



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

**Néhány Bovinae faj X- és Y-kromoszómáinak detektálása fluoreszcens in situ
hibridizációval és vizsgálata azok evolúciója és
az X- Y-spermiumok elkülöníthetősége szempontjából**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

készítette:

Révay Tamás

BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

témavezetők:

Prof. Salgó András, tanszékvezető

BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Dr. Kovács András, az állatorvos-tudomány doktora

Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet

2003

Bevezetés

A megszületendő utód nemének befolyásolása a szaporodásbiológiával foglalkozó szakemberek régi vágya. Bár egy ilyen lehetőség beavatkozik a természet rendjébe, fontos orvosi alkalmazásokat ígér vagy az állattenyésztésben gazdasági előnyökkel bír. Segítségével az ivari kromoszómákhoz kötött öröklődő betegségek manifesztálódása kivédhetővé válna, lehetőséget teremtve a hordozó szülőknek a gyermekvállalásra. Az állattenyésztésben a tejelő, vagy hús típusú állomány speciális tenyésztési sémáinak megvalósításában hatalmas jelentősége van az egyes célpárosításokból a kívánt ivarú borjak lehető leggyorsabb, és így legkisebb költségű létrehozásának. A nőivar preferálásának magyarázata lehet, a tejtermelésen kívül, egyszerűen az, hogy a nagyobb ütemű szaporítás több nőtényt kíván, ill. a gyógyhatású anyagok, stb. transzgenikus állatokban való termeltetését legegyszerűbben a tejmirigyekre specializált génexpresszióval lehet megoldani. A hímivar egyértelmű előnyt élvez a hús típusú állományokban a gyorsabb növekedés és a nagyobb hasznos tömeg miatt.

Az elmúlt 80 évben számos metodikát fejlesztettek ki a probléma megoldására, a korai embriók ivarának implantációt megelőző meghatározástól kezdve, a termékenyítő hímivarsejtek ivari kromoszóma alapján történő elkülönítéséig. Ez utóbbi megoldás az állattenyésztés gyakorlata számára is elfogadható lenne, hiszen egyszerűen beilleszthető a - tejelő állományokban szinte kizárólagosan alkalmazott - mesterséges termékenyítés rendszerébe. A valamely ivarra dúsított termékenyítő anyag mélyfagyasztott tárolása, ill. kereskedelme biztosítaná a technológia gyors, világméretű elterjedését.

A spermiumok ivar szerinti elkülönítését célzó eljárások az X- és Y-kromoszóma méretkülönbségéből adódó, a különböző ivarú sejtek fizikai paramétereiben (felület, térfogat, fajlagos tömeg, motilitás), ill. a haploid génexpresszió eredményeként a sejtfelületek fehérjéiben, elektromos tulajdonságaiban lévő feltételezett vagy igazolt különbségeken alapulnak.

Az X-kromoszóma emlősök esetében 3-4%-al nagyobb az Y-nál. Ez a néhány százalékos különbség azonban megbízhatóan mérhető áramlási citometriával, a spermiumok teljes DNS tartalmát megjelölő és UV fényben detektálható festék segítségével. Az X- vagy Y-kromoszómát hordozó sejtek eltérő fluoreszcens jelet generálnak. A berendezés ennek megfelelően pozitív vagy negatív felületi töltést ad a sejtekre, amely egy elektromos erőterben lehetővé teszi azok elkülönítését. Jelenleg az áramlási citometrián alapuló szétválasztás az egyetlen igazoltan hatékony eljárás az X- és Y-spermiumok elkülönítésére. Annak ellenére, hogy több ezer különféle fajú állat született az ezzel az eljárással elkülönített spermiumokkal való termékenyítésekből, a technika

lehetséges káros hatásairól még nincs elég információ (DNS festés, UV besugárzás mutagenitása, elektromos erőtér hatása).

Bármely más, az előzőekben említett, az X- és Y-kromoszómát hordozó hímivarsejtek különbségét reprezentáló tulajdonságok valamelyikét kihasználni akaró eljárásról elmondható, hogy az irodalomban gyakran egymásnak ellentmondó, hol sikeres elkülönítésről, hol annak teljes kudarcáról beszámoló vizsgálatokat találunk. A sikertelenség két alapvető problémára vezethető vissza: 1.: az elkülönítésre használni kívánt tulajdonság objektív meghatározásának nehézsége és 2.: az elválasztás hatékonyságát ellenőrző nem megfelelően pontos és hatékony eljárások.

