

dc_273_11

MTA Doktori értekezés

Összefoglaló-Tézis füzet

**Egyes gazdasági haszonhalaink hímivartermékeinek
mélyhűtése, a technológia standardizálásának
kidolgozása és gyakorlati alkalmazása**

Dr. Urbányi Béla

Gödöllő

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés.....	3
2. Anyag és módszer.....	4
3. Eredmények bemutatása és értékelése.....	7
3.1. Ponty eredmények	7
3.2. Pontyfélék eredményei.....	8
3.3. Harcsa eredmények.....	11
3.4. Süllő eredmények	17
3.5. Kecsege eredmények	20
3.6. A standardizálás eredményei.....	22
4. Új tudományos eredmények	26
5. Összefoglalás	27
6. Az értekezés témakörében megjelent 10 jelentősebb közlemény	29
7. Publikációs adatok.....	30
8. Szakmai-tudományos önéletrajz.....	31

1. Bevezetés

Az Európai Unió halászati termékekből nettó importőr, vagyis nem tudja megtermelni a piaci keresletnek elegendő produktum több, mint 50%-át. Az élő környezetünk minőségének romlása következtében a halak 34%-a került az elmúlt időszakban veszélyeztetett státuszba.

A két megállapítás alapvetően eltérő reakciókat vált ki az olvasókból: az egyik egy gazdaságorientált problémára hívja fel a figyelmet, míg a másik tény a természet- és környezetvédelem hiányosságaira utal. A közös rendező elv azonban viszonylag könnyen megtalálható. A modern tenyésztési, biotechnikai-biológiai-genetikai eljárásokkal és technológiákkal lehetőség van a problémák súlyosságának enyhítésére és részbeni megoldására.

Ilyen jellegű megoldást jelenthet a halak hímvarsejtjeinek (spermájának, vagy tejének) a mélyhűtése:

- ⇒ A haltermelés növelése érdekében a sperma mélyhűtés alkalmazásával a hímváru genetikai információt tárolhatjuk, és a szaporítási időszakban felhasználjuk a piaci termelés intenzitásának fokozására. A mélyhűtés szinte minden halfaj esetében kidolgozható, így a tenyésztési programok szerves és hasznos része lehet, illetve részévé válhat.
- ⇒ A sperma mélyhűtés alkalmas arra is, hogy a védett és veszélyeztetett pozícióban lévő halfajok, halpopulációk megmentésére alkalmazzuk, a mélyhűtött ivarsejt szinte korlátlan ideig (emberi léptékkal mérve) tárolható, és igény szerint felhasználható egyes halfajok megmentését célzó tevékenységek, programok során.

Az ivarsejt mélyhűtés története az első sikeres fejlesztésre vezethető vissza, melyet Polge 1949-ben hajtott végre. A több, mint félévszázados időszak alatt ezen technika széleskörben, iparszerű méretekben elterjedt néhány haszonállat, pl. a szarvasmarha tenyésztés technológiájában.

Viszont ez a módszertan napjainkig csak laboratóriumi szinten került bevezetésre a halászatban, a hal szaporodásbiológiai és halszaporítási területen. Ennek okai több tényezőre vezethetők vissza, de alap rendezőelv és jogos kifogás, hogy a metodika túlságosan bonyolult ahhoz, hogy a gyakorlatba gond nélkül bevezethetővé váljon. Ezek érvek részben visszavezethetők a bonyolult mélyhűtési programra, a jelentős berendezés/műszer háttér igényre és az igényelt szakember tudásra.

A fentiek alapján MTA Doktori értekezésem céljából tűztem ki, hogy az elmúlt egy évtized alatt elvégzett sperma mélyhűtési kutatómunkám során tapasztalt, analizált eredményeket összegezzem, és gyakorlati szempontokat előtérbe helyezve értékeljem a módszer praktikumba történő felhasználásának esélyeit.

Nem titkolt szándékom volt, hogy bizonyos mértékű standardizálás irányába elmozdítsam ezt a technológiát, egyes paraméterek rögzítésével a gyakorlati igényeket beépítve felhasználóbaráttá alakítsam át a módszertant.

Célkitűzéseim, terveim részben sikerültek, de úgy érzem, hogy idővel, a kapott eredményekre támaszkodva a célok megvalósíthatóvá válnak-válhatnak.

2. Anyag és módszer

A disszertációmban bemutatott eredményeket 10 év alatt elvégzett kutatás-fejlesztési munkám során gyűjtöttem és publikáltam. Ezalatt az időszak alatt nagyon nagy egyedszámmal dolgoztam (1. sz. táblázat), ami a kapott eredmények megbízhatóságát és értékességét növeli.

1. sz. táblázat: A SzIE, MKK-KTI Halgazdálkodási tanszék által a hal himivarsejt mélyhűtési vizsgálatokba bevont egyedek száma halfajonként (db)

	Ikrás	Tejes	Összesen
Ponty	178	980	1158
Bodorka	29	62	91
Karikakeszeg	17	29	46
Dévékeszeg	37	61	98
Márna	22	35	57
Harcsa	40	69	109
Süllő	21	35	56
Kecsege	44	65	109
Összesen	388	1336	1724

Az alkalmazott anyag és módszert a vizsgált halfajok száma, és a vizsgált paraméterek nagysága következtében, a terjedelmi korlátok figyelembevételével táblázatos formában tárgyalom.

2. sz. táblázat: Ponty vizsgálatok anyag és módszere

Kísérletek helyszíne	Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdaság
Oltás módszertana	Tejesek: Ovopel, 1 adag/ttm kg, 1x-i, ikrások 2x-i adagban
Sperma elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Termékenyítés	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra inkubáció	Keltetőházi technológia alkalmazása
Hígító	Hígító 1: 350 mM glükóz, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 2: 350 mM fruktóz, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 3: 300 mM szaharóz, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 4: 200 mM KCl, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 5: Ponty hígító 1000 ml-re tartalmaz 350mg NaCl, 1000mg KCl, 22mg MgCl ₂ , 20mg NaHCO ₃
Védőanyag	10% DMSO és 10% metanol
Hígítási arány	1:9
Műszalma méret	0,5 ml
Equilibráció	10 perc (DMSO)
Hűtés módja	3 cm magas polisztirol keret, 3 perc, folyékony nitrogénben
Felolvasztás	40 °C-os vízben 13 másodperc
Mutatószámok	Felolvasztás utáni motilitás, termékenyülési %, kelési %
Értékelés	Statisztikai feldolgozást követően

3. sz. táblázat: Pontyféléken végzett vizsgálatok anyag és módszere

Kísérletek helyszíne	Temperáltvízü Halszaporító és Kereskedelmi Kft.
Oltás módszertana	Tejesek pontyhipofízis, 1x-i adagban 2mg/ttm kg (bodorka és karikakeszeg) 3mg/ttm kg (dévérkeszeg és márna); ikrások 4mg/ttm kg (bodorka, karikakeszeg, dévérkeszeg), 5mg/ttm kg (márna) 1x-i adagban
Sperma elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Termékenyítés	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra inkubáció	Keltetőházi technológia alkalmazása
Hígító	Hígító 1: 350 mM glükóz, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 2: 350 mM fruktóz, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 3: 300 mM szaharóz, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 4: 200 mM KCl, 30mM TRIS (pH 8.0); Hígító 5: Ponty hígító 1000 ml-ben 350mg NaCl, 1000mg KCl, 22mg MgCl ₂ , 20mg NaHCO ₃
Védőanyag	10% DMSO és 10% metanol
Hígítási arány	1:9
Műszalma méret	0,25 ml
Equilibráció	10 perc (DMSO)
Hűtés módja	3 cm magas polisztirol keret, 3 perc, folyékony nitrogénben
Felolvasztás	40 °C-os vízben 5 másodperc
Mutatószámok	Felolvasztás utáni motilitás, termékenyülési %, kelési %
Értékelés	Statisztikai feldolgozást követően

