



Szakdolgozat

2025.

**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,
Nappali tagozat
Georgikon Campus
- Témavezető:** **Dr. Beliczky Gábor Péter, tudományos munkatárs**
- Külső konzulensek:** 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

Készthely 2025.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés és célkitűzés	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A zebradánió bemutatása	6
2.1.1 A faj általános jellemzése.....	6
2.1.2 A zebradánió egyedfejlődése	7
2.2. A gerincesek ivarát kialakító mechanizmusok.....	8
2.3. A zebradánió ivarát meghatározó folyamatok	9
2.4. A zebradánió ivarszerv kialakulásának és 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>tg{ddx4:gfp}</i> és a <i>gáspár</i> vonal egyedei testméretének és testtömegének összehasonlítása	18
3.7. A hőkezelések körülményei	18
3.8. Genomi DNS izolálása	20
3.9. A transzgén kópiaszámának kimutatása PCR-alapú genotipizálással.....	20
3.10. Új gáspár állomány kialakítása	21
3.11. Statisztikai analízis.....	22
4. Eredmények és értékelésük	23
4.1 A pigmentált transzgénikus családok nem produkáltak szignifikánsan több ikrát a pigmenthiányos családoknál	23

4.2	A pigmentált egyedek túlélési aránya három hetes korban szignifikánsan magasabb volt a pigmenthiányosokénál.....	24
4.3	A tartási sűrűség meghatározó lehet a túlélés mértéke szempontjából	26
4.4	A <i>tg{ddx4:gfp}</i> egyedek testtömege szignifikánsan nagyobb volt a <i>gáspár</i> egyedekénél.....	28
4.5	A hőkezelt család utódaiban jelentős ivararány eltolódást tudtam kimutatni a hímek irányába	30
4.6	Új <i>gáspár</i> egyedek azonosítása az állomány bővítése céljából.....	31
4.8	Hozzájárulások	33
5.	Limitációk	34
5.1.	A túlélési arány összehasonlítását hátráltató tényezők.....	34
5.2.	A vizsgált halak ivarát csak később tudtuk meghatározni	34
5.3.	A hőkezelésekre használt inkubátor befogadási képessége	34
6.	Következtetések és javaslatok.....	35
7.	Összefoglalás.....	36
8.	Köszönetnyilvánítás	37
9.	Irodalomjegyzék.....	38
10.	Melléletek.....	40
11.	Nyilatkozatok	42

Rövidítések jegyzéke

AB	egy házasított zebraadánió vonal
<i>cas</i>	<i>casper</i> mutáns zebraadánió 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> zebraadánió 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 őscsírasejt
PSD	'Polygenic Sex Determination', azaz poligénes ivarmeghatározás
SD	'Sex Determination', azaz az ivart meghatározó folyamatok kezdete
<i>tg{ddx4:egfp}</i>	az ivarszerveket jelölő transzgenikus konstrukció elnevezése
TSD	'Temperature-based Sex Determination', azaz hőmérséklet által meghatározott ivar

1. Bevezetés és célkitűzés

Munkámat egy gyakran használt gerinces modell állaton, a zebraadánió (*Danio rerio*, Hamilton 1822) végeztem el. 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 rendelkező gerinces állat, sok gerinces modellel szemben. Ezen felül más tulajdonságaiban is kiemelkedő, mint például, hogy hamar eléri az ivarérett kort és egy szülőpár akár több száz egyed 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 repporter vonalban 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.

Munkám céljai a következők voltak:

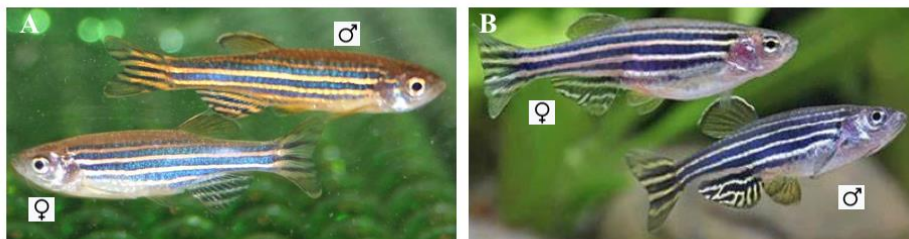
1. Csoportos és páros szaporítások elvégzése a korábban kialakított transzgénikus pigment-mutáns *gáspár* állomány bővítése és a vonal kialakítása céljából.
2. A *gáspár* vonal egyedeinek alapszintű jellemzése a pigmentált *tg{ddx4:egfp}* transzgénikus vonal egyedeivel történő összehasonlítás (pl. szaporasági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

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) (Hawkins és mtsai, 2023). 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 zebradániók először a díszhal tenyésztésben jelentek meg. A magyar származású George Streisinger professzor és kollégái kezdték el őket az 1970-es évek végén használni kísérleti célokra, 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 a kutatók mára már mutáns és transzgénikus zebradánió vonalak százaiából választhatnak (Choi és mtsai, 2021). 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). A hímek színe általában 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.

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, amelyek lehetővé teszik a különböző fejlettségű egyedek egymástól való elkülönítését.

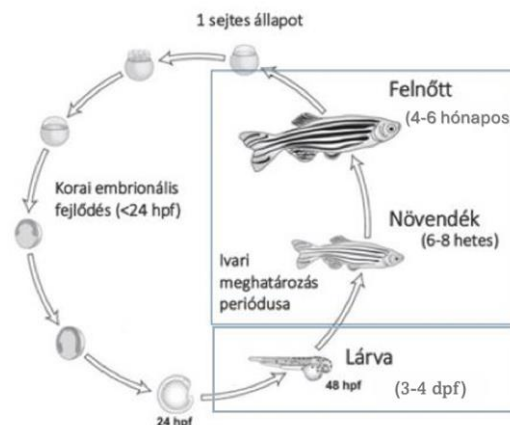
1) Embrió: A fejlődésük első szakasza az embrió állapot, mely a megtermékenyüléstől 72 órás (angolul: hours post-fertilization, rövidítve hpf) korig tart. Az embrió kezdetben átlátszó ikra burokokban fejlődik, amely védi az első pár nap során a kedvezőtlen külső behatásoktól. Ezen időszak során a legnagyobb 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 elkezdi 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 megnőnek és teljesen ivaréretté válnak, ez utóbbi optimális tartási

körülmények között a 120-180 dpf-es periódusban következnek be. A növekedési intenzitása innen drasztikusan lelassul, és megfelelő körülmények között akár 2-3 évig is élhetnek.



2. ábra: A zebradánió egyedfejlődése négy szakaszra osztható: embrionális, lárva kori, növendék és felnőtt. Az embrionális fejlődés az első három nap során játszódik le. A lárva még nem rendelkezik a végleges testformával és pikkelyezettséggel. Ezt a hatodik hétre éri el, ahonnan növendéknek nevezzük őket. A növendék halak színe, pikkelyezettsége végleges, de hiányoznak a másodlagos szexuális jellegek. Az ivarérett, szaporodásra képes 4-6. hónapos egyedet tekintjük felnőttnek. (Forrás: Aluru, 2017, Hirth 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 (Nagahama és Yamashita, 2008). 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 ivart kialakító folyamatokat, mivel számos halfaj esetén nagy különbséget tapasztaltak a két ivar között 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), melyek az X és Y ivari

kromoszómákon helyezkednek 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).

A madaraknál az emlősökkel ellentétben a tojók, azaz nőstények a heterogametikusak (ZW), míg a kakasok (hímek) két azonos ivari kromoszómával (ZZ) rendelkeznek (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 határozható meg GSD-vel az ivar, 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* nemi gén viszont nem csak a madaraknál, hanem más gerinceseknél is a segítségünkre lehet az ivar meghatározásában (Augstenová és mtsai, 2025).