Napjainkban a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) módszerével lehetővé válik egyetlen mikroszkópos tárgylemezen több ezer sejt ivari kromoszóma tartalmának egyidejű és érzékeny vizsgálata, amely a megfelelő statisztikai értékeléshez elengedhetetlen.

Egy további fontos követelmény a hatékony szeparálást biztosító eljárással szemben, a sejtek életképességének, fertilitásának megőrzése.

Célkitűzések

Mindezek alapján munkám során a következő célok megvalósítására törekedtem:

- Egyszerű és hatékony FISH metodika kidolgozása, amellyel a szarvasmarha spermiumok ivararánya tesztelhető.
- A FISH eljárás alkalmazása a szarvasmarhával rokon fajok vizsgálatára (jak - *Bos /Poephagus/grunniens*, L.; bivaly - *Bubalus bubalis*, L.). Az ivari kromoszómák vizsgálata egyrészt információval szolgálhat a kromoszóma evolúció során bekövetkezett molekuláris szintű változásokról, másrészt támogatja ezen állattenyésztési szempontból bizonyos országok számára (Kína, Olaszország) nagy gazdasági jelentőségű fajok esetén, az ivar-orientált termékenyítő anyag előállítását célzó kísérleteket.
- A különböző sperma szeparálási módszerek hatékonyságát és a sejtekre gyakorolt hatását egyszerre vizsgálni képes eljárás kidolgozása.
- Az X-és Y- kromoszómát hordozó szarvasmarha spermiumok fejfelületének meghatározása, figyelembe véve a sejtek élő/elhalt státuszát is.

Alkalmazott módszerek

- A szarvasmarha, jak és bivaly metafázisos kromoszómák preparálása 72 órás limfocita kultúrákból történt a standard citogenetikai technikával colcemid és hipotóniás kezeléssel.
- A lókuszt specifikus szarvasmarha BC1.2 hibridizációs próba előállítására a polimeráz láncreakciót (PCR) használtam szarvasmarha genomi DNS templáton. A terméket ugyanezen reakcióban biotin-16-dUTP beépítésével jelöltem.
- A teljes szarvasmarha X- és Y-kromoszómát jelölő ún. „painting” próbákat (Cambio, UK) jak sejt kultúrából áramlási citometriával szétválogatták, majd DOP-PCR-el (Degenerate Oligonucleotide Priming-PCR) sokszorozták és jelölték (X-biotin, Y-Cy3).
- A BC1.2 próbát és az X-Y „painting próbát” fluoreszcens in situ hibridizációval detektáltam spermiumokban. Azok specificitását metafázisos kromoszómákon teszteltem. A spermiumok kompakt kromatin állományát papain emésztéssel dekondezáltam. A biotinált próbákat két réteg avidin-FITC (fluoreszcein-izotiocianát) vagy a TSA (Tyramide Signal Amplification System) rendszer segítségével detektáltam. A direkt fluoreszcens jelölt (Cy3) próbát közvetlenül a mikroszkópban detektáltam. A kromoszómákat ill. sejteket DAPI (4,6-diamino-fenilindol) háttérfestéssel tettem láthatóvá. A preparátumokat Zeiss Opton ill. Olympus BX-60 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam. Az érdekes részokről az előbbi mikroszkóp esetén hagyományos fotófeltét, utóbbinál Cohu FF CCD kamera és az ISIS képanalizáló program segítségével készítettem felvételeket. A fejmérésekhez a Scion Image Beta 4.0.2. programot használtam.
- A statisztikai értékeléshez a chí négyzet próbát ill. variancia analízist használtam a MS Excel és a Statistica programokkal.