4. sz. táblázat: Harcsa vizsgálatok anyag és módszere

Kísérletek helyszíne	Spermányérés: SZIE Halgazdálkodási Tanszék, Szarvas-Fish Kft., Szegedfish Kft., Aquakultúra Kft., Fish-Coop Kft.; Ikrányérés: Aranykárász Bt., Attalai Hal Kft., TEHAG Kft., Szegedfish Kft., Aquakultúra Kft.
Oltás módszertana	Tejesek: Ovopel 1 adag/ttm kg, 1x-i (SZIE Halgazdálkodási Tanszék), 4mg/ttm kg hipofízis, 1x-i (vállalkozások); ikrások: 6mg/ttm kg hipofízis, 2x-i adagban
Sperma elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Termékenyítés	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra inkubáció	Keltetőházi technológia alkalmazása
Eltarthatósági vizsgálatnál tesztelt hígító	Hígító 1: 6%-os fruktóz (pH 7,73); Hígító 2: 6%-os glükóz (pH 7,73); Hígító 3: Ponty hígító 1000 ml-ben 350 mg NaCl, 1000 mg KCl, 22 mg CaCl ₂ , 8 mg MgCl ₂ , 20 mg NaHCO ₃ .
Hígító	6%-os glükóz (pH 7,73)
Védőanyag	10% metanol
Hígítási arány	1:1
Műszalma méret	5 ml
Equilibráció	nincs
Hűtés módja	3 cm magas polisztirol keret, 3-5-7 perc, folyékony nitrogénben
Felolvasztás	40 °C-os vízben 30 másodperc
Mutatószámok	Felolvasztás utáni motilitás, termékenyülési %, kelési %
Értékelés	Statisztikai feldolgozást követően

5. sz. táblázat: Süllő vizsgálatok anyag és módszere

Kísérletek helyszíne	Attalai Hal Kft.
Oltás módszertana	4mg/ttm kg hipofízis, 72 órával a fejést megelőzően (tejesek és ikrások egyaránt)
Sperma elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Termékenyítés	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra inkubáció	Keltetőházi technológia alkalmazása
Hígító	Hígító 1: 350 mMol Glükóz, 30mMol Tris; Hígító 2: 200 mMol KCl, 30 mMol Tris; Hígító 3: 300 mMol Szacharóz, 30mMol Tris; Hígító 4: Pontyhígító; 1,75g NaCl; 5g KCl; 0,1456g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,0853g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1g NaHCO_3
Védőanyag	10% DMSO és 10% metanol
Hígítási arány	1:9-1:1
Műszalma méret	0,5 ml
Equilibráció	3 perc (DMSO)
Hűtés módja	3 cm magas polisztirol keret, 3 perc, folyékony nitrogénben
Felolvasztás	40 °C-os vízben 13 másodperc
Mutatószámok	Felolvasztás utáni motilitás, termékenyülési %, kelési %
Értékelés	Statisztikai feldolgozást követően

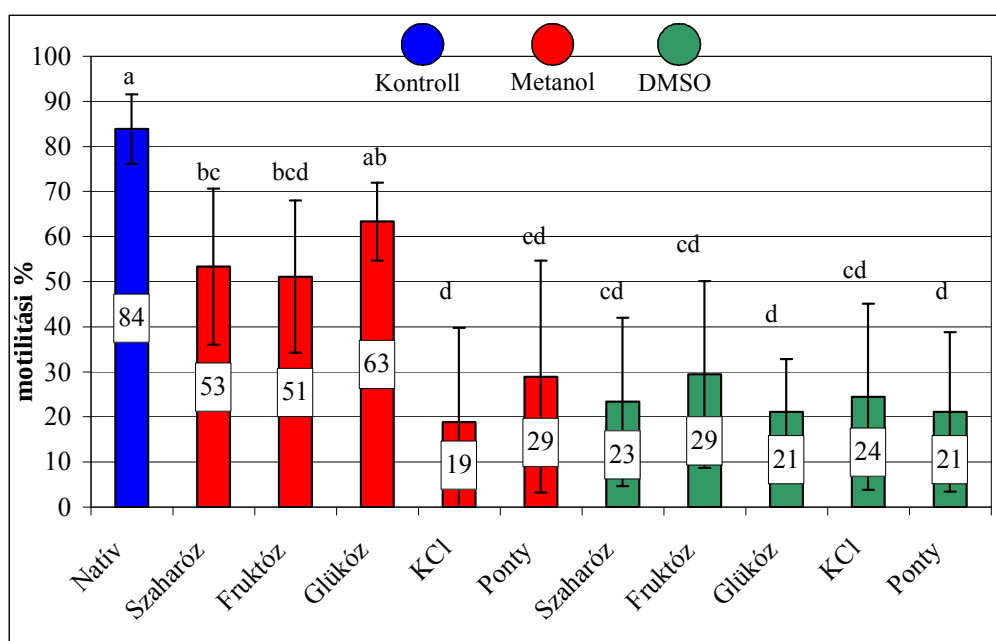
6. sz. táblázat: Kecsege vizsgálatok anyag és módszere

Kísérletek helyszíne	SZIE Halgazdálkodási Tanszék, Halászati és Öntözési Kutató Intézet
Oltás módszertana	Ovopel 1 adag/ttm kg, tejesek 1x-i (SZIE Halgazdálkodási Tanszék), tokhipofízis 4,5mg/ttm kg, tejesek 1x-i (HAKI), tokhipofízis 3mg/ttm kg, ikrások 1x-i (HAKI),
Sperma elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra elvétel	Keltetőházi technológia alkalmazása
Termékenyítés	Keltetőházi technológia alkalmazása
Ikra inkubáció	Keltetőházi technológia alkalmazása
Hígító	Hígító 1: Jähnichen-féle hígító: 25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH=8,5, Hígító 2: Tsvetkova-féle hígító: 23,4 mM szacharóz, 118 mM Tris-HCl, pH=8,0; Hígító 3: Módosított Tsvetkova-féle hígító: 23,4 mM szacharóz, 30 mM Tris-HCl, 0,25 mM KCl, pH=8,0.
Védőanyag	10% DMSO, 10% DMA, 10% és 17,5% EG, 5%, 7,5%, 10% metanol
Hígítási arány	1:1
Műszalma méret	0,5 ml
Equilibráció	nincs
Hűtés módja	3 cm magas polisztirol keret, 3 perc, folyékony nitrogénben
Felolvasztás	40 °C-os vízben 13 másodperc
Mutatószámok	Felolvasztás utáni motilitás, termékenyülési %
Értékelés	Statisztikai feldolgozást követően