A halak 34 ezer fajában a fenti SD mechanizmusok mind megfigyelhetők, sőt azok kombinációi és komplex mechanizmusok is előfordulhatnak (Devlin és Nagahama, 2002). Egyes fajoknál nem találtak ivari kromoszómákat, ezeknél az ivar feltehetően poligénes mechanizmus határozza meg (‘Polygenic Sex Determination’ – PSD; lásd alább). Leírtak olyan fajokat is, amelynél kialakulhat hermafroditizmus, ebben helyzetben viszont nincsen klasszikus ivar meghatározás. 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 vehetnek ezek befolyásolásában (Devlin és Nagahama, 2002).

2.3. A zebradánió ivarát meghatározó folyamatok

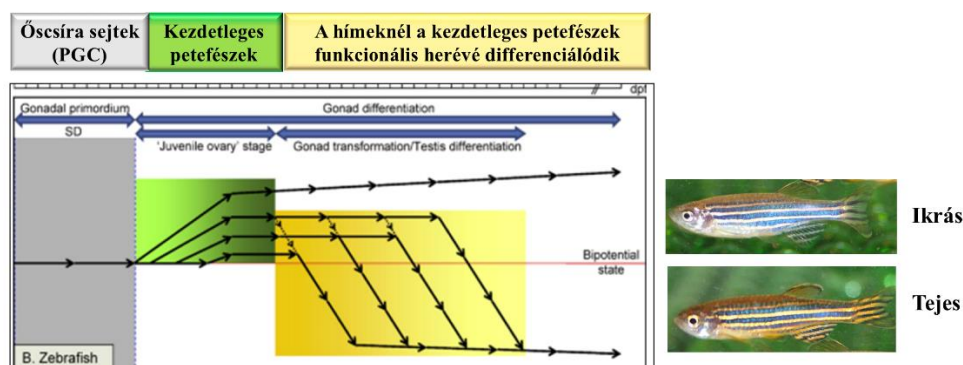
A zebradánió diploid faj, genomja 25 pár kromoszómát (2n) tartalmaz. A vadon élő zebradániókban a hímek – a madarakhoz hasonlóan – homogametikus ivari kromoszómával (ZZ) rendelkeznek, míg a nőstények heterogametikussal (ZW). A házasított vonalak közül több vonalban, így például az általunk használt AB-ben is, a házasítás során az ivari kromoszómá páros feltételezéseink szerint elveszítette elsődleges funkcióját, ennek következményeként poligénes ivarmeghatározási rendszer jött létre (Liew és mtsai, 2012; Liew és Orban, 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 (Ribas és mtsai, 2017a; Ribas és mtsai, 2017b).

2.4. A zebradánió ivarszerv kialakulásának és differenciálódásának folyamata

Az ivarszerv kialakulása egy bonyolult folyamat a zebradánióknál. Az egyedek túlnyomó többségénél - a végső ivartól függetlenül - növendék állapotban egy kezdetleges petefészkek alakul ki, mely később mindkét ivarszerv irányába fejlődhet (Takahashi, 1977). A nőstényeknél 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**) (Orbán és mtsai, 2009; Sreenivasan és mtsai, 2014; Tzung és mtsai, 2015).

Ez folyamat nem egyidőben zajlik le az egyedekben, és eltérő idő intervallum alatt is játszódhat le. A kutatás korai időszakában a kutatók nem voltak biztosak abban, hogy az átalakulás az összes későbbi hím egyedben végbemegy-e. Azóta már tudjuk, hogy vannak olyan hím zebradániók, melyekben nem alakul ki kezdetleges petefészkekből, hanem azonnal a kezdetleges here kezd kifejlődni (Luzio és mtsai, 2021).



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

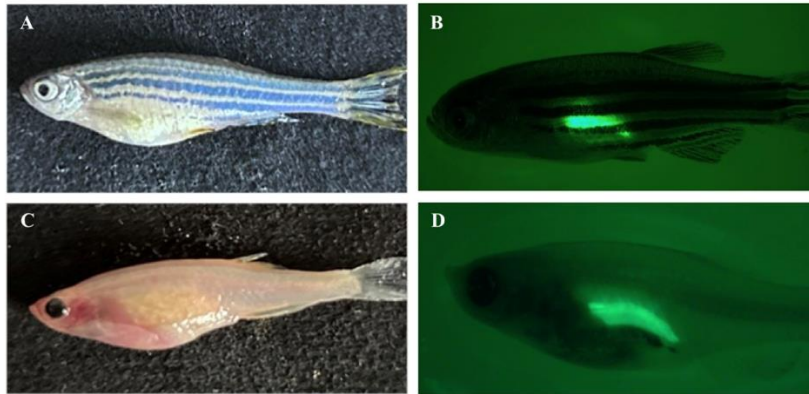
A zebradánió házasítása során az egyik vagy mindkét ivari kromoszóma elvesztése miatt poligénes ivarmeghatározás alakult ki. Az egyedek többségében az ősvarsejtekből egy kezdetleges petefészkek képződik, amely jelentős átalakuláson megy végbe a későbbi hímeiben. Ez a folyamat egyedenként változó ritmusban mehet végbe. (Forrás: Orbán, Sreenivasan és Olsson, 2009; Fotók: Zala, S., Vetmed. Univ. Vienna)

2.5. A hőmérséklet hatása az ivar kialakulására

A zebra-dániókat a laborban 27-28 °C-os vízben tartjuk, mivel ez a legideálisabb víz-hőmérséklet számukra. A korai fejlődési stádiumban 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 hímivarsejtek előállításához kevesebb energia szükséges, mint a petefészekhez és a petesejtékéhez, 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 használtunk ilyen zebra-dánió vonalat, amelynek genomjába a *tg{ddx4:gfp}* (korábban *tg{vas:gfp}*) jelzőgén 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 jelzőgén konstrukció a zöld fluoreszcens fehérje ('Green fluorescent protein', azaz Gfp) génjét tartalmazza, melynek fehérje terméke kék fényel megvilágítva élénk zölden fluoreszkál. Ez a jelzőfehérje a petefészekben nagy mennyiségben, míg a herében alig-alig termelődik, emiatt a petefészek sokkal intenzívebb zöld jelet ad, mint a here (**4. ábra**).



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

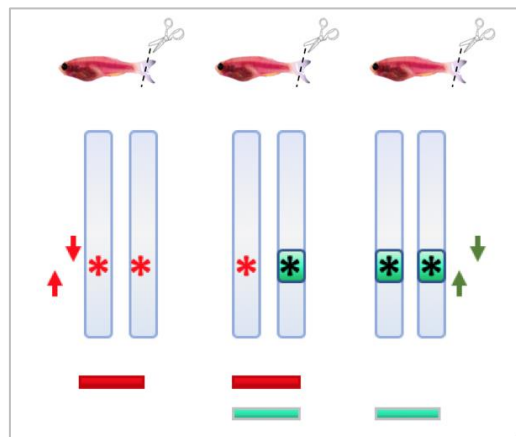
A pigmentált halakban jelen lévő melanofórák (fekete pigmentek) és iridofórák (ezüst) leárnyékolják a petefészekből jövő, ivarspecifikusan expresszáldó fluoreszcens jelet (A-B). Ezeknek a pigmenteknek a hiányában a petesejtek már a test falon át is jól láthatók a *gáspár* ikrásban (C), a petesejtekben 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 hasi régió és az úszók sárgás árnyalatáért, a reflektív pigment pedig az egész test fényes szürkés árnyalatáért. Ezek a pigmentek az ivarszervek által termelt Gfp megfigyelését zavarhatják. Ezen probléma megoldására hallgatótársam, Szabó Olivér Máté létrehozott egy olyan vonalat, amelynek egyedei hordozzák a genomjukban a *ddx4:egfp* transzgén, azonban a fekete és reflektív pigmentek nem termelődnek a szervezetükben. Ezen pigment-mutáns transzgénikus vonal segítségével az ivarszervben zajló folyamatokat sokkal könnyebben meg lehet megfigyelni. A vonal a *gáspár* (a továbbiakban: pigment-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:gfp}* transzgén 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 kromozómán. Erre a szakaszra tervezett PCR primerek felhasználásával sikerült a homozigóta és hemizigóta egyedeket azonosítani PCR-alapú tesztekkel (5. ábra).

