

Cryopreservation of embryonic blastodermal cells of a valuable domestic poultry breed, the Hungarian landrace guinea fowl (*Numida meleagris*) as a biodiversity preservation method

Patakiné Várkonyi Eszter^{1*}
Molnár Mariann^{1,2}
Sztán Nikolett¹
Váradiné Éva¹
Végi Barbara¹
Pusztai Péter²

E. Patakiné Várkonyi^{1*}
M. Molnár^{1,2}
N. Sztán¹
É. Váradiné¹
B. Végi¹
P. Pusztai²

1. Haszonállat-génmegőrzési Központ
2100 Gödöllő, Isaszegi út 200.

* e-mail: varkonyi.eszter@hagk.hu

2. SZIE KEK, Ökológiai és Fenntartható
Gazdálkodási Rendszerek Tanszék
1118 Budapest, Villányi út 29-43.

Egy értékes hazai baromfifajtánk, a magyar parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*) embrionális blasztodermasejtjeinek mély- hűtése génmegőrzés céljából

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők jelen vizsgálatukban bemutatják a magyar parlagi gyöngytyúk korai embrionális sejtjeinek sikeres mélyhűtési technikáját. Az embrionális sejteket kétféle hőmérsékleten gyűjtötték ki, kétféle médiumot és két konténertípust (szalma, ampulla) tesztelték párhuzamosan a programozott mélyhűtés során.

A kapott eredmények alapján a gyűjtési hőmérsékletnek kulcsszerepe van az embrionális sejtek mélyhűthetőségében. A nyolcféle kísérleti protokoll közül a +4 °C-on történő sejtkinyerés, az 5% DMSO + 5% EG krioprotektáns kombináció alkalmazása, ampullás tárolással kombinálva eredményezte a legmagasabb sejttúlélést (70,5%), így ez a protokoll javasolható a gyöngytyúk embrionális sejtek hosszú távú mélyhűtési tárolására.

SUMMARY

Background: In the last 25 years, advances in the manipulation of the early chick-embryo suggest that cryopreservation of blastodermal cells might offer means to preserve the entire genome of poultry species. The deep-freezing protocol of the embryonic cells of the Hungarian landrace Guinea fowl (*Numida meleagris*) was elaborated within the framework of the "Elaboration of alternative biotechnological methods for development of the Hungarian poultry and rabbit *in vitro* gene bank" project grant.

Objectives: The aim of the study was to conserve the whole genetic material in the form of embryonic cells in the *ex situ in vitro* Poultry Gene Bank of the Centre for Farm Animal Gene Conservation. Since germline chimeras can be produced with frozen-thawed embryonic cells, the preserved genotype can be obtained immediately in the F1 generation.

Materials and Methods: During the experiments the cells were collected at different temperatures (+20°C, +4°C), using two combinations of cryo solutions (10% DMSO, 10% FBS, 80% DMEM and 5% DMSO, 5% EG, 10% FBS, 80% DMEM medium) in two types of cryocontainer (straw and ampoule). The viability of cells was examined with Tripán Blue staining during the deep-freezing procedure. Altogether 8 various protocols were tested.

Results and Discussion: Based on our investigations, the collection temperature plays a key role in the deep-freezing process of embryonic cells since the cell collection at +4°C increases the proportion of live cells in the frozen-thawed samples. Although, the cryopreservation in ampoules at any cryoprotectant combination and at any cell collection temperature was better than in straws, the differences were not significant. In summary, among the experimental protocols the cell collection at +4°C, using 5% DMSO and 5% EG cryoprotectant combination in ampoules is the most efficient method (cell surviving 70.5%) for long-term storage of Guinea fowl embryonic cells.

BAROMFI

Napjainkban egyre több szó esik a génmegőrzésről és annak fontosságáról, mivel az intenzív emberi tevékenységek és azok hatásai az élővilágra, környezetünkre egyre sürgetőbb feladattá teszik a kihalófélben levő növény- és állatfajok védelmét és megmentését.