3. Eredmények bemutatása és értékelése

3.1. Ponty eredmények

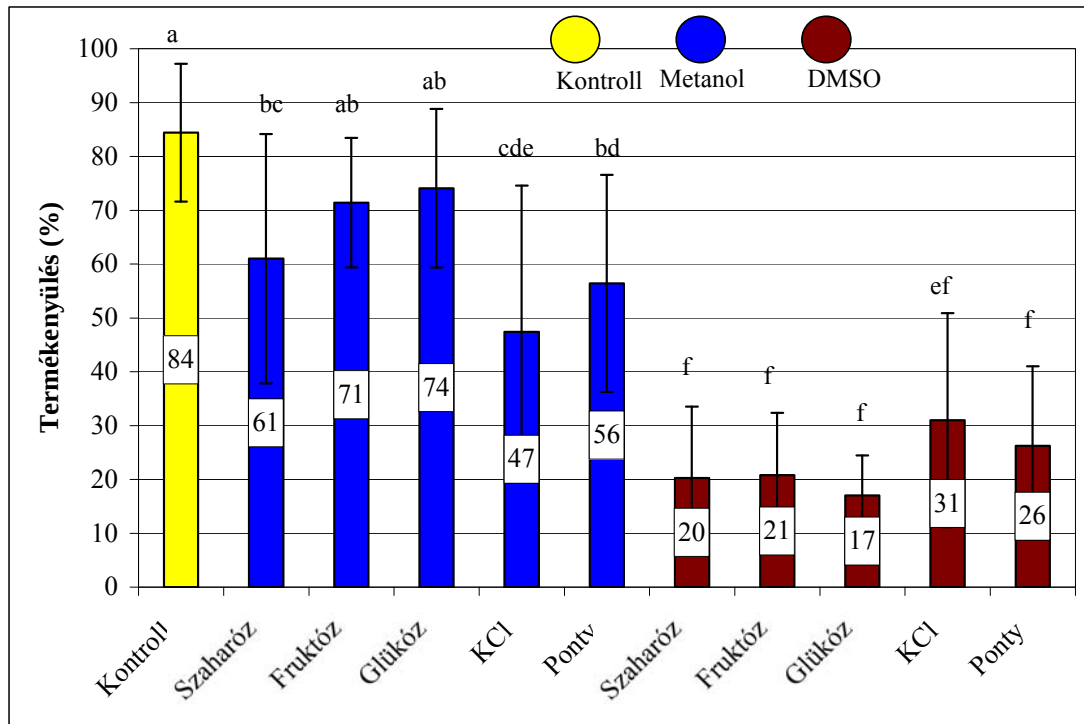
A friss sperma motilitása a kontrollnál $84 \pm 7\%$ volt $n=45$ ismétlésszámnál. A legmagasabb felolvasztás utáni motilitást ($63 \pm 9\%$ $n=29$) a glükóz hígító és a metanol mint védőanyag adta (1. sz. ábra). Statisztikailag nem volt kimutatható különbség a kontroll és a metanol-glükóz kombinációja között. A többi hígító alkalmazása metanollal nem adott ilyen magas motilitási értéket. Azonban elmondható, hogy a metanos minták általában jobbnak bizonyultak, mint amikor DMSO-t használtam védőanyagként.



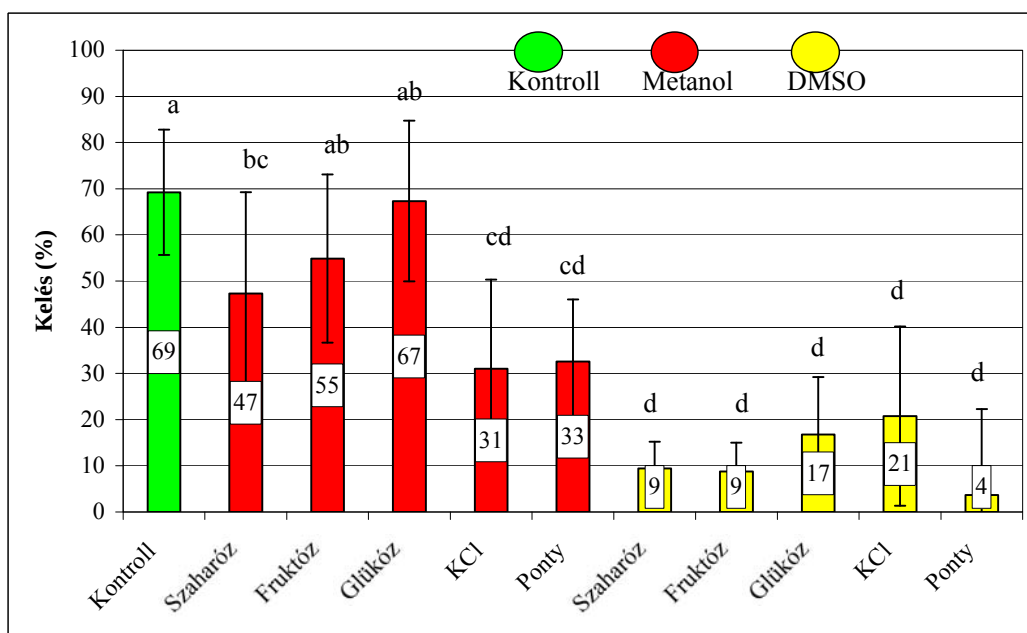
1. sz. ábra: A mélyhűtött pontysperma felolvasztás utáni motilitás eredményei. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek ($n=29$, kontroll: $n=45$).

A legjobb termékenyülést 4-8 sejtes állapotban, $74 \pm 15\%$ -ot (kontroll értéke $84 \pm 13\%$) $n=22$ ismétlés számnál a metanol védőanyag és glükóz hígító adta (2. sz. ábra). Statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam a kontroll és a fruktózos, illetve glükózos minták között metanol védőanyag használata mellett. Azonban az kijelenthető, hogy amikor metanolt használtam védőanyagként mindig jobb eredményeket kaptam, mint a DMSO védőanyaggal hűtött minták esetében.

A legjobb kelési eredményt ($67 \pm 17\%$, $n=22$) megint csak a glükóz, mint hígító és metanol mint védőanyag kombinációjánál kaptuk (3. sz. ábra). Itt a kontroll eredménye $69 \pm 14\%$ volt. Az eredmények statisztikai feldolgozását követően hasonló megállapítást tehettem, mint a termékenyítési eredmények esetében, ugyanis itt sem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll, és a fruktóz-metanol, glükóz-metanol kombinációk között. A metanos mintákkal kapott eredmények ebben az esetben is felülmúlják DMSO használata során kapottakat.



2. sz. ábra. Mélyhűtött pontyspermával kapott termékenyülési eredmények. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek (n=22).



3. sz. ábra. Mélyhűtött pontyspermával kapott kelési eredmények. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek (n=22).

3.2. Pontyfélék eredményei

A friss spermára vonatkozó motilitási eredmények vizsgálatánál az alábbi értékeket kaptam: bodorka: $95 \pm 0\%$ (n=26), dévérkeszeg: $79 \pm 9\%$ (n=24), karikakeszeg: $87 \pm 15\%$ (n=15), márna: $69 \pm 27\%$ (n=16).

Mindegyik faj esetében kiválogattam a legjobb 10 mintát, és azzal dolgoztam tovább, melynek eredményeképpen: bodorkánál $95\pm 0\%$, dévérkeszegnél $82\pm 8\%$, karikakeszegnél $94\pm 3\%$, míg márnánál a motilitás: $86\pm 8\%$ értéket adott.

A felolvasztott sperma motilitás értékei a különböző krioprotektánsok függvényében: 7. sz. táblázat mutatja be.

7. sz. táblázat: A bodorka (a. n=10), a dévérkeszeg (b. n=10), a karikakeszeg (c. n=10) és a márna (d. n=10) felolvasztás utáni spermamotilitása 5 hígító (fruktóz, glükóz, szacharóz, KCl és módosított Kurokura) és 2 védőanyag (metanol és DMSO) használatát követően. A sorokon belül azonos betűvel jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$). Az oszlopokon belül azonos számmal jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$).

a. Bodorka

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	70 ± 10^{a1}	77 ± 6^{a1}	67 ± 6^{a1}	47 ± 6^{a2}	53 ± 6^{a2}
DMSO	53 ± 6^{b1}	57 ± 6^{b1}	53 ± 6^{a1}	23 ± 6^{b3}	37 ± 6^{b2}

b. Dévérkeszeg

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	77 ± 6^{a1}	77 ± 6^{a1}	70 ± 0^{a2}	57 ± 6^{a2}	67 ± 6^{a2}
DMSO	72 ± 3^{a1}	72 ± 3^{a1}	60 ± 0^{a1}	50 ± 10^{a2}	57 ± 6^{a12}

c. Karikakeszeg

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	55 ± 6^{a2}	67 ± 5^{a1}	60 ± 0^{a12}	40 ± 0^{a3}	53 ± 5^{a2}
DMSO	40 ± 8^{b12}	50 ± 11^{b1}	45 ± 6^{b1}	20 ± 8^{b3}	30 ± 8^{b23}

d. Márna

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	50 ± 8^{a2}	75 ± 6^{a1}	55 ± 6^{a2}	40 ± 8^{a2}	50 ± 8^{a2}
DMSO	43 ± 5^{a2}	60 ± 11^{a1}	43 ± 10^{a2}	25 ± 13^{a3}	40 ± 11^{a2}

A legmagasabb felolvasztás utáni motilitás a bodorkánál volt megfigyelhető, metanol védőanyag és glükóz hígító kombinációnál ($77\pm 6\%$) (7.a. táblázat). A motilitás szempontjából a két védőanyag között minden hígító esetében statisztikailag szignifikáns különbséget állapítottunk meg ($P < 0.0001$). A metanollal kezelt minták jobbnak bizonyultak, mint amikor DMSO-t használtunk védőanyagként.