Az én első feladatom 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 feladatom a *gáspár* tenyészállomány bővítése 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:gfp}* transzgén kópiaszáma a farokúszóból izolált DNS minta PCR-analízisével meghatározható. A transzgénikus *casper* egyedekben a 3-as kromoszómán egy közel 4 kb-os szakasz kiesett. A *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{dtx4:egfp}* vonalat és a *gáspár* vonal létrehozásához szintén szükséges *casper* mutánsokat egyaránt Dr. Csenki-Bakos Zsolt csoportjának 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 trópusi esőt igyekeztünk imitálni, ami természetes körülmények között ugyancsak hozzájárul az ivási inger kiváltásához.

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

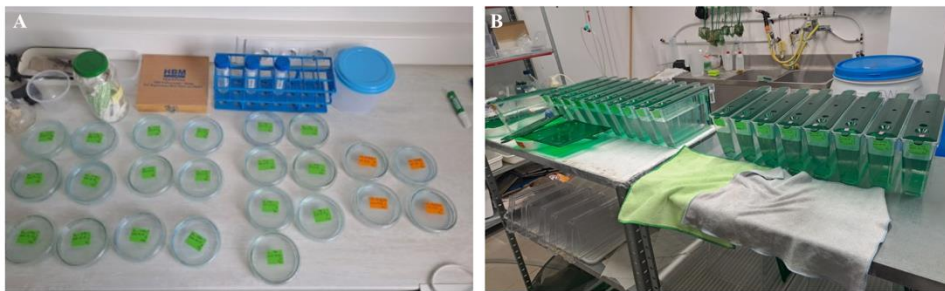


8. ábra: A halak szaporítása és a megtermékenyített embriók kezelése. A) A szaporító tartályokba helyezett válaszfallal elválasztott tejes és ikrás környezetnek gazdagítása céljából műnövényt és kavicsaljatot helyeztünk. B) Az ikrák családonkénti begyűjtéséhez használt szűrők és feliratozott Petri csészék 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 nagyobb edényekben tartottuk őket. A takarmányozásuk is ilyenkor kezdődik, <math><100 \mu\text{m}</math> 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 kezdtük meg.

3.4. A korai elhullások követése

A vonalak összehasonlítása során azt vizsgáltam, hogy a *tg{ddx4:gfp}* vonal és a *gáspár* vonal között milyen különbségek fedezhetőek 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 történt, a standard protokoll használatával. A szaporításból származó életképes 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 ikra mennyiségről, valamint az elhullásokról az Excel programot felhasználva készítettem statisztikai elemzéseket.

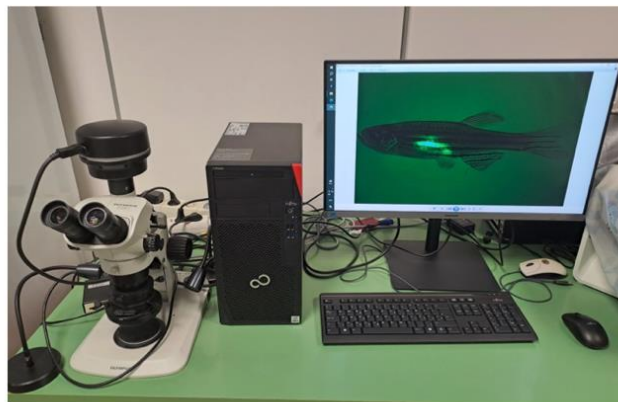


9. ábra: A korai elhullások megfigyeléséhez kialakított csoportok. A) A frissen begyűjtött ikrákat 50-esével Petri csészébe helyeztük, amelynek az oldalán található a születési dátum, családnév és az A/B/C jel egyike. Az edény tetején a családra jellemző színek látható (zöld, pigmentált, illetve narancssárga a pigmenthiányos vonalat jelzi). B) A rendszerre kerülés előtt a növények az asztalon fejlődnek. (Saját fotók)

3.5. A transzgénikus egyedek mikroszkópos szexálása

A kifejlett zebradánióknál az ivari dimorfizmusnak köszönhetően jól elkülöníthetőek 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 fényel megvilágítva láthatóvá tehető (Wang és mtsai, 2007). Erre a célra egy Olympus SZF61 típusú sztereómikroszkópot 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, egy olyan altató tálban, melynek vize 325 mg/L koncentrációjú MS-222 oldatot tartalmazott. Egyszerre 3-4 egyedeket helyeztünk egy háló segítségével az altató vízbe, és addig tartottuk benne őket, amíg a mozgásuk lelassult és elkezdtek az oldalukra billenni. Ezt követően egy óráúvegen a mikroszkóp alá helyeztük a fényképezéshez az egyedeket. Mikor elkészült a kép, akkor a halak egy élesztő tálba kerültek, amelynek 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 feltétellel és digitális kamerával ellátott sztereómikroszkóp, középen az azt vezérlő számítógép, míg a jobb szélén a monitor látható. (Fotó: saját)

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

A méréseket hallgatótársam Szabó Olivér Máté végezte, Dr. Csenki-Bakos Zsolt laboratóriumában (Környezettoxikológiai Tanszék, MATE AKI, Gödöllő), mert a nekik átadott halak a több rendelkezésre álló edény és alacsonyabb egyedsűrűség miatt gyorsabban elérték a felnőtt kort. A méréseket a halak altatásával kezdte, amelyhez a fenti protokollt használta. Ezt követően mérleggel lemérte a halak testtömegét, majd milliméterpapíron meghatározta a testméretet. A két vonal egyedeiből származó adatok összehasonlítását és statisztikai elemzését már 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 általuk beállított körülményeket alkalmaztam, azaz kéthetes kortól két héten át 36 °C-on végeztem. 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 egyedét 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 vízcsereket is. A kezelt csoport esetében oxigénnel dúsított vízzel cseréltem ki az edényekben lévő vizet, mivel a magas hőmérsékelt 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. Az egyes csoportok ivararányát 10-12 hetes korban ellenőriztem le a GFP jelet mikroszkóp alatt detektálva, hogy meghatározzam sikeres volt-e a hőkezelés és történt-e 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

A PCR reakciókhoz szükséges genomi DNS-t Chelex alapú eljárással (Yue és Orban, 2001) izoláltam felnőtt egyedek farokúszójából. Az izolálást a halak altatásával kezdtem, 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 az enzimet 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'-ACCACATGAAGCAGCAGACT-3', T_M 61 °C; EGFP-R1 5'-CTTCTCGTTGGGGTCTTTGC-3', T_M 58 °C), a másik a transzgén beépülése során kiesett genomi régióra (chr3del-F2 5'-ACAGCAGCGTCCTTGTCCCAG-C 3' T_M 70 °C; chr3del-R2 5'-CGCGGAGTCCCCTGGCTCTC-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 sokszorozítást az Analytik Jena GmbH cég Biometria TAdvanced típusú készülékén végeztük, korábban beállított hőmérsékleti profil mellett: kezdeti denaturáció 98 °C 30 másodperc; 30 cikluson ismétlődve – denaturáció 98 °C 10 másodpercig; primerek kötődése 66 °C 30 másodpercig; lánc hosszabbítás 72 °C 30 másodpercig; végső lánchosszabbítás 72 °C 10 percig.