Eredmények és Értékelésük

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció során a tárgylemezen rögzített preparátum DNS tartalmát hődenaturáljuk, majd a vizsgálandó DNS szakaszhoz komplementer, szintén egyszálú jelölt DNS próbát hibridizálunk. A módszer állatgenetikai alkalmazásakor a legnagyobb problémát a megfelelő próba előállítása, beszerzése jelenti. Az ember és az egér bármely kromoszómáját, vagy azok részeit specifikusan jelölő próbák több cégtől is megvásárolhatóak, míg a haszonállatoknál ez csak napjainkban kezd megvalósulni. Ezért az egyes munkacsoportok különböző módszerekkel előállított saját próbát használnak. Ennek egyik lehetősége a kívánt kromoszóma darab metafázisos preparátumokról mikromanipulátorral irányított üvegtüvel történő izolálása és a DNS random polimeráz láncreakcióval (DOP-PCR) sokszorosítása. A mikromanipuláció nagy gyakorlatot, biztos kezet kíván, hiszen más kromoszómák akárcsak megérintése a tüvel szennyezést, nem specifikus hibridizációs jelet eredményez. Ez egyben rávilágít a technika kivitelezéséhez elvárt extrém sterilitás szükségességére is, hiszen minden szennyező DNS bekerül a később mégeggy PCR-el jelölt próba szekvenciájába. További hátrány, hogy a próba ezzel a módszerrel csak limitált mennyiségben állítható elő, szükségessé téve az egész eljárás változó sikerű ismétlését. A különböző nagy méretű klónok (cosmid, BAC = bakteriális-, YAC = élesztő mesterséges kromoszóma) egyszerűen kezelhető, érzékeny hibridizációs próbaként használhatók, azonban meg kell említeni a klónok folyamatos fenntartásának, szaporításának, a DNS sejtekből történő izolálásának munka és labor igényét. Mindez ugyanakkor eltörpül a klóntár létrehozásának, egy-egy kromoszóma specifikus klón szelekciójának költség-, idő- és munkaigénye mellett. Munkatársaim külföldi együttműködésben mindkét eljárást sikeresen használták a szarvasmarha ivari-kromoszómák vizsgálatára, azonban a hazai körülményekhez alkalmazkodó, a szaporodásbiológiai alap kutatásokat és a gyakorlatot támogató módszer hiányzott. A legegyszerűbben előállítható próbák ismert lokalizációjú ismétlődő szekvenciákat céloznak. Ezek egyes esetekben specifikus PCR reakcióval előállíthatók és jelölhetők. Egy ilyen, a szarvasmarha BC1.2 lókuszt jelölő ismétlődő szekvenciákból felépülő próbát adaptáltam és optimalizáltam. A PCR körülmények a lehető legnagyobb mennyiségű termék előállítását célozzák, ugyanakkor a $MgCl_2$ koncentráció finom csökkentésével a nem kívánt melléktermékek (ún. primer dimerek) keletkezése elkerülhető volt. Így a hibridizációs próba egy reakcióban genomiális DNS-ből előállítható, jelölhető és további tisztítási lépéseket nem alkalmazva a hibridizációs reakcióban közvetlenül használható. A próba detektálásához két különböző rendszert használtam. Két réteg avidin-FITC beépítése, a Zeiss Opton mikroszkópban szabad szemmel történő értékelést nem tette lehetővé, ezért a nagyobb jelerősséget produkáló TSA rendszert használtam az Y-kromoszóma szarvasmarha spermiumokban történő kimutatásához. Ez utóbbi rendszer a próba szekvenciába beépített biotinhoz kapcsolódó

streptavidin-HRP (streptavidin-horseradish peroxidase) és a peroxidáz által felszabadított, nagy mennyiségben a biotin mikrokörnyezetében a tárgylemezre kötődő reaktív fluoreszcein-tiramid molekulák miatt, lehetővé tette a hibridizációs jel egyértelmű, és érzékeny detektálását.

A szarvasmarha BC1.2 próbát - az ivari kromoszómák morfológiáját tekintve igen hasonló, jak mintákon (metafázisos kromoszómák, spermiumok) is sikerrel detektáltam, ezzel egy egyszerű és gyors analitikai módszert fejlesztve az ezen fajon végezett spermatológiai, szexuális kutatásokhoz.

A bivalytenyésztés ivari polarizáltsága néhány országban (pl. Olaszország) extrém, lévén a nőivar szinte kizárólagos hasznosításának (Mozzarella készítés). A BC1.2 próba használatával a spermiumok több mint 48%-ban jól detektálható Y-kromoszóma specifikus szignált kaptam. A szarvasmarha X- és Y-kromoszómáit jelölő painting próbákkal pedig a vizsgált sejtek több mint 92%-a volt értékelhető (46.8% X and 45.8% Y).

A FISH spermiumokban történő alkalmazásához szükség van a tömör DNS állomány fellazítására, dekonzenzációjára. Ezt papain emésztéssel végeztem mindhárom vizsgált faj esetében és fajonként eltérő érzékenységet tapasztaltam. A szarvasmarha spermiumok elégséges dekonzenzációjához (fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva a sejtek feje kb. kétszeresére duzzad) 5 perc volt az optimális emésztési idő. A bivaly spermiumok ennél nagyobb érzékenységet muttak (1-3 perc), míg a jak sejteken 15-25 perc kezelés volt szükséges a megfelelően kompakt, hatékonyan detektálható hibridizációs jelek eléréséhez. Ezt okozhatja talán a fajonként eltérő sejt-morfológia és összetétel, azonban a hosszabb ideig tárolt lemezek esetében tapasztalt kezelési idő növekedés, a preparátumok korának, a tárolás körülményeinek fontosságát hangsúlyozza.

