarszervi kimérák kétféle genotípusú (Z, ill. W kromoszómát tartalmazó) ivarsejtet termelhetnek, tehát ha mindkét szülő ivarszervi kiméra, akkor párosításukból tisztán a donorfajta genetikai állományával rendelkező utódokat kaphatunk, amellyel megvalósul a megőrizni kívánt fajta genotípusának visszanyerése. Ennek elvét a 8. ábra mutatja be. Az ivarszervi kimérizmus igazolásához előzetesen mind a donor, mind a recipiens egyednél DNS-markervizsgálatot kell végezni, majd az utód ivari anyagának beazonosítása hasonló módszerrel elvégezhető.

A HÁGK-ban évek óta folynak kísérletek házityúk és egyéb baromfifajok friss embrionális blasztoderma-sejtek segítségével történő kiméra előállítására, igen jó eredményekkel (2, 20, 48, 54, 55, 56, 57). Ahhoz azonban, hogy az adott fajta genetikai anyagát később is visszanyerhessük, szükség van a blasztodermális sejtek mélyhűtésére (22). Házityúk- (22, 35, 36, 40) és fűrj- (33, 34) fajokban több kutatócsoport is beszámolt blasztodermális sejtek sikeres mélyhűtéséről.

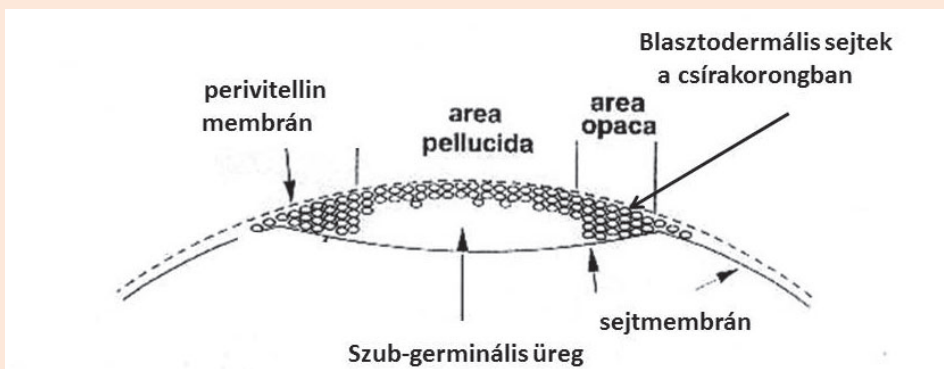
4. ÁBRA. Akupunktúrás tűre helyezett korai petefészek- és hereszövetek közvetlenül a mélyhűtés előtt

FIGURE 4. Application of acupuncture needles for vitrification of early ovarian and testicular tissues



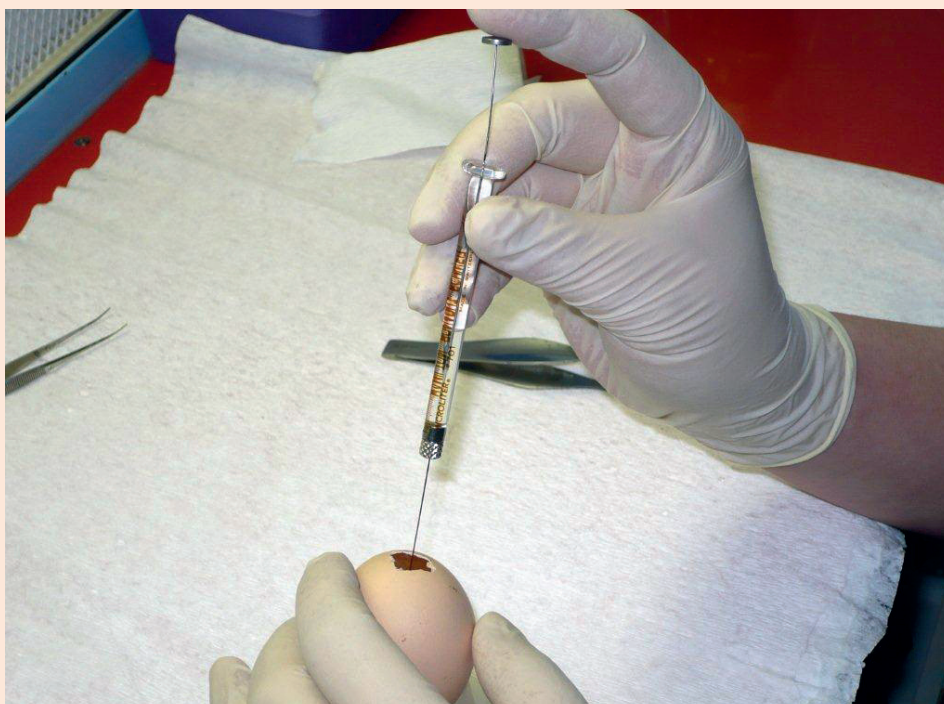
5. ÁBRA. A blasztodermális sejtek elhelyeződése a frissen tojás csírákorongjában