A PCR termékekből 18 uL-t 2%-os agaróz gélen és TBE pufferben választottam el gélelektroforézissel. A géltre továbbá a 100 bázispáros markert (New England Biolabs) vittem fel molekulásúly sztenderdként. A gélekről az Uvitec Cambridge Essential típusú digitális kamerával készítettem képeket.

3.10. Új gáspár állomány kialakítása

Az eredeti homozigóta *gáspár* állomány kialakításakor hallgatótársamnak Szabó Olivérnek DNS alapú genotipizálásra volt szüksége, mert csak az egyik szülő örökölte tovább a transzgént. Ezért ki kellett válogatnia a homozigóta egyedeket a keletkezett F2-es állományból, amelyeket később tovább tudott szaporítani. Ezek között a transzgenre nézve három különböző genotípus volt megtalálható: a homozigóta, a hemizigóta és a vad típusú (5. ábra). A genotípus meghatározására farokúszóból izolált DNS mintát vett, amelyből duplex PCR eljárással meghatározta a transzgen kópia számát. Az így kapott PCR termékeket gélelektroforézissel elválasztotta. A gélképeken jól látható a genotípusok közötti különbség, amelyről a későbbiekben majd még említést teszek (20. ábra).

Ezt követően elkezdtem a homozigóta *gáspár* állomány bővítését abból a célból, hogy gyarapítsuk a *gáspár* egyedek számát és növeljük az állomány genetikai diverzitását is. Ugyanazt a megközelítést használtam, mint az állomány kialakításakor, azzal a különbséggel, hogy esetemben mindkét szülő homozigóta transzgenikus volt, ezért csak a pigmentáltság alapján kellett szelektálnom az utódokat.

Első lépésként több csoportos ivatást is elvégeztem, ahol kereszteztem egymással homozigóta transzgenikus *gáspár* egyedeket, homozigóta transzgenikus *ddx4:egfp* egyedekkel. Majd az így keletkezett F1-es egyedek keresztezésével kialakított F2-es generációban már négy különböző fenotípus közül kellett kiszelektálnom a *gáspár* egyedeket. Először a második napon a bőrben lévő melanofóra fekete pigment alapján, amely csak a *roy orbison* és a vad vonalakban termelődött. Majd ezt követően az ötödik napon, ahol pedig a szemben lévő reflektív pigment alapján ki tudtam mikroszkóp segítségével szelektálni a fekete szemű *gáspárokat* a csillogó szemű *nacre* egyedek közül (1. táblázat).

1. táblázat: A különböző pigment mutánsok* előfordulása

Keresztezés	Tejes				
	F1	+/+	N/+	+/R	N/R
Ikrás	+/+	+/+; +/+	+/N; +/+	+/+; +/R	+/N; +/R
	N/+	N/+; +/+	N/N; +/+	N/+; +/R	N/N; +/R
	+/R	+/+; R/+	+/N; R/+	+/+; R/R	+/N; R/R
	N/R	N/+; R/+	N/N; R/+	N/+; R/R	N/N; R/R

*A fehér színnel a pigmentált vad típust (56,25%); citromsárgával a *nacre* vonalat (18,75%); késsel a *roy orbison* mutáns (18,75%); míg a narancssárgával a *gáspár* vonalat (6,25%) jelöltem. Allélek jelölése: +, vad; N, *nacre*; R, *roy orbison*.

3.11. Statisztikai analízis

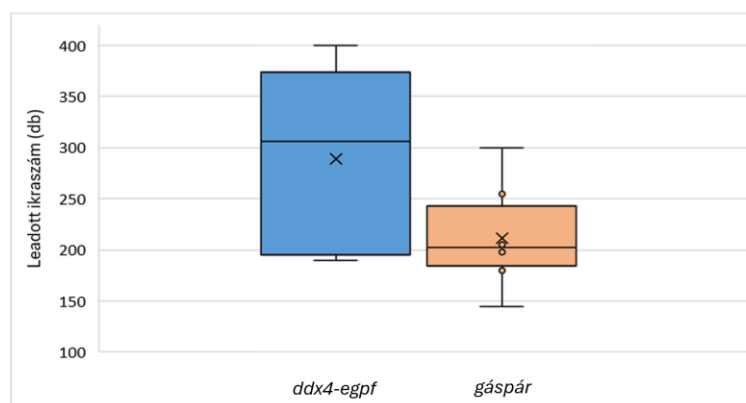
Az adatok statisztikai vizsgálatára több módszert is alkalmaztunk. F-próbát használtunk az eredmények átlagainak összehasonlítására, T-próbát pedig arra, hogy megnézzük van-e szignifikáns különbség az adatok közt. A szignifikancia szintet 0,05-ben határoztuk meg, így amely különbség elérte ezt a szintet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

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A pigmentált transzgenikus családok nem produkáltak szignifikánsan több ikrát a pigmenthiányos családoknál

A pigmentált $tg\{ddx4:gfp\}$ és a pigmenthiányos $gáspár$ vonalak összehasonlító elemzése során először a szaporaságot vizsgáltam. Munkám során nyolc (4+4) szülőpárt szaporítottam, melyek a következő jelöléseket kapták: $tg\{ddx4:gfp\}$ 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 $tg\{ddx4:gfp\}$ 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.

A szaporításonkénti átlagos ikraszám összehasonlítása azt mutatta, hogy a $tg\{ddx4:gfp\}$ szülőpárok jóval termékenyebbek 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 $tg\{ddx4:gfp\}$ szülőpárok több ikrát adtak le, mint a pigmenthiányos $gáspár$ szülőpárok, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. A 'box plot'-okban négy-négy páronkénti ivatásból kapott adatokat ábrázoltuk. A $tg\{ddx4:gfp\}$ vonal (kék, bal) esetében öt, míg a $gáspár$ vonal (narancs, jobb) esetében nyolc ivatásból származó ikraszámot összegeztük. A statisztikai analízist a véletlenszerűen kiválasztott 4-4 sikeres ivatás ikraszámai alapján Student t-próbával végeztük.

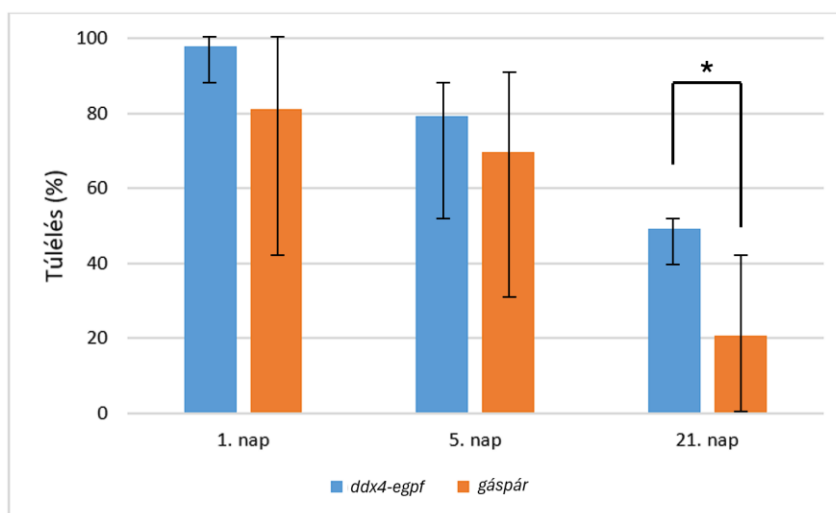
4.2 A pigmentált egyedek túlélési aránya három hetes korban szignifikánsan magasabb volt a pigmenthiányosokénál

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. Elsőkörben 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.