A fenntartható mezőgazdaság fontos célkitűzése az őshonos növény- és állatfajok újraintegrálása a mezőgazdasági termelés nem intenzíven gazdálkodó területeire

Korai embrionális sejtek mélyhűtésével, felolvasztásával, majd ivarszervi kiméra előállításával megőrizhető a teljes genom

A fenntartható mezőgazdaság fontos célkitűzése a mára a gyakorlatból nagy arányban kiszorult őshonos növény- és állatfajok újraintegrálása a mezőgazdasági termelés azon területeire, ahol az intenzív gazdálkodás nem alkalmazható, hiszen a biztonságos génbankok és mintaállományok mellett szükséges a különböző gazdaságokban az adott fajta genetikailag minél változatosabb állományainak fenntartása és bevonása a mezőgazdasági termelésbe.

Ex situ in vitro génmegőrzés keretében korai embrionális sejtek mélyhűtésével, felolvasztásával, majd ivarszervi kiméra előállításával megőrizhető a teljes genom. Az általunk itt bemutatásra kerülő saját vizsgálatok ezt célozzák meg gyöngytyúkfaj esetében.

A kimérák két vagy több eltérő genotípusú sejtvonalból álló szervezetek, amelyek természetes úton is létrejöhetnek, és mesterségesen is előállíthatók (4, 12). Baromfiban szomatikus és csírvonalas kimérákat állíthatunk elő a donor tojások csírákorongjából nyert blasztodermális sejtek recipiens tojásokba történő injektálásával. Amennyiben a megőrzendő (donor) sejtek az ivarszerv kialakításában is részt vesznek, ivarszervi kimérákról beszélhetünk. Az ivarszervi kimérák kétféle genotípusú ivarsejtet termelhetnek, tehát ha mindkét szülő ivarszervi kiméra, akkor párosításukból tisztán a donor fajta genetikai állományával rendelkező utódokat kaphatunk, amellyel megvalósul a megőrizni kívánt fajta genotípusának visszanyerése.

A HÁGK-ban évek óta folynak kísérletek házityúk embrionális sejtek segítségével történő csirke kiméra előállítására, igen jó eredményekkel. Az általunk kidolgozott módszereket (1, 13, 14, 15, 16) szeretnénk gyöngytyúkra is adaptálni.

Ahhoz, hogy az adott fajta genetikai anyagát később visszanyerhessük, szükség van az embrionális sejtek mélyhűtésére (5). Házityúk- (5, 9, 10, 11) és fürj- (6, 7) fajokban több kutatócsoport is beszámolt sikeres embrionális sejt mélyhűtésről, de gyöngytyúkfajban nem tudunk hasonló kutatásokról. Azért is szükséges a lassú mélyhűtési módszerek fejlesztése ebben az esetben, mert a vitrifikációval (8) eltett minták génbanki tárolása nem szerencsés, mivel a tárolt anyag közvetlenül érintkezik a nitrogénnel.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A KÍSÉRLET BEMUTATÁSA

A vizsgálatok során az embrionális sejteket két különböző hőmérsékleten gyűjtöttük ki (+20 °C, +4 °C), majd mindegyikkel 4 kísérletet végeztünk el. Két krioprotektáns kombinációt (10% DMSO, 10% FBS, 80% DMEM, ill. 5% DMSO, 5% EG, 10% FBS, 80% DMEM tápoldat) és két konténertípust (szalma, ampulla) vizsgáltak párhuzamosan a lassú mélyhűtés során, összesen 8 kísérleti elrendezésben (1. táblázat).

Az élő sejtek arányának változását a kísérletek folyamán az 1. ábra, a mélyhűtött-felolvasztott korai embrionális sejtek túlélését a különböző kezelések hatására a 2. ábra mutatja.

KÍSÉRLETI ÁLLATOK

A kísérlet alapanyagául szolgáló termékeny gyöngytyúktojások a gödöllői HÁGK-ban fenntartott, génbanki állományt alkotó magyar parlagi gyöngytyúktól szár-

Két gyűjtési hőmérsékletet, két krioprotektáns kombinációt és két konténertípust vizsgáltak párhuzamosan a lassú mélyhűtés során

maztak (3. ábra). A gyöngytyúkokat 1 : 1 ivararányban telepítették le. Minden fél ólhoz 1400 m² kifutó terület tartozott. A takarmányozás ad libitum granulált tojótáppal történt, folyamatos legelés és ivóvízellátás mellett. A tenyészidőszakban a tojásokat naponta kétszer gyűjtötték és 15 °C-os tojástárolóban tartva tárolták.