FIGURE 5. Placement of the blastodermal cells (BCs) in the germinal disk of the freshly laid egg



6. ÁBRA. Blastodermális sejtek injektálása a recipiens tojás csírákorongjába

FIGURE 6. Injection of BCs into the germinal disk of the recipient egg



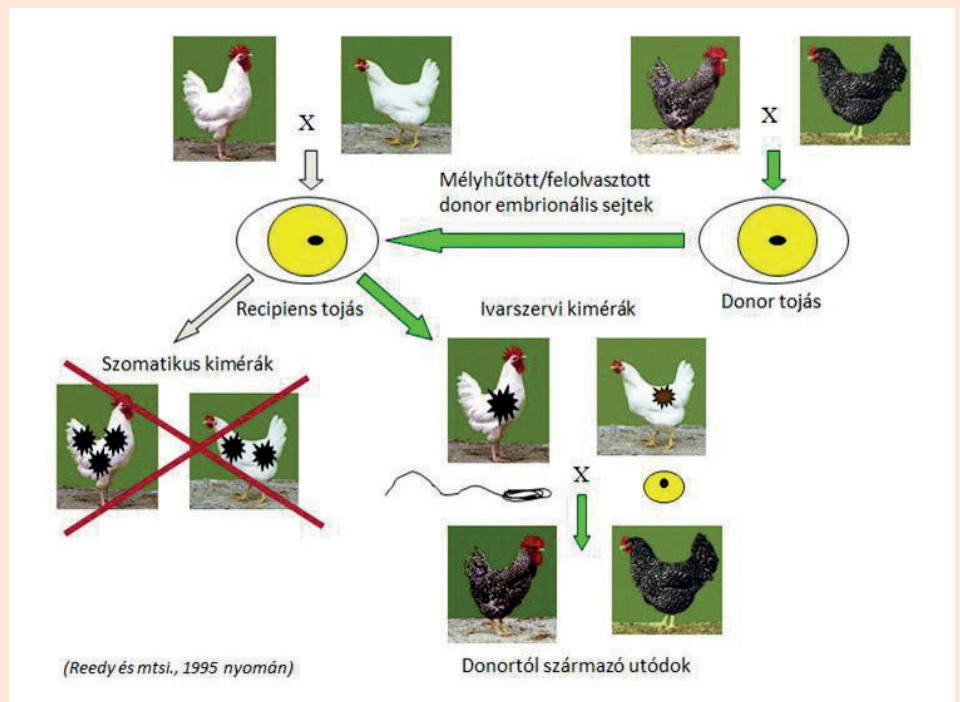
7. ÁBRA. Őscsírasejtek injektálásának helye a recipiens embrió dorsalis aortájába

FIGURE 7. Place of the injection of PGCs into the dorsal aorta of recipient embryo



8. ÁBRA. A teljes genom megőrzésének sematikus ábrája

FIGURE 8. Sematic figure of the preservation of the complete genome



Már a 2000-es években megkezdődtek a primordiális őscsírasejtek (PGC) mélyhűtésével kapcsolatos kutatások is (4, 31, 32, 36, 42), azonban egy megfelelően hatékony és reprodukálható mélyhűtési technika kidolgozása, amelynek segítségével donortól származó utódot nyerhessünk, még folyamatban van. Emellett kidolgozásra vár ezen sejtek minél nagyobb arányú kinyerésének, tisztításának és sejtenyészetekben való hosszú távú eltarthatóságának kidolgozása.