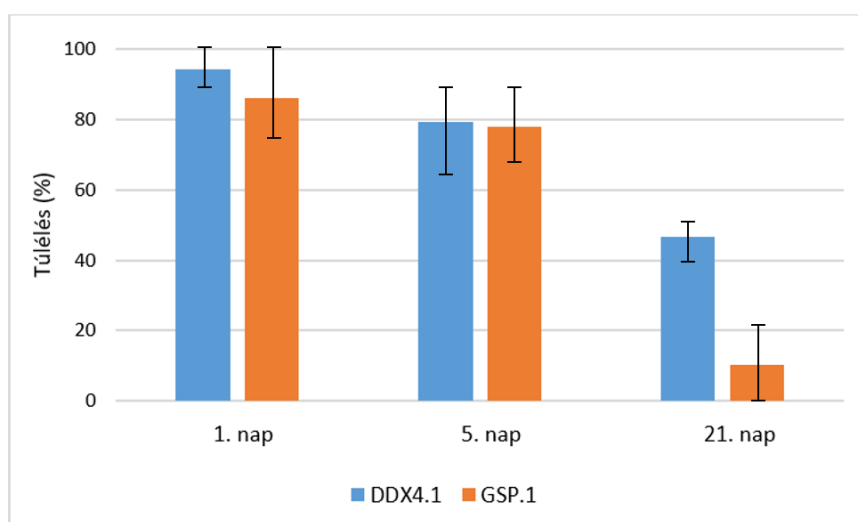
Az eredmények azt mutatták, hogy az átlagos túlélés az ötödik egyedfejlődési napra a pigmentált családok esetében 79 %, a pigment szegény vonal esetében pedig 69 % volt, azaz nem volt számottevő különbség a *tg{ddx4:gfp}* és a *gáspár* vonal egyedeinek túlélése között. A különbségek a két vonal között 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:gfp}* 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 azt mutatta, hogy a *tg{ddx4:gfp}* szülőpárok utódai szignifikánsan jobb túlélést mutattak.

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:gfp}* 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:gfp}* családnak. A 21. napos korra azonban a túlélési egyedszám nagy különbségeket mutatott. A *tg{ddx4:gfp}* család egyedeinek 46.5 %-a, a kiemelt *gáspár* családnak pedig csupán 10.33 %-a élt túl a kísérlet lezárásáig (**14. ábra**). Mivel a csoportok nagyon eltérő egyedszámúak voltak, így nem tudtam statisztikai számolást végezni a szignifikancia szint megállapítására.



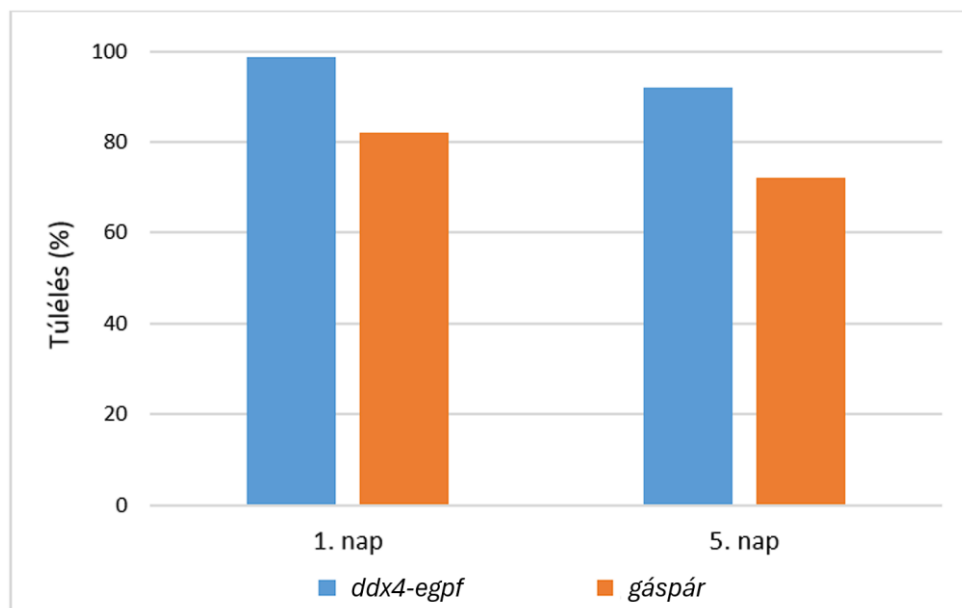
13. ábra: A $tg\{ddx4:gfp\}$ és $gáspár$ utódok túlélése a korai időpontoknál nem különbözött, de 21 dpf korban szignifikánsan magasabb volt pigmentált egyedekben. Az oszlopokban négy-négy szülőpártól, és a $tg\{ddx4:gfp\}$ vonal (kék, bal) esetében öt, míg a $gáspár$ vonal (narancs, jobb) esetében nyolc ivatásból származó adatokat összegeztünk. A statisztikai analízist Student t-próbával végeztük a kiválasztott szaporítások alapján (* - $p < 0.02$).



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

Összegezve, a két vonal szaporaságának és túlélési arányának elemzésével bebizonyítottam, hogy a $gáspár$ vonal egyedei valóban gyengébben teljesítenek a pigmentált transzgenikus vonalhoz képest. Ez egy újabb bizonyíték lehet arra, hogy a pigmentek hiánya, amelyek fontos védekezési folyamatokban vesznek részt, negatívan befolyásolhatja a túlélés esélyét (Patterson és Parichy, 2019).

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 lárvákon is. A $tg\{d dx4:gfp\}$ 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 $tg\{d dx4:gfp\}$ 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.



15. ábra: A $tg\{d dx4:gfp\}$ és $gáspár$ egyedek túlélési aránya egy csoportos szaporításból származó embriók és lárvák esetében sem mutatott különbséget az első öt nap során. A kék oszlopok a $tg\{d dx4:gfp\}$ vonalból, míg a narancs oszlopok a $gáspár$ vonalból származó adatokat összegzik.

4.3 A tartási sűrűség meghatározó lehet a túlélés mértéke szempontjából

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:gfp}* (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 (**2. táblázat**).

A maradék csoport kiindulási egyedszáma a két *tg{ddx4:gfp}* család esetében volt a legnagyobb (n=250 és 156), míg a *gáspár* csoportok esetében jóval alacsonyabb (n=150, 105 és 100) (**2. 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**).

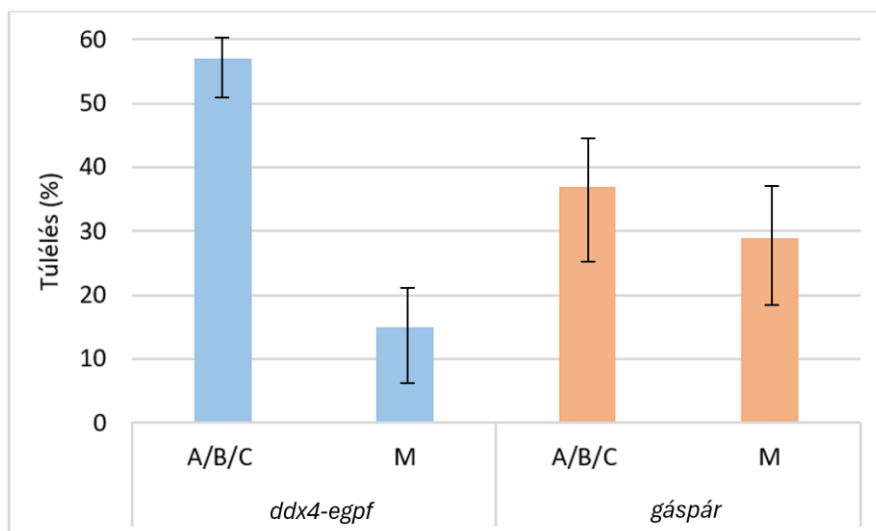
2. táblázat: Az egyedsűrűség drasztikus növelése negatívan befolyásolta a túlélést

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:gfp}* szülőpárokat jelzi

** a sárga kiemelés a *gáspár* szülőpárokat jelzi

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 majd több család esetében megvizsgálni.