Amellett, hogy fenti vizsgálatok a FISH jak és bivaly spermiumokon történő első alkalmazását jelentik, a hibridizációs szignálok metafázisos kromoszómákon történő tesztelése bepillantást nyújt a kromoszómák evolúció során bekövetkezett megváltozásába, vagy éppen adott szegmensek konzerváltságát jelzi. A szarvasmarha Y-kromoszóma rövid karon lokalizált BC1.2 próba megőrizte pozícióját a szintén szubmetacentrikus jak Y-kromoszómán, míg az akrocentrikus bivaly Y telomerikus régióját jelöli, molekuláris szinten igazolva egy pericentrikus inverzió bekövetkeztét. A szarvasmarha és jak ivari-kromoszómák homológiáját mutatja az X-Y painting próbák tökéletes hibridizációja. Ugyanezen próbák az akrocentrikus bivaly kromoszómák centromerikus régióit nem jelölik, ezzel az itt található repetitív szekvenciák gyors evolúciós megváltozását és/vagy egyes elemek elvesztését mutatják.

Bár a FISH eljárás az előzőekben is bizonyítottan alkalmas egy adott módszerrel előállított, valamely ivarra dúsított spermaminta ivararányának ellenőrzésére, a gyakorlat szempontjából fontos kérdés, hogy milyen káros hatásai vannak az adott eljárásnak a sejtek életképességére. Az ivararányt és a spermiumok élő/elhalt státuszát, morfológiáját szimultán vizsgálni képes eljárás a

szaporodásbiológiai kutatások fontos új eszköze lehet. Egy ilyen módszert sikerült kifejlesztem, a spermiumok élő/elhalt és akroszóma állapotát jelző tripánkék/Giemsa festés, papain dekonzenzáció és X-Y FISH konszekutív alkalmazásával. A tripánkék a festés pillanatában intakt membránnal rendelkező sejteket nem, míg a sérült membránú sejteket kékre festi. A festést fixáló neutrál vörös tartalmú savas formaldehid oldat csapadékot képez a sejtekbe jutott tripánkékkal, ami gátolja az elhalt sejtek enzimes dekonzenzációját, így a méretnövekedését és a kromatin fellazulását is. Ez a következő FISH során azt eredményezi, hogy DAPI festés után az élő és elhalt sejtek a fluoreszcens mikroszkópban a hibridizációs szignálokkal együtt jól felismerhetők. Az intakt sejtek nagy méretűek és sötét ibolya színnel festődnek, míg a membrán permeábilis elhaltak megőrzik eredeti méretüket és világoskék színűek. A differenciáláshoz szükséges dekonzenzációs emésztést 1 órán át 40°C-os vízfürdőben kell végezni. A élő sejtekben több, mint 95%-ban detektálható volt az X-vagy Y-kromoszóma, ugyanakkor dekonzenzáció hiányában az elhalt sejtek csak 25%-ban mutattak értékelhető jeleket. Szignifikánsan több Y-ivarsejt volt kimutatható ezen utóbbi sejtcsoportból, ami valószínűleg az Y-próba könnyebb detektálása miatt adódott, hiszen az nagyrészt repetitív elemeket tartalmaz, amik kevésbé igényelnek tökéletes dekonzenzációt a kötődéshez.

Az ivar-orientált termékenyítő anyag előállítását célzó, az áramlási citometriának alternatív technikák fejlesztésének egyik sarokpontja az adott tulajdonság különböző ivarú sejtek közötti különbségének objektív ismerete. Nagyon sok feltételezett különbséget mutató tulajdonság származtatható a spermiumok fejméretéből. Több mint 3000 élő/elhalt és akroszóma festéssel kategorizált szarvasmarha spermium fejfelületének megmérése után, ugyanazon sejtekben detektáltam az X/Y-kromoszómát FISH-el. A morfológiailag normál, élő, épp akroszómájú sejtek szignifikánsan kisebbnek adódtak az elhalt, sérült akroszómájú sejteknél ($41,52 \pm 2,56 \mu\text{m}^2$; $36,17 \pm 1,99 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). A normál X- vagy Y-kromoszómát hordozó ivarsejtek között nem találtam szignifikáns különbséget ($36,39 \pm 1,99 \mu\text{m}^2$; $36,23 \pm 1,95 \mu\text{m}^2$, $p > 0,5$). A vizsgált állatok között szignifikáns különbségek voltak kimutathatók minden sejt kategóriában ($p < 0,001$).