JÖVŐBELI IRÁNYVONALAK

A sikeres konzervációs programok célja, hogy a hosszú távon megőrzendő genetikai anyag minél nagyobb arányban túlélje a mélyhűtési procedúrát és alkalmas legyen olyan utódok előállítására, amelyek reprezentálják a megőrzött genetikai diverzitást.

Madárfajok esetében az elkövetkező 10–15 évben még elsődleges lesz az ondósejtek mélyhűtési tárolása, számos fajnál még ezek az eljárások is további

A komplex genetikai anyag megőrzésének legígéretesebb módja lesz hamarosan a primordiális őscsírasejtek hatékony izolálása, mélyhűtése

fejlesztésre szorulnak. Nagy jelentőségű és tovább fejlesztendő a nőivari W kromoszóma megőrzésében a petefészekszövet tartósításának, transzplantációjának tökéletesítése, valamint a fajták közötti összeférhetetlenség okainak tisztázása.

Egyes kutatók szerint a komplex genetikai anyag megőrzésének legígéretesebb módja lesz hamarosan a primordiális őscsírasejtek (PGC) hatékony izolálása, mélyhűtése, amelyek aztán kimérák formájában visszanyerhetőek lesznek. Ez az irányvonal mostanában kezd a kutatások előterébe kerülni, ígéretes eredményekkel.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozunk a HÁGK Genetikai és Szaporodásbiológiai Kutatócsoportja dolgozóinak (VÉGI BARBARA, VÁRADI ÉVA, BODZSÁR NÓRA, SZTÁN NIKOLETTA, DROBNYÁK ÁRPÁD) az *in vitro* génmegőrzés témájában végzett kutatómunkájukért

A kutatásokat a TET_09_FR_ANR_BIO-CryoBird (2010–2013) bilaterális francia-magyar pályázat, valamint a KTIA_AIK_12-1-2013-0002 „Alternatív biotechnológiai módszerek bevezetése a magyar *in vitro* baromfi- és nyúl génbank fejlesztése céljából” című pályázat támogatta.

IRODALOM

- BAKST, M. R. – WISHART, G. J. – BRILLARD, J. P.: Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.*, 1994. 5. 117–143.
- BARNA J. – HIDAS A. – SZALAY I. – VÁRKONYI E.: Baromfifélék ivarsejtjeinek mélyhűtéses tárolása, mint *ex situ* génmegőrzés. *Állatteny. Tak.*, 2002. 51. 74–76.
- BARNA, J. – VÉGI, B. – VÁRADI, É. – LIPTÓI, K.: Comparative study on cryopreservation procedures of gander sperm. Proc. XIII European Poultry Conference, 23–27 August 2010. Tours, France. *J. World's Poult. Sci.*, 2010. 66. 508.
- BEDNARCZYK, – M. CHOJNACKA–PUCHTA, L. et al.: Effectiveness of transgenic chickens production by non-viral, cell-based method. Proc. International Forum on Avian Germplasm. 2013. 25–28 October, Seoul National University, Korea. 35–36.
- BELLAGAMBA, F. – CEROLINI, S. – CAVALCHINI, L. G.: Cryopreservation of poultry semen: a review. *J. World's Poult. Sci.*, 1993. 49. 157–166.
- BLANCO, J. M. – WILDT, D. E. et al.: Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, 2009. 71. 200–213.
- BLANCO, J. M. – GEE, G. et al.: Species variation in osmotic, cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and falcon spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 2000. 63. 1164–1171.
- BLESBOIS, E. – GRASSEAU, I. – SEIGNEURIN, F.: Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction*, 2005. 129. 371–378.
- BLESBOIS, E.: Current status in avian semen cryopreservation. *J. World's Poult. Sci.*, 2007. 63. 213–222.
- BLESBOIS, E.: Freezing avian semen. *Avian Biol. Res.*, 2011. 4. 52–58.
- BRARD, E. – BENOIT, J.: Sterilization of quails by x-rays and inter-racial gonad grafts. *Bull. Biol. de la France et de la Belgique*, 1966. 103. 313–321.
- DAVENPORT, C. B.: The transplantation of ovaries in chickens. *J. Morphol.*, 1911. 22. 111–122.
- DOBRYNSKY, J. R.: Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 2002. 5. 285–302.
- FAO Expert Consultation: Management of global animal genetic resources. R. D. CRAWFORD (Kanada): *A global review of the genetic resources of poultry*, 1992. Rome.
- FAO Report. Status And Trends Of Animal Genetic Resources. 14th Session, 2013. Rome.
- FAO: Cryoconervation of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines*, No. 12. 2012. Rome.
- FAO: Interlaken Declaration on Animal Genetic Resources. *Global Plan of Action for Animal Genetic Resources*. 2007. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1404e/a1404e00.pdf>
- GROSSMAN, M. – SIEGEL, P. B.: Orthotopic ovarian transplants in chickens. *Poult. Sci.*, 1966. 45. 1434–1436.
- HAMMERSTEDT, R. H.: Cryopreservation of Poultry Semen – Current status and Economics. In: Proceedings First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association. Savoy, Illinois, USA. 1995. 229–250.
- HÉJJA I. – VÁRKONYI E. – ZÖLDÁG L. – BARNA J.: Génmegőrzés lehetősége kimérizmussal pulykában. (előzetes közlemény) *Magy. Állatorv. Lapja*, 2006. 128. 351–357.
- HOLT, V. W.: Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000. 62. 3–22.
- KINO, K. – PAIN, B. et al.: Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poult. Sci.*, 1997. 76. 753–760.
- KOSENKO, O. V. : Orthotopic Transplantation of Donor Ovary as an Alternative Method of Artificial Reproduction of Fowl. *Russ. Agri. Sci.*, 2007. 43. 189–192.
- LAKE, P. E. – STEWART, J. M.: Preservation of fowl semen in liquid nitrogen – improved method. *Br. Poult. Sci.*, 1978. 19. 187–194.
- LIPTÓI, K. – HORVÁTH, G. – GÁL, J. – VÁRADI, É. – BARNA, J.: Preliminary results of the application of gonadal tissue transfer in various chicken breeds in the poultry gene conservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 2013. 141. 86–89.