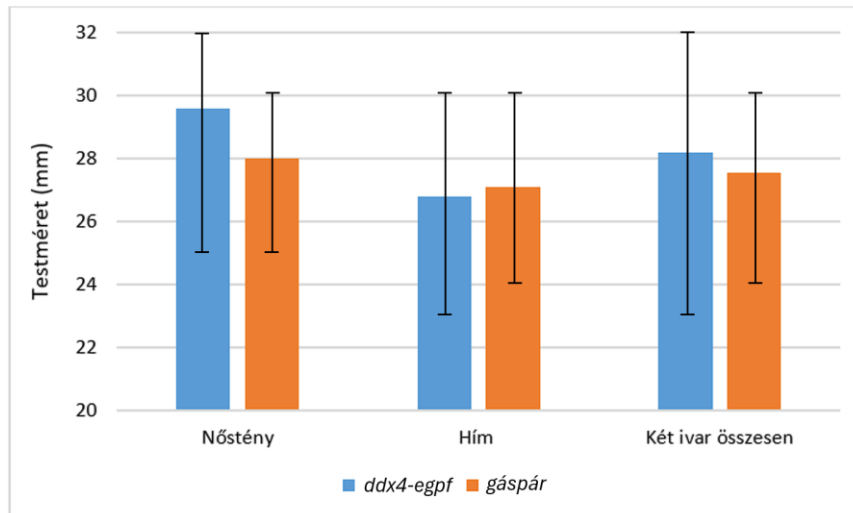


16. ábra: A magas tartási sűrűség csökkentheti a túlélés esélyeit.

A kiemelt családok utódainak A/B/C csoportjait ötven egyedenként, míg a maradék (M) csoportjait ugyanakkora csészében magasabb (átlagosan 203 (kék), illetve 118 (narancs) egyed számmal neveltük, a kék oszlopok a *tg{ddx4:gfp}* vonalból, míg a narancs oszlopok a *gáspár* vonalból származó adatokat összegzik az átlagos túlélés alapján.

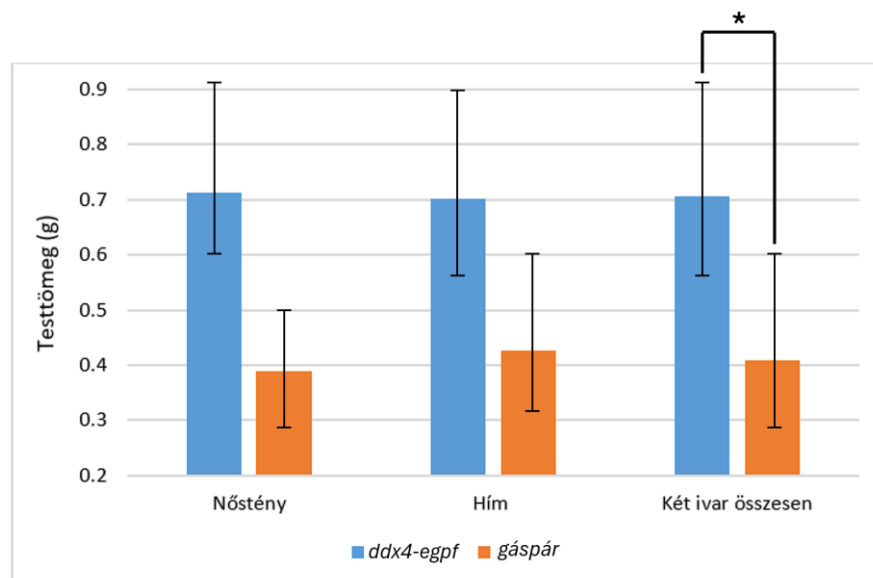
4.4 A *tg{ddx4:gfp}* egyedek testtömege szignifikánsan nagyobb volt a *gáspár* egyedekénél

A halak növekedési erélyének megállapításához a két vonalból 10-10 ikrást és hímét hasonlítottunk össze sztenderd testhossz és testtömeg alapján. A méréseket Szabó Olivér, míg az adatok statisztikai analízisét én magam végeztem el. Az analízis során először ivaronként hasonlítottam össze a két vonal sztenderd testhosszát. Az adatok alapján a nőstények esetében volt nagyobb különbség a két vonal között, azonban az elhanyagolható mértékűnek mondható, mindössze 1.6 mm. A két vonal sztenderd testhosszát az ivarok átlagolásával is összehasonlítottam, ennek eredménye sem adott számottevő különbséget a *tg{ddx4:gfp}* és a *gáspár* vonal között. A hímek összehasonlítása során látható, hogy nincsen jelentős különbség, míg az ikrások esetében már számottevőbb. Ezért a nőstényeken külön elvégeztem a statisztikai analízist Student t-próbával, de ennek az eredménye sem mutatott szignifikáns különbséget (17. ábra).



17. ábra: A $tg\{ddx4:gfp\}$ és $gáspár$ vonalak egyedeinek a sztenderd testhossza felnőtt korban hasonló volt. A kék oszlopok a $tg\{ddx4:gfp\}$ vonalból, míg a narancs oszlopok a $gáspár$ vonalból származó adatokat összegzik. A hímek esetében láthatóan nem volt akkora különbség, mint az ikrások esetében. A szignifikancia szinteket az ikrásokon Student t-próbával vizsgáltuk.

A két vonal testtömegének vizsgálatát ugyanilyen formában ellenőriztem. A $tg\{ddx4:gfp\}$ 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 a két ivart együtt vizsgálva a statisztikai analízis alapján szignifikánsnak bizonyult ($p < 0.05$; 18. ábra).



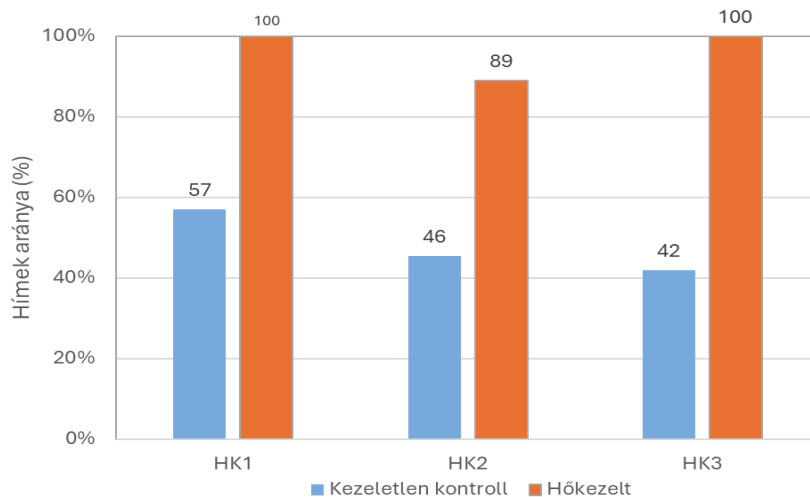
18. ábra: A testtömegek összehasonlítása a két ivar együttes összevetésénél a $tg\{ddx4:gfp\}$ vonal egyedeinek átlagát szignifikánsan nagyobbak mutatta. A kék oszlopok a $tg\{ddx4:gfp\}$ vonalból, míg a narancs oszlopok a $gáspár$ vonalból származó adatokat összegzik. A statisztikai analízist Student t-próbával végeztük (* - $p < 0,05$).

4.5 A hőkezelt család utódaiban jelentős ivararány eltolódást tudtam kimutatni a hímek irányába

A hőkezeléseket a túlélési megfigyeléseknél már ismerttetett DDX4.1 család utódain kezdtem el. Azért választottuk ki ezt a családot, mert a kezeletlen (kontroll) egyedek ivararánya ~50%-os volt 300 egyedet megvizsgálva, ezáltal egy esetleges kisebb mértékű, a hímek irányába történő ivararány eltolódást is fel lehet ismerni benne. Összesen három hőkezelést (HK1, HK2 és HK3) végeztem el ezen a családon (ugyanazon ikrás és hím keresztezéséből származó utódokon).