Dévrkeszeg esetében (7.b. táblázat) a glükóz ($77\pm 6\%$) és a fruktóz ($77\pm 6\%$) hígító metanol védőanyaggal való kombinációja adta a legjobb eredményt.

Fagyásvédők ($P = 0.0014$) és hígítók ($P < 0.0001$) között statisztikailag szignifikáns különbséget találtam felolvasztás után a sperma motilitásában.

Glükóz és metanol kombinációja eredményezte a felolvasztás utáni legnagyobb motilitási értéket karikakeszegnél ($67\pm 5\%$) és a márnánál ($75\pm 6\%$) (7.c. és 7.d. táblázat).

A termékenyítési eredményeket mutatja be a 8. sz. táblázat. A kontroll csoport termékenyülési eredményei, amelynél friss spermát alkalmaztunk, a következők voltak: bodorka: $90\pm 5\%$, dévrkeszeg: $87\pm 8\%$, karikakeszeg: $63\pm 3\%$, márna: $84\pm 4\%$.

Két fajnál szignifikáns különbséget találtam a hígítók (karikakeszeg és márna: $P < 0.0001$) és a védőanyagok között (karikakeszeg: $P < 0.0001$, márna: $P = 0.0005$).

Három fajnál a legnagyobb termékenyülési eredményt a glükóz hígító és metanol védőanyag alkalmazásával értem el (bodorka: $84 \pm 4\%$, karikakeszeg: $63 \pm 2\%$ és márna: $70 \pm 4\%$), kivétel volt a dévérkeszeg, ahol a metanollal a fruktóz hígító alkalmazása mutatta a legmagasabb értéket ($83 \pm 2\%$).

Megállapítottam, hogy a hígítók ($P < 0.0001$ minden fajnál) és a fagyásvédők között (bodorka és karikakeszeg: $P < 0.0001$, dévérkeszeg és márna: $P = 0.0005$) is szignifikáns különbségek vannak a termékenyülési eredményekre nézve.

Összefoglalva elmondhatom, hogy minden halfaj esetében a motilitásra vonatkozóan a metanol fagyásvédő esetében kaptam magasabb értékeket, illetve a hígítók szempontjából a glükóz, egy esetben pedig a fruktóz mutatott jobb eredményt.

8. sz. táblázat. A bodorka (a. $n=10$), a dévérkeszeg (b. $n=10$), a karikakeszeg (c. $n=10$) és a márna (d. $n=10$) mélyhűtött spermájával kapott termékenyülési eredmények 5 hígító (fruktóz, glükóz, szacharóz, KCl és módosított Kurokura) és 2 védőanyag (metanol és DMSO) használatát követően. A sorokon belül azonos betűvel jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$). Az oszlopokon belül azonos számmal jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$).

a. Bodorka

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	78 ± 6^{a1}	84 ± 4^{a1}	76 ± 6^{a1}	53 ± 4^{a2}	61 ± 5^{a2}
DMSO	67 ± 3^{a1}	71 ± 4^{b1}	66 ± 5^{a1}	35 ± 5^{b3}	44 ± 6^{b2}

b. Dévérkeszeg

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	83 ± 2^{a1}	79 ± 2^{a12}	61 ± 8^{a34}	52 ± 6^{a4}	70 ± 1^{a23}
DMSO	75 ± 5^{a1}	72 ± 6^{a12}	58 ± 8^{a3}	46 ± 4^{a4}	64 ± 5^{a23}

c. Karikakeszeg

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	56 ± 4^{a2}	63 ± 2^{a1}	57 ± 2^{a12}	44 ± 3^{a3}	51 ± 2^{a23}
DMSO	46 ± 7^{b1}	52 ± 6^{b1}	48 ± 2^{b1}	27 ± 4^{b2}	33 ± 2^{b2}

d. Márna

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	57 ± 6^{a123}	70 ± 4^{a1}	61 ± 4^{a12}	46 ± 11^{a3}	51 ± 8^{a23}
DMSO	51 ± 6^{a12}	63 ± 5^{a1}	52 ± 9^{a12}	32 ± 11^{a3}	40 ± 8^{a23}

A kelési eredményeket mutatja be a 9. sz. táblázat. Kontroll csoport kelési eredményei: bodorka: $79 \pm 2\%$, dévérkeszeg: $68 \pm 7\%$, karikakeszeg: $60 \pm 2\%$, márna: $75 \pm 3\%$.

Mélyhűtött sperma alkalmazását követően, hasonlóan a termékenyülési eredményekhez, a kelési eredményeknél is a metanol védőanyag és a glükóz hígító kombináció adta a legnagyobb értéket 3 halfaj esetében: bodorka $74 \pm 2\%$,

karikakeszeg $54\pm 2\%$, márna $61\pm 4\%$. Kivétel itt is a dévérkeszeg volt, ahol a fruktóz és metanol párosítás eredményezte a legmagasabb kelési százalékokat: $67\pm 6\%$.

A kelés szempontjából a hígítók között statisztikailag értékelhető különbséget találtam ($P < 0.0001$). A fagyásvédő anyagokat vizsgálva az eredmények között szignifikáns különbséget a bodorka esetében nem találtam ($P = 0.1388$), viszont a másik három halfajnál igen ($P < 0.0001$ mindhárom fajnál).

Mind a négy halfajnál erős korrelációt találtam a motilitási és a termékenyülési százalék között (bodorka: $r = 0.9661$, $n = 30$, $P < 0.0001$; dévérkeszeg: $r = 0.8199$, $n = 30$, $P < 0.0001$; karikakeszeg: $r = 0.9535$, $n = 40$, $P < 0.0001$; márna: $r = 0.9315$, $n = 40$, $P < 0.0001$).

Hasonlóképpen erős korreláció állapítható meg a felolvasztott sperma motilitása és a kelési eredmények között mind a bodorka ($r = 0.9418$, $n = 30$, $P < 0.0001$), a dévérkeszeg ($r = 0.7703$, $n = 30$, $P < 0.0001$), a karikakeszeg ($r = 0.9366$, $n = 40$, $P < 0.0001$) és a márna ($r = 0.8879$, $n = 40$, $P < 0.0001$) halfajnál egyaránt.

9. sz. táblázat. A bodorka (a. $n = 10$), a dévérkeszeg (b. $n = 10$), a karikakeszeg (c. $n = 10$) és a márna (d. $n = 10$) mélyhűtött spermájával kapott kelési eredmények 5 hígító (fruktóz, glükóz, szacharóz, KCl és módosított Kurokura) és 2 védőanyag (metanol és DMSO) használatát követően. A sorokon belül azonos betűvel jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$). Az oszlopokon belül azonos számmal jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$).