26. LIU, J. – CHENG, K. M. et al.: A simple vitrification method for cryobanking avian testicular tissue. *Poult. Sci.*, 2012. 91. 3209–3213.
27. LIU, J. – CHENG, K. M. – SILVERSIDES, F. G.: A model for cryobanking female germplasm in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Poult. Sci.*, 2013a. 92. 2772–2775.
28. LIU, J. – ROBERTSON, M. C. et al.: Chimeric plumage coloration produced by ovarian transplantation in chickens. *Poult. Sci.*, 2013b. 92. 1073–1076.
29. LIU, J. – SONG, Y. et al.: Production of Donor-Derived Offspring from Cryopreserved Ovarian Tissue in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Biol. Reprod.*, 2010. 83. 15–19.
30. LONG, J. A.: Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges. *Poult. Sci.*, 2006. 85. 232–236.
31. NAKAMURA, Y. et al.: Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken. concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). *Reprod. Fertil. Dev.*, 2010. 22. 1237–1246.
32. NAKAMURA, Y. et al.: X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGC in chimeric chickens. *J. Reprod. Dev.*, 2012. 58. 432–437.
33. ONO, T. – YOKOI, R. – AOYAMA, H.: Transfer of male or female primordial germ cells of Quail into chick embryonic gonads. *Exp. Anim.*, 1996. 45. 347–352.
34. ONO, T. – MATSUMOTO, T. – ARISAWA, Y.: Production of donor-derived offspring by transfer of primordial germ cells in Japanese Quail. *Exp. Anim.*, 1998. 47. 215–219.
35. PATAKINÉ VÁRKONYI, E. – HORVÁTH, G. – SZTÁN, N. – VÁRADI, É. – BARNA, J.: Vitrification of early avian blastodermal cells with a new type of cryocontainer. *Acta Vet. Hung.*, 2012. 60. 501–509.
36. PETTITE, J. N.: Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cells? *Poult. Sci.*, 2006. 85. 237–242.
37. PISENTI, J. M., – DELANY, M. E. et al.: *Avian Genetic Resources at Risk: An Assessment and proposal for conservation of genetic stocks in the USA and Canada*. University of California Div. Agriculture and Natural Resources. Genetic resources conservation program, Davis CA, USA, 1999. 25–29.
38. POLGE, C.: Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. *Nature*, 1951. 167. 949–950.
39. SANTIAGO-MORENO, J., CASTAÑO, C, TOLEDANO-DÍAZ et al.: Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poult. Sci.*, 2011. 90. 2047–2053.
40. SAWICKA, D. – BRZEZIŃSKA, J. – BEDNARCZYK, M.: Cryoconservation of embryonic cells and gametes as a poultry biodiversity preservation method. *Fol. Biol. (Krakow)*, 2011. 59. 1–5.
41. SAWICKA, D. – CHOJNACKA-PUCHTA, L. et al.: Cryoconservation of chicken blastodermal cells: effects of slow freezing, vitrification, cryoprotectant type and thawing method during *in vitro* processing. *Fol. Biol. (Krakow)*, 2015. 63. DOI:103409/fb63_2.129.
42. SILVERSIDES, F. G. – LIU, J.: Novel techniques for preserving genetic diversity in poultry germplasm. *CAB Rev.*, 2012. 7. No. 068.