A DONOR BLASZTODERMÁLIS SEJTEK STERIL KINYERÉSE

A termékeny, X–XII. stádiumban (2) lévő friss tojások héját alkohollal megtisztítottuk, majd lamináris boxban a feltörést követően elválasztottuk a sárgáját a fehérjétől. A termékeny tojások sárgáját az első kísérletsorozatban (4 kísérlet) szobahőmérsékletű, a második kísérletsorozatban (szintén 4 kísérlet) jégen tartott, +4 °C-os steril Petri-csészébe helyeztük. A csírákorongra szűrőpapírkorongot téve, a papírgyűrűt csipesszel megfogva, steril ollóval körbevágtuk a vitellin membránt (4. ábra). A rátapadt szik nagyobbik részét steril papírvattával távolítottuk el, majd a sejteket fecskendővel 10 ml mennyiségű 10% FBS-t tartalmazó DMEM high glucose (Sigma-Aldrich) tápoldat keverékébe mostuk le. A tápoldatot az első kísérletsorozat esetében szobahőmérsékleten, a második kísérletsorozat esetében +4 °C-on tároltuk a sejtkenyerés ideje alatt.

A csírákorongokat (kísérletenként 10–10 db) Pasteur-pipettával, mechanikusan szuszpendáltuk fel a tápoldatban.

A tápoldatos keveréket +4 °C-on, 3 percen keresztül, 2300 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk, majd 7,5 ml felülúszót eltávolítottunk. A maradék 2,5 ml oldatban a leülepedett embrionális sejteket óvatosan felsuszpendáltuk, elválasztva a sárgája részekről, majd a 2,5 ml szuszpenziót ismét centrifugáltuk. 1,5 ml felülúszót eltávolítottunk, majd a maradékból mintát vettünk, és tripánkék festéssel életképességet vizsgáltunk (5. ábra).

A sejtsuszpenziót kettéosztottuk, majd hozzáadtuk a különböző krioprotektáns kombinációkat, ezután ismét mintát vettünk, majd életképességet vizsgáltunk.

A SEJTEK ÉLETKEPESSEGÉNEK VIZSGÁLATA

Mintavételt és életképesség-vizsgálatot végeztünk a sejtek kinyerését és az első centrifugálást követően, a védőanyagok hozzáadását és a második centrifugálást követően, majd a minták felolvasztása és újabb centrifugálása után is.

A kísérletek során a sejtek életképességének vizsgálatához 10 µl sejtsuszpenziót tripánkék festékkel megfestettük (1 : 1). A tripánkék festék áthatol az elhalt sejtek membránján, és megfesti azokat. Az élő sejtek membránján nem képes áthatolni, azok nem festődnek, így jól elkülöníthetők egymástól az élő és a holt sejtek (vö. 5. ábra). A festék hozzáadása után Makler-féle sejtszámláló kamrában, mikroszkóp segítségével meghatároztuk az élő és holt sejtek számát. Egy mintánál minimum 200 db sejtet számoltunk.

AZ ALKALMAZOTT LASSÚ MÉLYHŰTÉSI MÓDSZER

Az elkészített sejtsuszpenziót szalmákba és ampullákba töltöttük. Kísérletenként 2 × 4 szalmát és 2 × 2 ampullát töltöttünk meg sejtsuszpenzióval az alkalmazott krioprotektáns kombináció típusa szerint. A mélyhűtést programozható hűtőberendezésben végeztük (PLANER CRYO 10, 6. ábra). A mélyhűtési programot SAWICKA és mtsai (11) protokollja alapján állítottuk be. A hűtés +18 °C-on indult. A hűtési ráta 4 °C/perccel csökkent 0 °C-ig, 0 °C-on az egyensúlyi idő 5 percig tartott. A hűtés 1 °C/perc sebességgel folytatódott –7 °C eléréséig, majd 0,3 °C/percre csökkent –37 °C eléréséig, a legutolsó szakaszban pedig a hőmérséklet 30 °C/perccel csökkent –130 °C eléréséig. A program lefutása után a szalmákat és ampullákat a hűtőberendezésből egy folyékony nitrogént tartalmazó polisztirol dobozba szedtük ki, különböző színű műanyag tárolókban helyeztük, végül pedig a minták a kriobank tartályba kerültek.