Új tudományos eredmények

1. Elsőként detektáltam a szarvasmarha specifikus BC1.2 lókuszt jelölő DNS próbát jak spermiumokban. A próba specificitását, ezzel a lókuszt konzerváltságát metafázisos kromoszómákon bizonyítottam.
2. Elsőként detektáltam a BC1.2 próbát a bivaly Y-kromoszómán - molekuláris szinten bizonyítva a kromoszóma sávtechnikákkal feltételezett -, az evolúció során bekövetkezett pericentrikus inverziót, a szarvasmarha megfelelő kromoszómájához képest. Teljes X-Y painting próba detektálásával a bivaly és a szarvasmarha szex-kromoszómák centromerikus régióiban különbséget találtam, amely az itt elhelyezkedő ismétlődő szekvenciák gyors evolúciós eltávolodásával, és/vagy a fajok közötti különbséggel magyarázható.
3. Mindkét fenti próbát elsőként használtam az ivari kromoszómák kimutatására bivaly hímivarsejtekben.
4. Kifejlesztettem egy módszert a spermiumok membrán integritásának, és ivari- kromoszóma tartalmának egyidejű vizsgálatára.
5. Elsőként határoztam meg az élő/elhalt, X-/Y-kromoszómát hordozó szarvasmarha spermiumok fejfelületét egyedi sejtekre vonatkozóan. Nem találtam különbséget az X-/Y- kromoszómát hordozó élő sejtek fejfelülete között, míg az elhalt sejtek szignifikánsan nagyobbak voltak az élőknél.

Az eredmények gyakorlati hasznosítása

1. Az ivari kromoszómák precíz vizsgálata jak és bivaly spermiumokban elősegíti az e fajkon történő módszerfejlesztéseket.
2. A spermiumok membrán integritásának, és ivari-kromoszóma tartalmának egyidejű vizsgálatára kifejlesztett módszer a jelenleg legtöbb információt biztosító teszt, amely megkönnyíti a különböző elválasztási módszerek ellenőrzését. Az áramlási citometria egyes lépéseinek vizsgálatával kideríthető lenne, hogy a metodika mely részei károsak a sejtekre.
3. A leírt FISH módszer lehetőséget teremt az ivari kromoszóma aneuploidiák háziállatokban történő előfordulásának vizsgálatára, amelyről a tudományos irodalomban a megfelelő vizsgáló eljárás hiányában kevés adat áll rendelkezésre.
4. A különböző ivari kromoszómát tartalmazó spermiumok fejméretére kapott adatok ismeretében a korábban leírt alternatív elválasztási eljárások tudományos alapját képező tulajdonság-különbségek újra számíthatóak.

Az értekezés témaköréből megjelent közlemények

Folyóiratcikk külföldi, idegen nyelvű folyóiratban:

1. Révay T, Kovács A, Rens W, Gustavsson I
Simultaneous Detection of Viability and Sex of Bovine Spermatozoa
Reproduction Fertility and Development 2002; 14:373-376.
2. Révay T, Kovács A, Presicce GA, Rens W, Gustavsson I
Detection of water buffalo sex chromosomes in spermatozoa by fluorescence in situ hybridization
Reproduction in Domestic Animals 2003; 38:1-3.
3. Presicce GA, Révay T, Nagy Sz, Dinnyés A, Kovács A
Complex staining of water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa
Bubalus Bubalis 2003; 2
4. Révay T, Nagy Sz, Kovács A, M Edvi E, Hidas A, Rens W, Gustavsson I
Head area measurements of dead, live, X- and Y-bearing bovine spermatozoa submitted to *Biology of Reproduction*

Folyóiratcikk Magyar nyelvű folyóiratban:

5. Kovács A, Nagy Sz, Dohy J, Iváncsics J, Gergácz E, Szász F, Merész L, Szalai G, Révay T, P Tardy E, Tóth A, Gustavsson I, Lindblad K
Kísérletek garantáltan ivarorientált sperma előállítására
Állattenyésztés és Takarmányozás 1999; 6:654-655.
6. Révay T, P Tardy E, Hassanane M, Nagy Sz, Edvi M E, Hidas A, Rens W, Gustavsson I, Kovács A
Az X- és Y-kromoszóma mikroszkópos felismerése bikaondósejtekben (Irodalmi áttekintés)
Állattenyésztés és Takarmányozás 2003; 2: 98-102.