43. SONG, Y. – SILVERSIDES, F. G.: Heterotopic transplantation of the testes in newly hatched chickens and subsequent production of offspring via intramaginal insemination. *Biol. Reprod.*, 2007a. 76. 598–603.
44. SONG, Y. – SILVERSIDES, F. G.: Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries. *Poult. Sci.*, 2007b. 86. 107–111.
45. SONG, Y. – SILVERSIDES, F. G.: The technique of orthotopic ovarian transplantation in the chicken. *Poult. Sci.*, 2006. 85. 1104–1106.
46. SONG, Y. – CHENG, K. M. et al.: Production of donor-derived offspring after ovarian transplantation between Muscovy (*Cairina moschata*) and Pekin (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Poult. Sci.*, 2012. 91. 197–200.
47. SURAI, P. F. – WISHART, G. J.: Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *J. World's Poult. Sci.*, 1996. 52. 27–43.
48. SZTÁN, N. – PATAKINÉ VÁRKONYI, E. – LIPTÓI, K. – BARNA, J.: Baromfifajok embrionális sejtjeinek kezelésével szerzett tapasztalatok. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2012. 134. 475–481.
49. TREFIL, P. – BAKST, M. R. et al.: Restoration of spermatogenesis after transplantation of c-Kit positive testicular cells in the fowl. *Theriogenology*, 2010. 74. 1670–1676.
50. TSELUTIN, K. – SEIGNEURIN, F. – BLESBOIS, E.: Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Sci.*, 1999. 78. 586–590.
51. VAJTA, G. – KUWAJAMA, M.: Improving cryopreservation systems. *Theriogen.*, 2006. 65. 236–244.
52. VÁRADI, É.: *Hímivarsejtek és korai ivarszerv-szövetek mélyhűtéses tartósításának fejlesztése baromfifajokban génmegőrzési célokból*. Doktori ért. SZIE. Gödöllő, 2016.
53. VÁRADI, É. – VÉGI, B. – LIPTÓI, K. – BARNA, J.: Methods for Cryopreservation of Guinea Fowl Sperm. *Plos One*, 2013. 8. e62759.
54. VÁRKONYI, E. – HIDAS, A. – SZALAY, I.: *Embryo manipulation of chicken chimaeras*. Xth Roundtable Conference on Animal Biotechnology. Kosice, Slovak Republic. 1994. Oct. 11–12.
55. VÁRKONYI, E. – HIDAS, A. – SZALAY, I.: *Production of chicken chimaeras by blastoderm cell transfer*. Proc. First Egyptian–Hungarian Poultry Conference, 1995. 17–19 September, Alexandria, Egypt. Part I, 10–13.
56. VÁRKONYI, E. – HIDAS, A. – SZALAY, I.: *Manipulations of poultry embryonic cells*. Applied Science Reports of Current Problems in Avian Reproduction International Scientific Symposium. 24–26th of April, 1997. Wroclaw, Poland. Vol. 31. 240–241.
57. VÁRKONYI, E.: *Using of new methods in the poultry breeding and the gene preservation*. Proc. XX. World's Poultry Congress and Exhibition. 2–8 September 1996. New Delhi, India. Vol. IV. p. 14.
58. WANG, Y. – XIAO, Z. et al.: Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 2008. 23. 2256–2265.
59. WOELDERS, H. – ZUIDBERG, C. A. – HIEMSTRA, S. J.: Animal genetic resources conservation in The Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poult. Sci.*, 2006. 85. 216–222.

Közlésre érk.: 2016. márc. 17.