A kinyert blasztodermális sejtek életképességét tripánkék festéssel vizsgálták

A lassú mélyhűtést programozható hűtőberendezésben végezték

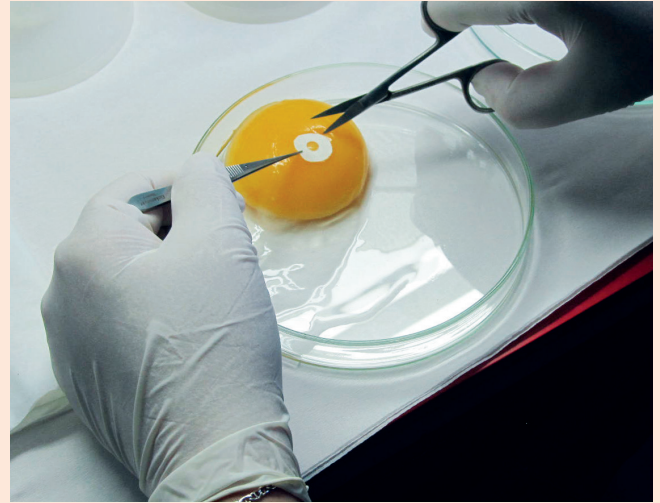


3. ÁBRA. Magyar parlagi gyöngytyúk
(Készítette: DR. LEHOCZKY ISTVÁN)

FIGURE 3. Hungarian landrace Guinea fowl
(Photo: DR. ISTVÁN LEHOCZKY)

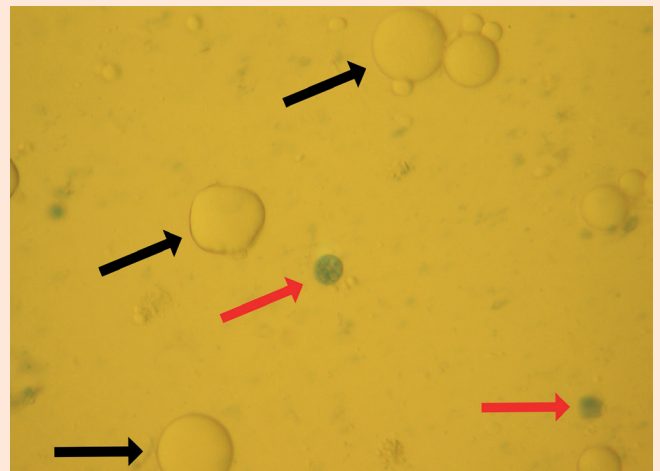
5. ÁBRA. Élő és elhalt embrionális sejtek tripánkék festés után (fekete nyíl: élő sejt, piros nyíl: elhalt sejt)

FIGURE 5. Viable and dead embryonic cells after Tripan Blue staining (black arrow: live cell, red arrow: dead cell)