Nemzetközi konferencia kiadványában idegen nyelvű előadás:

7. Révay T, Xuebin Q, P Tardy E, Nagy Sz, Jinalin H, Kovács A, Tóth A, Salgó A
Experiments on sexing yak spermatozoa by fluorescence in situ hybridization using bovine Y-chromosome specific DNA probe
In. Jianlin H, Richard C, Hanotte O, McVeigh C, Rege JEO (eds) 2002 Yak production in central Asian highlands. Proceeding of the third international congress on yak held in Lhasa, PR China, 4-9. September 2000. ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Kenya. pp 359-362. ISBN 92-9146-102-0; az összefoglaló in: *Int.Yak Newsletter 2000*, és <http://www.ivis.org/proceedings/Yaks/Session4/chapter.asp#17> címen.

Magyar nyelvű konferencia kiadványban megjelent előadás:

8. Kovács A, Révay T, P Tardy E
Az ivarorientált kossperma előállításának és hasznosításának lehetősége
„Az alapanyag és a termék minőségének hatása a juhágazat gazdaságosságára” - Juhtenyésztési tanácskozás és továbbképzés Dr. Mihálka Tibor születésének 80. évfordulója alkalmából. ÁTK Herceghalom, 1999.

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent előadás összefoglaló:

9. Révay T, Nagy Sz, M Edvi E, Hidas A, Rens W, Gustavsson I, Kovács A
X- and Y-chromosome bearing bovine spermatozoa do not differ in head area: a parallel image analysis/Fluorescence In Situ Hybridization study
3rd Biannual Meeting of the Association for Applied Animal Andrology, Hungary, August, 26-28. 2002.

Magyar nyelvű konferencia kiadványban megjelent előadás összefoglaló:

10. Révay T, Nagy Sz, M Edvi E, Hidas A, Rens W, Gustavsson I, Kovács A
Az X- és Y-kromoszómát hordozó bikaondósejtek fejfelülete azonos méretű!
9. Szaporodásbiológiai Találkozó, Balatonfüred, 2002. 11. 8-9.

Magyar nyelvű előadás:

11. Révay T, P Tardy E, Kovács A, Szalai G, Tóth A, Salgó A
Szarvasmarha ondósejtek szexálása fluoreszcens *in situ* hibridizációval.
MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai Beszámoló, Bp. AOTE, 2000. 01. 24.

Nemzetközi folyóiratban megjelent poszter összefoglaló:

12. Révay T, Kovács A, Rens W, Gustavsson I
Simultaneous Detection of Viability and Sex of Bovine Spermatozoa
15th European Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Sorrento, Italy, June, 02-04. 2002.
Chromosome Research, 2002. 09. Suppl. 1. P32
13. Révay T, Kovács A, Presicce GA, Senatore EM, Neglia G, Rens W, Gustavsson I
Sexing Water Buffalo Spermatozoa by FISH
15th European Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Sorrento, Italy, June, 02-04. 2002.
Chromosome Research, 2002. 09. Suppl. 1. P33
14. Révay T, Kovács A, Rens W, Gustavsson I
Simultaneous Detection of Viability and Sex of Bovine Spermatozoa
III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2002. 05. 16-18.
Cytometry (nyomdában)

Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent poszter összefoglaló:

15. Presicce GA, Révay T, Nagy Sz, Kovács A
Viability and acrosome staining of frozen/thawed water buffalo (*Bubalus bubalis*, L.) spermatozoa
3rd Biannual Meeting of the Association for Applied Animal Andrology, Hungary, August, 26-28. 2002.

Nemzetközi konferencián poszter:

16. Révay T, Tardy EP, Tóth A, Kovács A, Salgó A
Sexing bovine cells by FISH with a synthetic Y-probe.
14th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, Brno, June 27-30, 2000.

Magyar nyelvű konferencián poszter:

17. Révay T, P Tardy E, Kovács A, Szalai G, Tóth A, Salgó A
Szarvasmarha ondósejtek szexálása fluoreszcens *in situ* hibridizációval.
6. Szaporodásbiológiai Találkozó, Balatonfüred, 1999. 10. 25-26.