Mindhárom hőkezelés során ki tudtam mutatni az utódokban a hőkezelés okozta ivararány eltolódást 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. A HK3-csoportnál pedig a kezelt csoportban 100% volt a hímek aránya (n=14), a kontroll csoportban pedig 42% (n=18), ebben az **esetben 58%-os** ivararány eltolás történt. (**19. ábra**). Az eredmények alapján sikeresen azonosítottam egy hőre válaszoló pigmentált családot (DDX4.1), amelyben három független kísérlet során jelentősen nőtt a hímek aránya a hőkezelés hatására.

Ezt követően a pigmenthiányos gáspár vonalon is öt alkalommal végeztem hőkezeléseket, de egyik esetben sem jártam sikerrel, mivel a nagy mértékű elhullás miatt le kellett állítani a kísérleteket. Ennek oka feltételezhetően a gyengébb immunrendszer, mivel a pigmentek hiánya negatívan befolyásol egyes immunrendszeri folyamatokat.

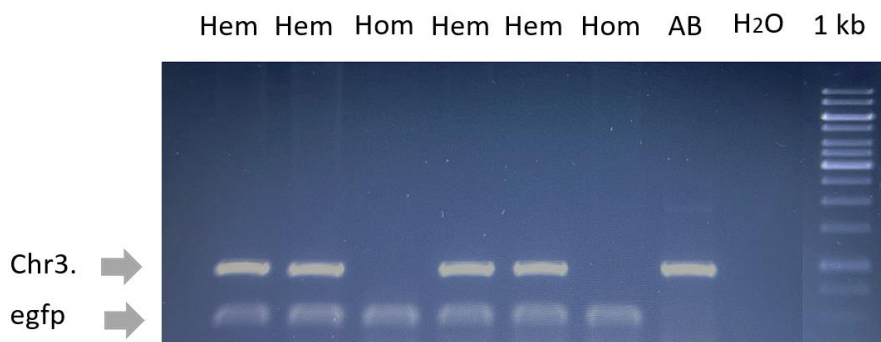


19. ábra: A korai hőkezelések során azonosítottam egy hőre válaszoló családot, melyben a hímek aránya mindhárom kezelés eredményeként jelentősen megemelkedett. A kék oszlopok a kezeletlen kontroll csoportokban, míg a narancssárga oszlopok a hőkezelt csoportokban mutatják a hímek arányát. (Rövidítések: HK1- első hőkezelés; HK2 – második hőkezelés; HK3- harmadik hőkezelés)

4.6 Új *gáspár* egyedek azonosítása az állomány bővítése céljából

Egyik fontos feladatomban a *gáspár* tenyészállomány egyedszámának bővítése volt annak stabilitásának növelése és a genetikai változatosság fokozása céljából. Hallgatótársam, Szabó Olivér Máté korábbi munkája során nem szűrte ki az összes *gáspár* egyedet a hemizigóták közül a transzgén kópiaszáma alapján (Szabó, 2023). Mivel ezek a halak rendelkezésemre álltak és megfelelőek voltak az állomány bővítésére ezért elvégeztem rajtuk egy a korábbi munkából átvett és beállított duplex PCR alapú analízist (Szabó, 2025), hogy megtaláljam a transzgént homozigóta formában hordozó halakat.

Összesen 83 *gáspár* egyed genom DNS-ét vizsgáltam meg PCR-rel. A duplex PCR reakció termékeit 2%-os agaróz gélen választottam el (**20. ábra**). A megvizsgált egyedekből 78 bizonyult homozigóta transzgénikus *gáspár*-nak. Az újonnan kiválasztott homozigóta *gáspár* egyedeket a továbbiakban kollégáim fel fogják használni állománybővítési és kísérleti célokra egyaránt.



20. ábra: Új homozigóta *gáspár* egyedek azonosítása kettős PCR reakcióval.

A kópiaszám meghatározásához két olyan primert használtam, ami korábbi PCR tesztek által biztosan működnek. A transzgén jelenlétét mutató *egfp* primer párt (alsó fragment, 415 bp) és a kiesett genomi régiót célzó primer párt (felső fragment, 815 bp) együtt sokszorozítottuk fel egy duplex PCR reakciókban. (Rövidítések: Hem – hemizigóta, Hom – homozigóta, Chr3 – a 3-as kromoszóma, *egfp* – a transzgén, AB – transzgénmentes kontroll, H₂O – templátmentes kontroll, 1 kb – molekulásúly marker).

4.7 Új *gáspár* állomány kialakítása egyszerűsített szelekcióval

Ahogy már korábbiakban is részleteztem az eredeti *gáspár* állomány tovább szűrése mellett, elkezdtem a meglévő homozigóta állomány bővítését. Öt különböző alkalommal homozigóta *gáspár* egyedeket kereszteztem homozigóta pigmentált transzgénikus *tg{ddx4:gfp}* egyedekkel. Az így kapott F1-es generációban még egyöntetűen vad fenotípusú volt az összes egyed, mivel a fekete és ezüstös pigmentekért felelős gének domináns módon öröklődnek. Így ezt a generációt szintén fel kellett nevelni ahhoz, hogy szaporítani tudjam őket, és az így keletkezett F2-es generációban, már négy különböző pigment fenotípus közül válogattam ki a *gáspár* egyedeket. Mivel a szülők mindegyike hordozta a transzgént, így arra nem kellett tesztelnem. A kutatásom során közel 3000 ikrát állítottam elő szaporításokkal, ebből csupán nyolc százalék volt az általam keresett vonalba tartozó egyedek aránya. Ezáltal körülbelül 240 *gáspár* egyed tudtam kiszelektálni, amelyből az elhullások következtében 55 felnőtt halat nyertem. Ez a szám elég volt ahhoz, hogy az állományunk létszámát jelentősen növelni tudjuk és csökkentjük a jövőbeni beltenyésztés esélyeit.

4.8 Hozzájárulások

A kísérletek megtervezését és a munkám során elért eredményeim kiértékelését és feldolgozását külső konzulenseim Dr. Szeverényi Ildikó és Dr. Orbán László irányításával végeztem. Ők voltak a témavezetőim egészen a munkám késői szakaszáig, azonban ezt követően is tovább segítettek a kutatásomat a tanácsadásukkal. A napi munkámhoz szükséges alapvető ismereteket Szabó Olivér Mátétól és Hirth Mirellától tanultam meg. A PCR-es kísérleteket és a *gáspár* egyedek szelekcióját 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 volt Horváth Kornél, Marton Csaba és az Élvonal Halgenomikai Kutatócsoport munkatársai.

Össességében a jelen szakdolgozatban lévő munkák 75%-át én magam végeztem el.

5. Limitációk

5.1. A túlélési arány összehasonlítását hátráltató tényezők

A szaporítás mind a *tg{dtx4:gfp}* és a pigment hiányos *gáspár* vonalon nehéznek bizonyult mivel több esetben nem adtak a tenyészpárok ikrát. A szülőpárokat esetenként akár 7-8-szor is felraktuk ivatni, azonban a sikeres ivatások száma egy-egy családnál maximum három alkalom 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 vad típusú zebradániók ivara a fenotípusos jegyek alapján csak három hónapos korban határozható meg (Von Hofsten és Olsson, 2005), 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:gfp}* vonalhoz hasonló túlélő egyed számot tudjunk produkálni a *gáspár* vonalon is, meg kell növelni a szülőpárok és szaporítások számát. Kéthetes intenzitással kell majd szaporításokat elvégezni, hogy megfelelő ikra mennyiség álljon rendelkezésre. 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 ellenállképességre 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 szoktatják át az új környezethez, vagy esetlegesen a táp változtatáshoz. Kellő figyelemmel kell lenni 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 legalább 6-8 szülőpárt kell vonalanként egyszerre ivatni, hogy növeljük a sikeres ivatások esélyét.
- (4) Eredményeim 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 adott ivadékcsoporthoz a túlélési arányát akkor érdemes őket ikra állapottól kezdve kisebb csoportokban tartani.