4. ÁBRA. Termékeny csírákorong eltávolítása szűrőpapírgyűrű segítségével

FIGURE 4. Removing the fertile germinal disk with filter paper ring



6. ÁBRA. PLANER CRYO10 mélyhűtő berendezés

FIGURE 6. PLANER CRYO10 programmable freezing machine

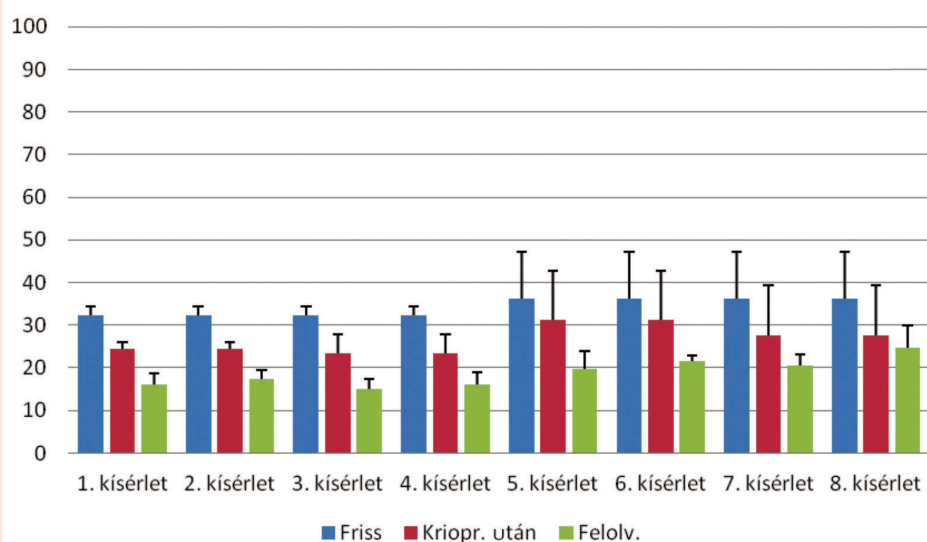


TÁBLÁZAT. A kísérlet menetének összefoglaló táblázata**TABLE.** Experimental design of the planned investigations

Lassú mélyhűtés	SAWICKA és mtsai (2015) után							
	+20 °C-on				+4 °C-on			
Donor sejtek kinyerése								
Alkalmazott krioprotektáns kombinációk	DMSO		DMSO + EG		DMSO		DMSO + EG	
Koncentrációjuk	10%		5-5%		10%		5-5%	
Alkalmazott konténertípusok	szalma	ampulla	szalma	ampulla	szalma	ampulla	szalma	ampulla
	Életképesség vizsgálat							

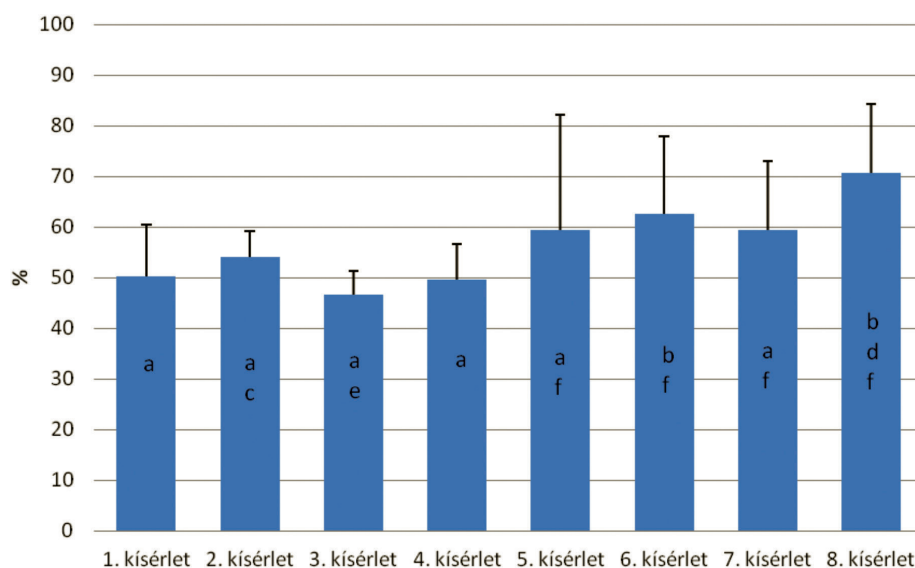
1. ÁBRA. Az élő sejtek arányának változása a kísérletek folyamán (%)

FIGURE 1. Changing of viable cells ratio during the experiment (%)



2. ÁBRA. A mélyhűtött – felolvasztott korai embrionális sejtek túlélése a különböző kezelések hatására (a–b: $p \leq 0,05$; c–d: $p \leq 0,01$; e–f: $p \leq 0,05$)

FIGURE 2. Survival of the frozen-thawed early embryonic cells resulting from the different treatments



AZ ALKALMAZOTT KRIOPROTEKTÁNSOK

A kísérlet során krioprotektánsként dimetil-szulfoxidot (DMSO) és etilén-glikolt (EG) alkalmaztunk különböző töménységben és kombinációban (vö. 1. táblázat). Mindkettő az ún. intracellulárisan, azaz a sejten belül ható védőanyagok közé tartozik.

A SEJTEK MÉLYHŰTÉS UTÁNI FELOLVASZTÁSA

A folyékony nitrogént tartalmazó tartályból áthelyeztük a mintákat egy kisebb, folyékony nitrogént tartalmazó polisztirol dobozba, majd +27 °C-os vízfürdőben folyamatosan mozgatva az ampullákat 2–3 perc alatt, a szalmákat körülbelül 20–30 másodperc alatt olvasztottuk fel.