a. Bodorka

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	71 ± 4^{a1}	74 ± 2^{a1}	70 ± 3^{a1}	45 ± 3^{a2}	53 ± 4^{a2}
DMSO	61 ± 2^{b1}	64 ± 5^{b1}	60 ± 6^{a1}	29 ± 4^{b3}	37 ± 6^{b2}

b. Dévérkeszeg

	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	67 ± 6^{a1}	66 ± 5^{a1}	57 ± 10^{a12}	46 ± 7^{a2}	63 ± 3^{a1}
DMSO	65 ± 8^{a1}	63 ± 6^{a1}	54 ± 7^{a1}	42 ± 2^{a2}	58 ± 4^{a1}

c. Karikakeszeg

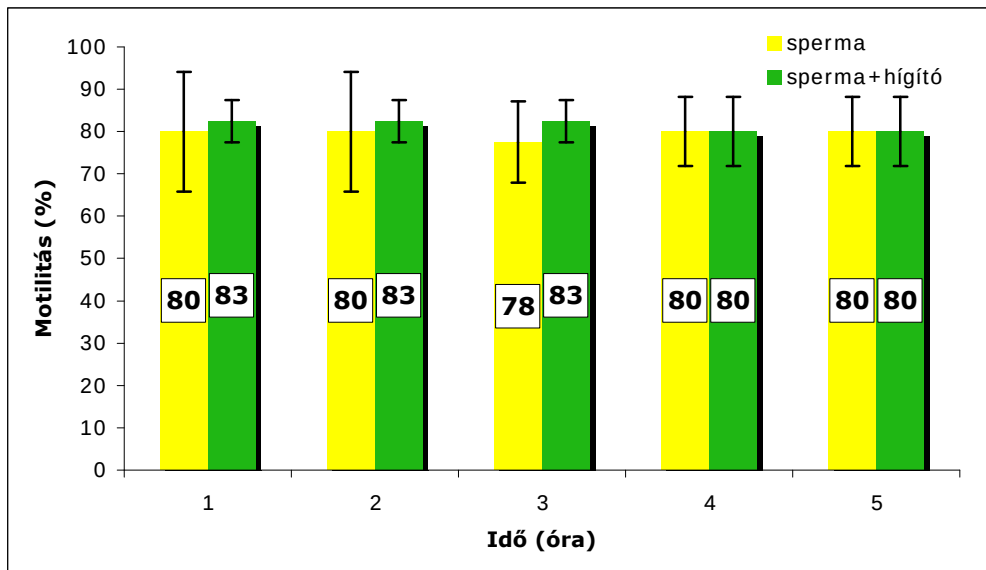
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	47 ± 4^{a23}	54 ± 2^{a1}	48 ± 2^{a12}	37 ± 3^{a4}	43 ± 2^{a3}
DMSO	32 ± 5^{b1}	37 ± 4^{b1}	33 ± 1^{b1}	19 ± 3^{b2}	23 ± 1^{b2}

d. Márna

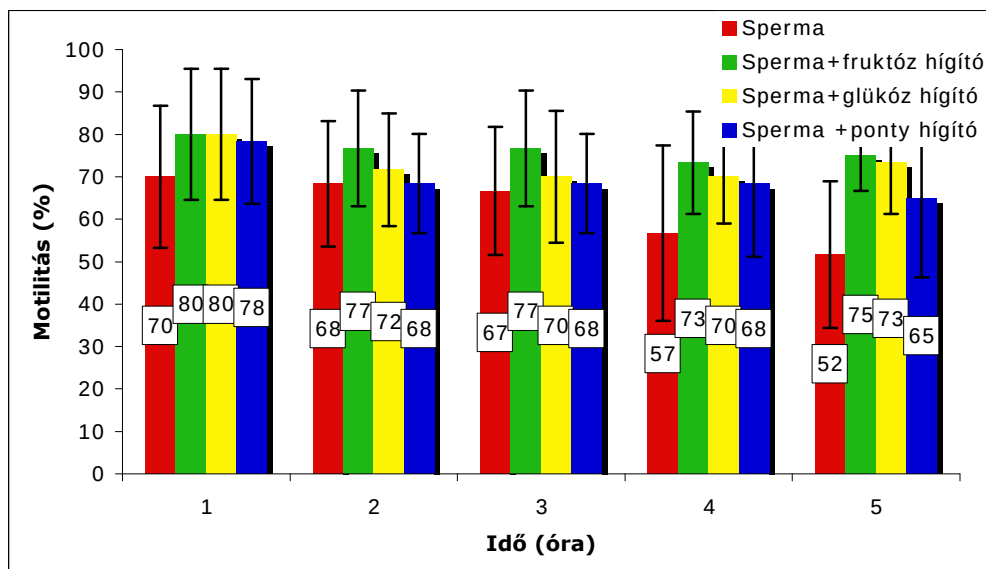
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	50 ± 5^{a23}	61 ± 4^{a1}	54 ± 4^{a12}	41 ± 9^{a3}	45 ± 7^{a23}
DMSO	36 ± 4^{b12}	44 ± 3^{b1}	37 ± 6^{b12}	22 ± 8^{b3}	28 ± 6^{b23}

3.3. Harcsa eredmények

A sperma eltarthatósági vizsgálat során egyik csoport esetében sem volt szignifikáns különbség a hígított és hígítatlan minták motilitása között, amiket a friss sperma kinyerésétől 5 órán keresztül óránként vizsgáltam (4-5. sz. ábra).

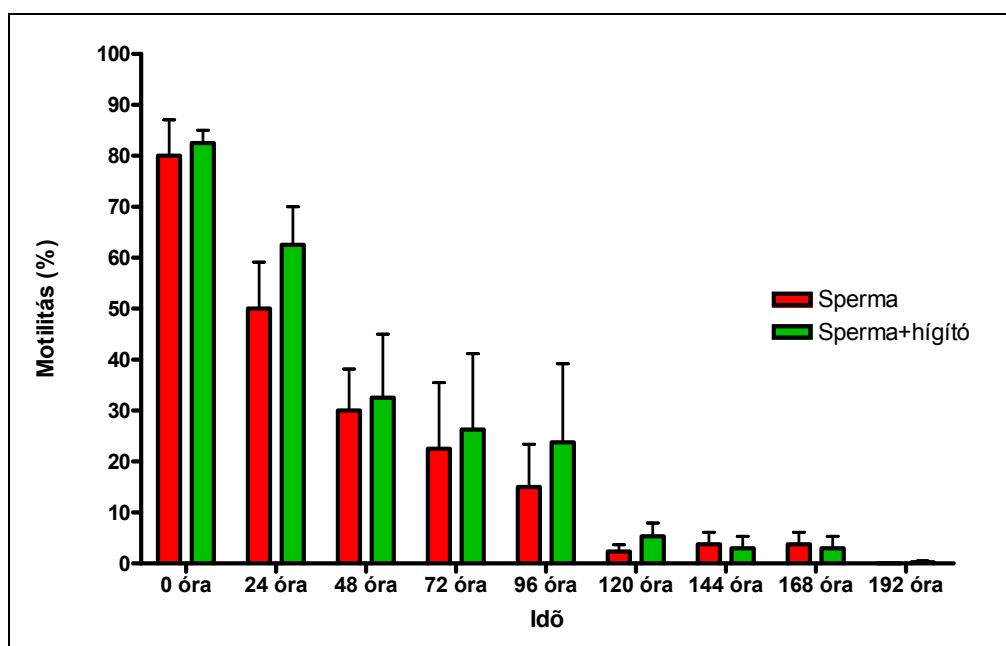


4. sz. ábra: Hígítatlan és fruktóz hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő első 5 órában (n=14)



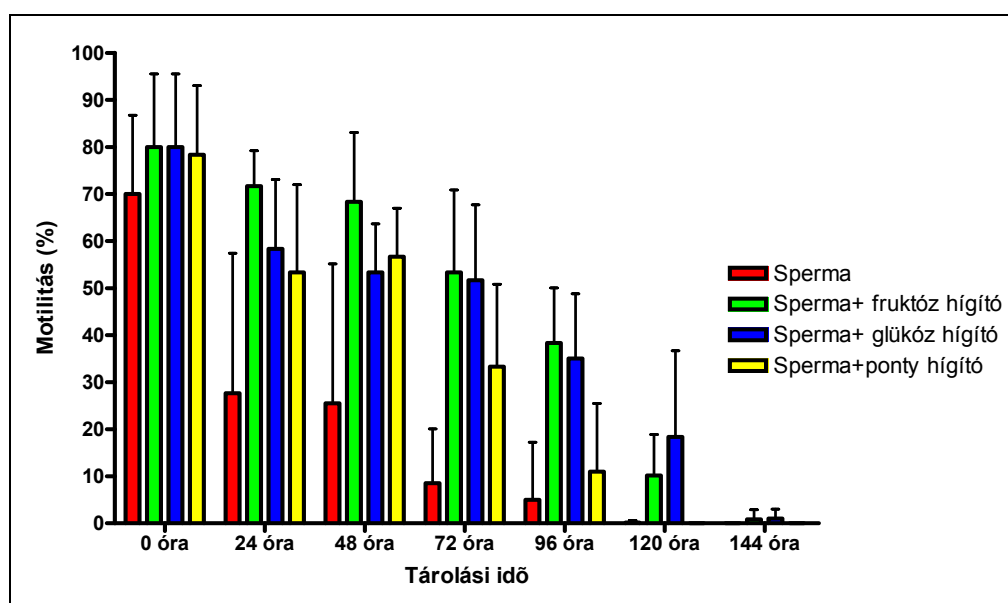
5. sz. ábra: Hígítatlan és különböző hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő első 5 órában (n=16)

A két csoport spermájának motilitását 24 órás periódusonként is megvizsgáltam az idő, illetve a hígító függvényében. Az első kísérlet során (6. sz. ábra) az idő változása befolyásolta a sperma motilitást, ami folyamatosan csökkent, majd megszűnt, míg a hígított és a hígítatlan sperma között nem volt szignifikáns különbség.