7. Összefoglalás

A kutatásaimat az Élvtal Halgenomikai Kutatócsoport keszthelyi laboratóriumában végeztem a zebradánió modellen. Csoportunkban ennek a fajnak a szaporodásbiológiáját vizsgáljuk, elsősorban azt, hogyan alakulnak ki az ivarok az ún. *tg{dtx4: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 növekedésük során összehasonlítsam és ezáltal elvégezzem a *gáspár* vonal alapszintű jellemzését. A kísérleteim során vizsgáltam a két vonal utódainak túlélését, és kimutattam, hogy a pigmentált *tg{dtx4:egfp}* vonal esetében szignifikánsan magasabb az utódok túlélési aránya az ötödik napon amikor kikerültek az inkubátorból. A két vonal súlygyarapodásának összehasonlításával szintén szignifikáns különbséget tudtam kimutatni a pigmentált vonal javára. Elvégeztem továbbá hőkezeléseket az ivararány hímek irányába billentése céljából, ennek során sikeresen azonosítottam egy hőre válaszoló családot. Továbbá bővítettem a laborunkban lévő *gáspár* állományt pigment alapú szelekciós eljárással. 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 folyó munkákhoz. Emellett a munkám során számos ismeretet és tudást sajátíthattam el, ami nagyon hasznos lesz a későbbi tudományos munkáim során.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Beliczky Gábornak, hogy a munka késői fázisában átvette a témavezetői feladatokat, segített bebiztosítani a gyakorlati helyemet a Pelso Fish Zrt-nél, és leellenőrizte a diplomamunkámat a beadás előtt.

Köszönöm Dr. Szeverényi Ildikónak és Dr. Orbán Lászlónak, hogy vállalták a szakdolgozatom témavezetését, a munkám során rengeteg tanáccsal láttak el, és segítettek a TDK-dolgozatom ill. diplomamunkám 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, 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 segítettek a kísérleti halaimat tartani és felnevelni.

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

9. Irodalomjegyzék

- Augstenová, B. és W-J. Ma (2025). Decoding Dmrt1: insights into vertebrate sex determination and gonadal sex differentiation, *Journal of Evolutionary Biology* 38(7): 811–831, <https://doi.org/10.1093/jeb/voaf031>
- Campbell, C.A., O. Fursova, X. Cheng, E. Snella, A. McCune, L. Li, B. Solchenberger, és mtsai (2021). A zebrafish model of granulins 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, és 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. és 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., és R.A. Wingert (2023). Zebrafish as a model to study retinoic acid signaling in development and disease. *Biomedicines* 11(4): 4-5. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041180>.
- Kimmel, C.B., W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, és 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. és 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. és 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., és L. Orbán (2014). Zebrafish Sex: A complicated affair. *Briefings in Functional Genomics* 13 (2): 172–87. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt041>.
- Liew, W.C., R. Bartfai, Z. Lim, R. Sreenivasan, K.R. Siegfried, és L. Orbán (2012). Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS ONE* 7(4): 9-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034397>.
- Luzio, A., Santos, D., Monteiro, S. M., & Coimbra, A. M. (2021). Zebrafish male differentiation: Do all testes go through a juvenile ovary stage? *Tissue and Cell*, 72, 101545: (3-5) <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101545>
- Nagahama, Y., & Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation*, 50, S195-S219. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- Nusslein -Volhard, C., és R. Dahm (2002). *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford University Press (Book).
- Orbán, L., R. Sreenivasan és P-E. Olsson (2009). Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312: 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.014>

- Patterson, L.B., és 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, C. (2023). Hőmérséklet okozta ivararány változásvizsgálata zebraadánió modellen. OTDK Kaposvár 2023
- Ribas, L., W.C. Liew, N. Díaz, R. Sreenivasan, L. Orbán, és F. Piferrer (2017a). 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): E941-E950. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609411114>.
- Ribas, L., A. Valdivieso, N. Díaz és Francesc Piferrer (2017b). Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. *Journal of Experimental Biology* 220(6), 1056–1064. <https://doi.org/10.1242/jeb.144980>
- Sreenivasan, R., J. Jiang, X. Wang, R. Bártfai, H.Y. Kwan, A. Christoffels, és L. Orbán (2014). Gonad differentiation in zebrafish is regulated by the canonical Wnt signaling pathway. *Biology of Reproduction* 90(2): 2-6. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110874>.
- Szabó, O.M. (2023). Ivar-specifikusan expresszálódó transzgen bevitele átlátszó zebraadánióba korai szelekciós eljárással. OTDK Kaposvár, 2023.
- Szabó, O.M., Hirth M., Szabó Gy., Orbán L. és 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 10th European Zebrafish Conference, Krakko, Lengyelország, 2023.
- Takahashi, H. (1977). Juvenile Hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* 28: 57-65. [https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/23605/1/28\(2\)_P57-65.pdf](https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/23605/1/28(2)_P57-65.pdf)
- Trevarrow, B., és 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, és 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., és 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, és 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>.
- Warner, D. A., és 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 és C. Bourque (2008). Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2(2): 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.002>.

10. Mellékletek

Mellékletek 1. táblázat: A sikeres szaporítások során a *tg{ddx4-egfp}* vonal családjai átlagosan több ikrát adtak le.

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 jobb túlélést mutattak.

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{dtx4-egfp}* és *gáspár* vonal növekedési erélyének összehasonlítása során találtunk szignifikanciát a két vonal között.

Vasa és Gáspár halak testméretének összehasonlítása					
Vonal	Születés	Ha ID	Ivar	Testméret (mm)	Testsúly (g)
DDX4.	2024.01.10 (7mpf)	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
GRP.	2023.10.30 (9mpf)	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

*DDX4.: *tg{dtx4-egfp}* vonal egyedeit jelöli a táblázatban

**GRP.: *gáspár* vonal egyedeit jelöli a táblázatban

11. Nyilatkozatok

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Cseresznyés Ferenc
A Hallgató Neptun kódja: IWPK2J
A dolgozat címe: Egy új, átlátszó zebra-dánió vonal állományának kialakítása és összehasonlító jellemzése
A megjelenés éve: 2025.
A konzulens intézetének neve: Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet (AKI)
A konzulens tanszékének a neve: Alkalmazott Halbiológiai Tanszék, Georgikon Campus, Keszthely

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szöveggenerálás, nyelvi javítás, fordítás, adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2025 év 11 hó 01 nap



Hallgató aláírása

Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

1. Általános adatok

Hallgató neve:	Cseresznyés Ferenc
Neptun-kódja:	IWPK2J
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	BSc/BA
Tantárgy neve/kódja*:	szakdolgozat
A munka címe:	Egy új, átlátszó zebra-dánió vonal állományának kialakítása és összehasonlító jellemzése

2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

- A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.
(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)
- B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.
(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrektúra, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
-	-	-

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

*(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka **mellékletében való csatolása szükséges.**)*

A felhasználás célja	Alkalmazott eszköz verziója, elérhetősége	MI-neve,	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma
-	-	-	-	-

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

Nincsenek ilyenek.

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: 2025. 11 hó 01 nap



.....

Hallgató aláírása



Konzulens/Témavezető aláírása

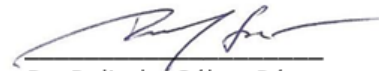
NYILATKOZAT

Cseresznyés Ferenc (hallgató Neptun azonosítója: IWPK2J) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védésre **javaslom**.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: **nem**

Kelt: Keszthely, 2025.11.01.



Dr. Beliczky Gábor Péter
belső konzulens