A felolvasztott sejtszuspenziót 2 ml 10% FBS-t tartalmazó DMEM high glükóz tápoldatba helyeztük, aztán +20 °C-on, 2300 rpm fordulatszámmal 3 percig centrifugáltuk. A felülúszó, krioprotektánt tartalmazó médiumot leszívtuk, a maradék, sejteket tartalmazó szuspenziót 300 µl DMEM tápoldattal engedték fel és életképességet vizsgáltunk (vö. 5. ábra).

ALKALMAZOTT STATISZTIKAI MÓDSZER

Az eredmények értékelését arcsin transzformáció után One-way ANOVA-val végeztük el (3). Amennyiben szignifikáns különbséget találtunk, a Fisher-féle LSD-tesztet alkalmaztuk. Az eredmények közléséhez a transzformálatlan, kiindulási adatokat használtuk fel. A krioprotektáns típusa és a tárolás módja (szalma, ampulla) interakciójának értékelésére General Linear Model tesztet végeztünk. A statisztikai elemzéseknél Statistica 7.0 programmal dolgoztunk.

EREDMÉNYEK

AZ ALKALMAZOTT KONTÉNERTÍPUSOK (SZALMA, AMPULLA) ÖSSZEHASONLÍTÁSA

A mélyhűtés során a sejtek tárolásához kétféle konténertípust, szalmát és ampullát alkalmaztunk és hasonlítottunk össze. A legjobb túlélési arányt eredményező kombinációban ampullát alkalmaztunk, és az adatok alapján megállapítottuk, hogy az ampullás mélyhűtés minden krioprotektáns kombináció és gyűjtési hőmérséklet esetén valamivel jobbnak bizonyult a szalmás mélyhűtésnél, jóllehet szignifikáns eltérést nem tudtunk kimutatni.

AZ ALKALMAZOTT KRIOPROTEKTÁNS KOMBINÁCIÓK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a krioprotektáns kombinációk hatása között. A 3. kísérlet, ahol a sejtek gyűjtését 20 °C-on végeztük, szignifikánsan rosszabbnak bizonyult ($p < 0,05$) az 5. és a 6. kísérletnél, ahol a gyűjtést 4 °C-on végeztük. Az érdekes az, hogy ugyanez a krioprotektáns kombináció a +4 °C-on végzett sejtkinyerés esetén a legjobb eredményt adta (8. kísérlet: 24,75%) (vö. 2. ábra).

A KINYERÉSI HŐMÉRSÉKLET SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA

A felolvasztás után kapott eredmények alapján elmondható (vö. 1. ábra), hogy a szobahőmérsékleten kinyert sejtek életképessége minden esetben szignifikánsan rosszabbnak bizonyult (15–17%), mint a +4 °C-on kinyerteké (20–25%), de maguk a +20 °C-on kinyert sejtpopulációk között nem volt tapasztalható szignifikáns különbség (vö. 2. ábra).

A +4 °C-on kinyert sejtek felolvasztás utáni életképessége között nem volt szignifikáns különbség, viszont az utolsó kombináció mindegyiknél jobbnak bizonyult (a túlélés átlagosan 70,5%), ami 5% DMSO + 5% EG, +4 °C-on történő sejtkinyerés és ampullában tárolás kombinációját jelenti. Annak ellenére, hogy ez jobbnak bizonyult a többi +4 °C-on kinyert sejtek túlélési eredményeinél, nem

A folyékony nitrogénben tárolt sejteket 27 °C-os vízfürdőben olvasztották fel

A kapott eredményeket statisztikai módszerekkel értékelték

Az ampullás mélyhűtés minden krioprotektáns kombináció és gyűjtési hőmérséklet esetén valamivel jobbnak bizonyult

A szobahőmérsékleten kinyert sejtek életképessége minden esetben szignifikánsan rosszabbnak bizonyult, mint a +4 °C-on kinyerteké

különbözik szignifikánsan a 10% DMSO-t tartalmazó minták felolvasztás utáni eredményeitől ($p < 0,05$; vö. 2. ábra).