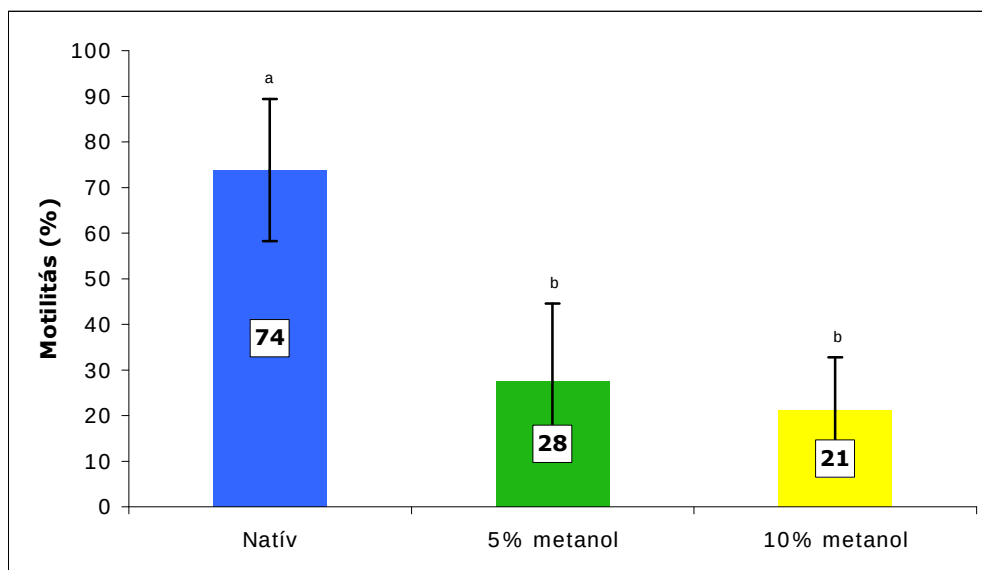
6. sz. ábra Hígítatlan és fruktóz hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő napokban (n=14)

A második kísérlet során (7. sz. ábra) mind az idő, mind a hígító befolyásolta a sperma motilitását. Ebben az esetben is csökkent a motilitás az idő múlásával, míg a hígító tovább és magasabb %-on tartotta a sperma motilitását, szemben a hígítatlan spermával. A hígítatlan sperma és a hígított sperma motilitása között a 24-dik, a 42-dik, a 72-dik és a 96-dik órában szignifikáns különbséget találtam, amennyiben a hígító fruktóz ($P < 0.001$ mindegyik időpontban), illetve glükóz ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.01$) volt. Abban az esetben, ha pontyhígítót használtam, akkor a 24-dik ($P < 0.05$), a 48-dik ($P < 0.01$) és 72-dik ($P < 0.05$) órában találtam szignifikáns különbséget a hígított és hígítatlan sperma motilitása között. A fruktóz és glükóz, illetve a pontyhígító között is találtam szignifikáns különbséget a 96-dik órában ($P < 0.01$, $P < 0.05$).



7. sz. ábra: A hígítatlan és a különböző hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő napokban (n=16)

Statisztikailag szignifikáns különbséget találtam a friss és a mélyhűtött sperma minták között védőanyagtól függetlenül. A felolvasztás után a spermiumok motilitása csökkent, azonban minden esetben maradt életképes spermium (8. sz. ábra). A különböző koncentrációjú védőanyagok között nem találtam szignifikáns különbséget.



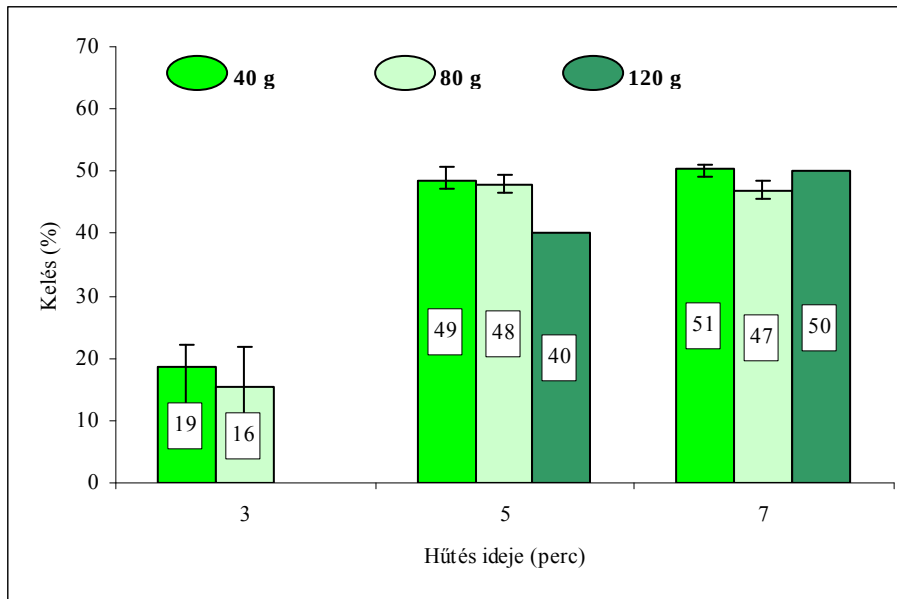
8. sz. ábra: A friss és különböző védőanyaggal kezelt, felolvasztott sperma motilitása (n=13)

A hűtési időre és az ikra-sperma arányra vonatkozó kísérletek eredményeinél a mélyhűtött sperma kiindulási motilitása 90% volt, míg a felolvasztás utáni motilitás értéke egyöntetűen 80% volt.

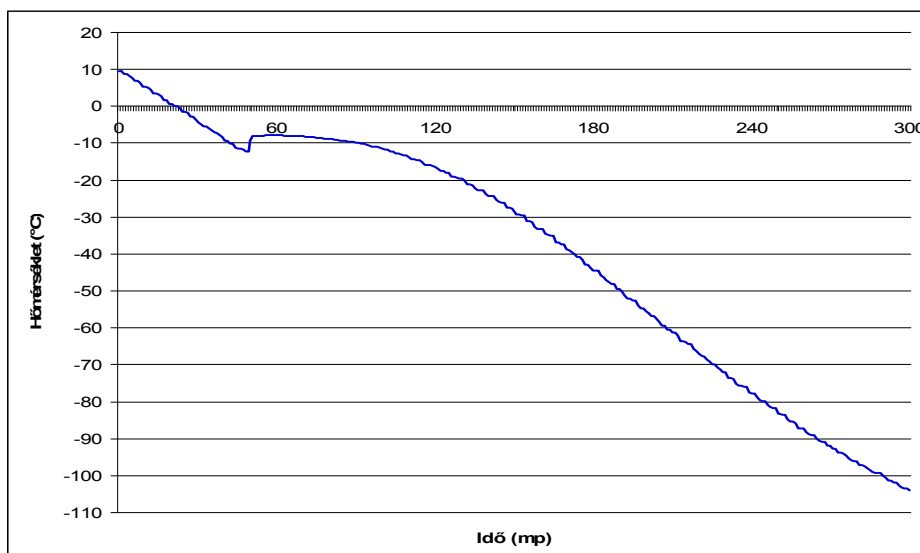
A termékenyítési kísérletek során a legmagasabb kelési arányt ($51 \pm 1\%$) 7 perces hűtési időnél és 40 g ikra termékenyítésekor kaptam, azonban meg kell jegyezni, hogy az 5 perces és 7 perces hűtési idő esetében mindhárom termékenyített ikratétel esetében igen kiegyenlített kelési eredményeket kaptam ($40 \pm 0\%$ és $51 \pm 1\%$ között). A statisztikai értékelést követően megállapítottam, hogy a termékenyített ikra mennyiségének nem, de a hűtési időnek volt szignifikáns hatása ($P < 0.0001$) a kapott eredményekre, tekintettel arra, hogy a 3 perces hűtési idő mellett gyengébb kelési százalékot kaptam (9. sz. ábra).

A további vizsgálataim során az egy műszalma mélyhűtött spermával termékenyített ikratétel kelési eredménye 94%, a két műszalmával termékenyítetté 77% lett, míg a két kezelés kontroll csoportjában 89%, illetve 81% kelést regisztráltam. Érdeemes megjegyezni, hogy az egy műszalmányi felolvasztott spermával termékenyített csoportban a torz fejlődésű lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest mindössze 2,4% volt (1,8% a kontrollban), míg a két műszalmányi spermával termékenyített csoportban 11,2% (kontroll: 7,3%).

Az 5 ml-es műszalmákkal kapott hűtési sebesség $-23\text{ }^{\circ}\text{C/perc}$ körül alakult (10. sz. ábra). Megfigyeltem, hogy a műszalma hőmérséklete 3 perces hűtés után még csak $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ volt.

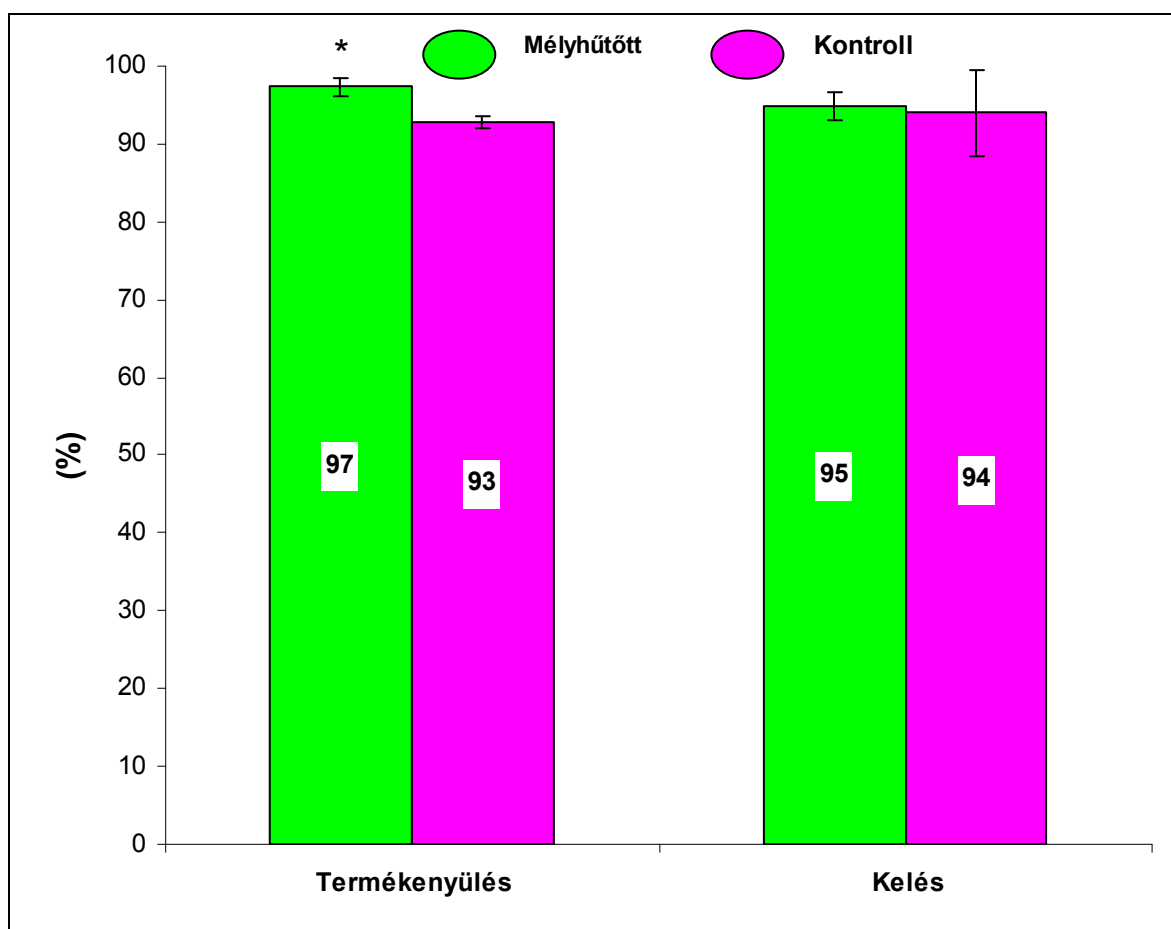


9. sz. ábra: A hűtési időnek és az ikra mennyiségének hatása a kelési eredményekre (n=12, kontroll: 57 ± 2)



10. sz. ábra: A hőmérséklet változása az 5 ml-es műszalma hűtése során

A keltetőházi/üzemi körülmények közötti vizsgálatsorozatban megfigyeltem, hogy a különböző keltetési kísérletek eredményei elsősorban a különböző gazdaságoktól függtek, pontosabban az alkalmazott szaporítási eljárástól és az ikra minőségétől, sőt nagyon erősen függött a realizált eredmény az egyes egyedek felkészültségétől is. Az attalai kísérletben a mélyhűtött spermával végzett termékenyítés során a termékenyülés 97 ± 1 % volt, míg a kontroll termékenyülés 93 ± 1 % (11. sz. ábra). A két eredmény között statisztikailag szignifikáns különbséget mutattam ki ($P=0,0084$). A lárvák kelési aránya ugyanebben a kísérletben 95 ± 2 % volt a mélyhűtött spermával termékenyített ikraadagok esetében, míg a kontroll csoportban 94 ± 6 %. A kelési eredmények között már nem találtam statisztikailag igazolható különbséget.