A kapott eredmények vizsgálata alapján elmondható, hogy a kinyerési hőmérsékletnek kulcsszerepe van a sejtek túlélése szempontjából.

MEGVITATÁS

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a gyűjtési hőmérsékletnek döntő befolyása van az embrionális sejtek mélyhűthetőségére. Valószínűsíthető, hogy pl. az enzimatisz folyamatok gátlásával, a bomlástermékek mennyiségének csökkentésével is javíthatja a sejtek általános állapotát az alacsony hőmérséklet, valamint csökkentheti a hozzáadott krioprotektánsok károsító hatását is. A mélyhűtési kísérletek során alapvető problémánk volt a frissen kinyert, kiindulási sejtpopuláció alacsony életképessége. A túlélési adatokból (vö. 2. ábra) látható, hogy maga a mélyhűtési folyamat legrosszabb esetben is csak 46,6%-ra csökkentette a túlélő sejtek arányát, a legjobb kombinációnál pedig ez az arány meghaladta a 70%-ot, ami nagyon jó eredménynek számít. A második négy kísérletnél ezért próbáltuk ki az alacsony hőmérsékleten történő sejt-kinyerést, hátha így jobb eredményeket tudunk elérni. Bebizonyosodott, hogy a +4 °C-on történő sejt-kinyeréssel növelhető a felolvasztás utáni élő sejtek aránya.

A +4 °C-on történő sejt-kinyeréssel növelhető a felolvasztás utáni élő sejtek aránya

A +4 °C-on történő sejt-kinyerés, az 5% DMSO + 5% EG krioprotektáns kombináció és az ampullás tárolás a legmegfelelőbb

A kísérleti adatok alapján jól látható továbbá, hogy az ampullás mélyhűtés minden krioprotektáns kombináció és gyűjtési hőmérséklet esetén jobbnak bizonyult a szalmás mélyhűtésnél, noha a különbség nem volt szignifikáns.

Összefoglalva megállapítottuk, hogy a +4°C-on történő sejt-kinyerés, az 5% DMSO + 5% EG krioprotektáns kombináció és az ampullás tárolás a legalkalmasabb a gyöngytyúk embrionális sejtek sikeres hosszú távú mélyhűtési tárolására. Ezzel a módszerrel elegendő sejtet tudunk megőrizni egy esetleges kiméra előállításához, ezáltal az eredeti genom visszanyeréséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A vizsgálatok elvégzését 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

1. BARNA J. – HIDAS A. – SZALAY I. – VÁRKONYI E.: Baromfifélék ivarsejtjeinek mélyhűtési tárolása, mint *ex situ* génmegőrzés. *Állatteny. Takarm.*, 2002. 51. 74–76.
2. EYAL GILADI, H. – KOCHAV, S.: From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. 1. *Gen. Morphol. Dev. Biol.*, 1976. 49. 321–337.
3. HARNOS A. – REICZIGEL J.: Biostatistika és Kísérlettervezés, 2006. p. 14. www.univet.hu/users/zsclang/phd/kis-terv--elem-szam--transzform.pdf
4. HÉJJA I. – VÁRKONYI E. – ZÖLDÁG L. – BARNA J.: Génmegőrzés lehetősége kimérizmussal pulykában (előzetes közlemény). *Magy. Állatorv. Lapja*, 2006. 128. 351–357.
5. KINO, K. – PAIN, B. et al.: Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poult. Sci.*, 1997. 76. 753–760.
6. ONO, T. – YOKOI, R. et al.: Transfer of male or female primordial germ cells of Quail into chick embryonic gonads. *Exp. Anim.*, 1996. 45. 347–352.
7. ONO, T. – MATSUMOTO, T. et al.: Production of donor-derived offspring by transfer of primordial germ cells in Japanese Quail. *Exp. Anim.*, 1998. 47. 215–219.
8. 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.
9. PETTIE, J. N.: Avian germplasm preservation: Embryonic stem cells or primordial germ cells? *Poult. Sci.*, 2006. 85. 237–242.
10. SAWICKA, D. – BRZEZIŃSKA, J. et al.: Cryoconservation of embryonic cells and gametes as a poultry biodiversity preservation method. *Folia Biol. (Krakow)*, 2011. 59. 1–5.
11. 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. *Folia Biol. (Krakow)*, 2015. 63. 129–134.

12. SZTÁN N. – PATAKINÉ VÁRKONYI E. – LIPTÓI K. – BARNA J.: Baromfi-fajok embrionális sejtjeinek kezelésével szerzett tapasztalatok. *Magy. Állatorv. Lapja.*, 2012. 134. 475–481.

13. VÁRKONYI, E.: Using of new methods in the poultry breeding and the gene preservation. *Proceedings of XX. World's Poultry Congress and Exhibition*, 2–8 September 1996. New Delhi, India. Vol. IV. p. 14.

14. VÁRKONYI, E. – HIDAS, A. – SZALAY, I.: Embryo manipulation of chicken chimaeras. *Xth Roundtable Conference on Animal Biotechnology*, 1994. Kosice, Slovak Republic. Oct. 11–12.

15. VÁRKONYI, E. – HIDAS, A. – SZALAY, I.: Production of chicken chimaeras by blastoderm cell transfer. *Proceedings of First Egyptian-Hungarian Poultry Conference*, 1995. 17–19 Sept. Alexandria, Egypt. Part I, 10–13.

16. 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. 31. 240–241.

Közlésre érk.: 2016. márc. 18.

MEGHÍVÓ

Az Állatorvostudományi Egyetem Baráti Köre Civil Társaság 2016. december 15-én, csütörtökön 14 órakor a Hetzel Henrik előadóban (Bp., VII. István u. 2., L ép. földszint) tartja következő találkozóját.

Program:

Éghajlatváltozás és energiapolitika

Előadó:

DR. HÉJJAS ISTVÁN irányítástechnikai szakmérnök

Az összejövetelre minden érdeklődőt, vendégeket is tisztelettel vár a Baráti Kör CT

TÁJÉKOZTATÓ

Akik a 2015. nov. 20-án alapított Állatorvostudományi Egyetem Baráti Köre Civil Társaság (ÁOTE BK CT) tagjaivá kívánunk válni, s az alapító tagsághoz csatlakozási szándékukról eddig írásban még nem nyilatkoztak, szíveskedjenek a alábbi nyilatkozatot kitöltve postán elküldeni a következő címre: DR. VARGA ISTVÁN Budapest, István út 2. 1078 vagy a találkozón személyesen átadni.

A Társaság feltételeinek rovatába elegendő beírni, hogy pl. Állatorvosi oklevél Budapesten, 1960 vagy pl. az Állatorvostudományi Egyetem Élettani Tanszékén dolgoztam 1976–1991 között.

A jelen (s majd még a májusi) meghívót nem csupán az ÁOTE BK Civil Társaság – alapító és a már csatlakozott – tagjainak, hanem a SZIE ÁOTK BK e-mailes címlistáján régóta szereplők mindegyikének küldöm.

Akik azonban 2016 májusának végéig írásban nem csatlakoznak a Civil Társasághoz, ezt sajnálattal úgy tekintem, hogy a továbbiakban nem tudnak vagy nem kívánunk a BK találkozóin megjelenni. Ezért e-mail fiókjukat a meghívókkal 2016. július 1-től – Karunk ismét önálló egyetemé válásának hivatalos időpontjától – tovább már feleslegesen nem terhelem. Természetesen, a későbbiekben csatlakozók – érvényes csatlakozási nyilatkozatuk megtételétől kezdve – az ÁOTE BK CT teljes jogú tagjaivá válhatnak.

Egyetemi honlapunk cseréje megtörtént; a BK új elérhetősége: <http://www.univet.hu/hu/egyetem/barati-kor>.

A képek a honlapon az Egyetem, majd az azon belül megjelenő Galériák föltre kattintva érhetők el.

CSATLAKOZÁSI NYILATKOZAT

Alulírott(cím:

e-mail: kijelentem, hogy az Állatorvostudományi Egyetem Baráti Köre Civil Társasághoz (1078 Budapest, István u. 2.) jelen nyilatkozatommal csatlakozni kívánok. A Társaság Alapító Okiratát megismertem, annak rendelkezéseit elfogadom. A Társaság tagsági feltételeinek megfelelek, mert:

Kelt:, 2016.-n.

.....
aláírás