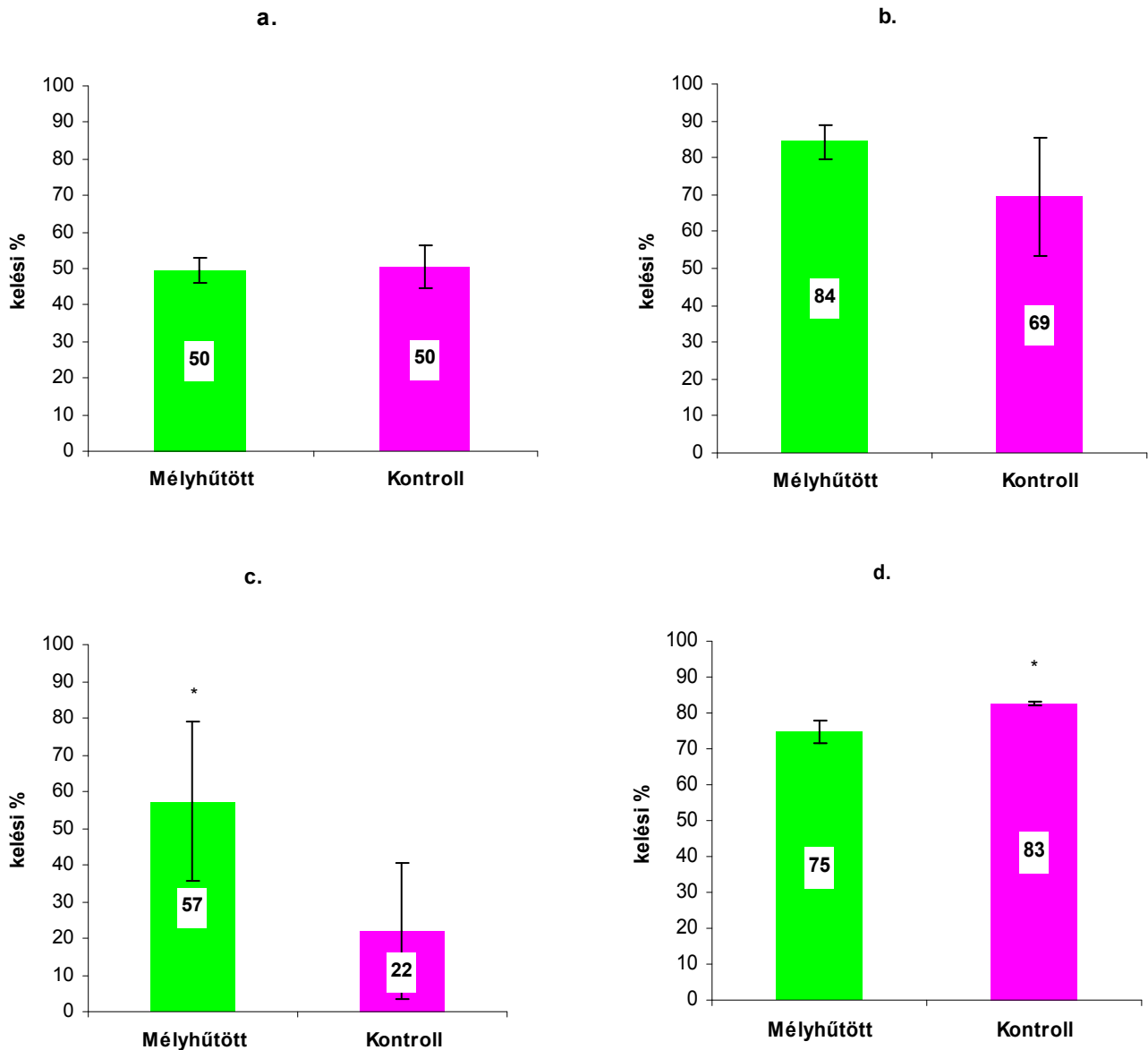


11. sz. ábra: Mélyhűtött harcsaspermával termékenyített ikratételek termékenyülési és kelési eredményei az attalai keltetőházban (n=13)

A százhalombattai kísérletekben a mélyhűtött spermával végzett termékenyítésből származó lárvák kelési aránya 50 ± 3 % volt, míg ugyanebben a kísérletben a kontroll kelés 50 ± 6 % volt. Az eredmények között statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutattam ki. A körömi kísérletben a mélyhűtött spermából származó lárvák kelése 84 ± 5 % volt, míg a kontroll csoporté 69 ± 16 %. Az eredmények között itt sem találtunk statisztikailag igazolható különbséget.

Az Aranykárász Bt. ördögősi keltetőjében végzett kísérletben a mélyhűtött spermából származó lárvák kelése 57 ± 22 % körül alakult, míg a kontroll csoporté 22 ± 18 % volt. Ebben az esetben statisztikailag szignifikáns különbséget ($P=0,05$) találtam a mélyhűtött és a kontroll csoport között.

A szegedi kísérletben a lárvák kelési aránya a mélyhűtött spermából származó csoportban 75 ± 3 % volt, míg a kontrollban 83 ± 1 % és itt is statisztikailag szignifikáns különbséget ($P=0,0249$) tudtam kimutatni a kelési eredmények között (12. sz. ábra).

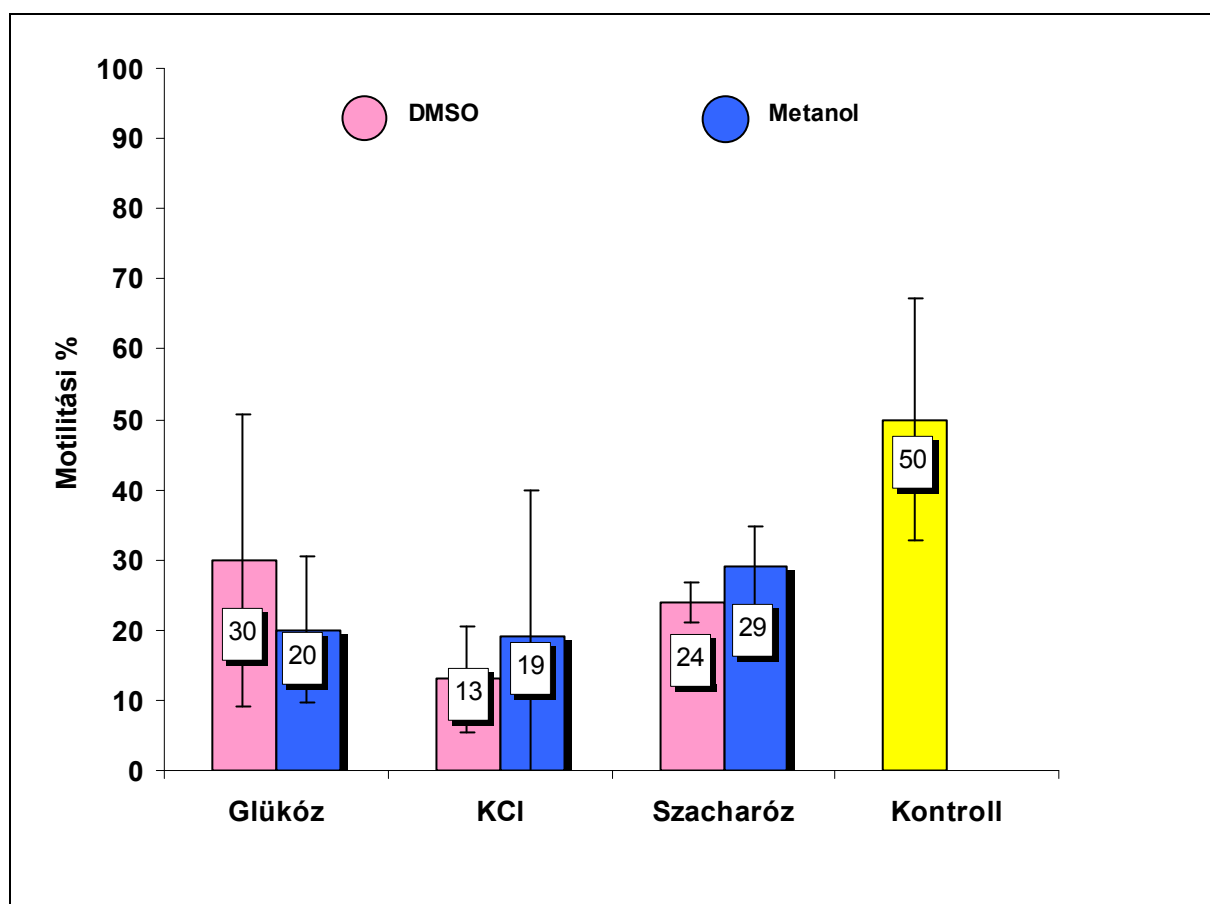


12. sz. ábra: A százhalombattai (a.), körömi (b.), ördögősi (c.) és szegedi (d.) gazdaságokban kapott kelési eredmények mélyhűtött harcaspermával végzett termékenyítés után (n=9)

3.4. Süllő eredmények

A kísérleteim kezdetén minden igyekezet ellenére sem tudtam elkerülni, hogy a tejesek fejése közben a sperma ne keveredjen vizelettel, így a frissen fejt süllő sperma motilitása $50 \pm 17\%$ volt. A mélyhűtött minták közül a glükóz hígító és DMSO védőanyag kombináció produkálta a legmagasabb felolvasztás utáni motilitást $28 \pm 21\%$ (13. sz. ábra), azonban statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam az egyes kezelések között.

A Bürker-kamrás számolással a süllő sperma átlagsűrűsége $0,85 \pm 0,19 \times 10^{10}$ (spermium/ml) értéket adott.

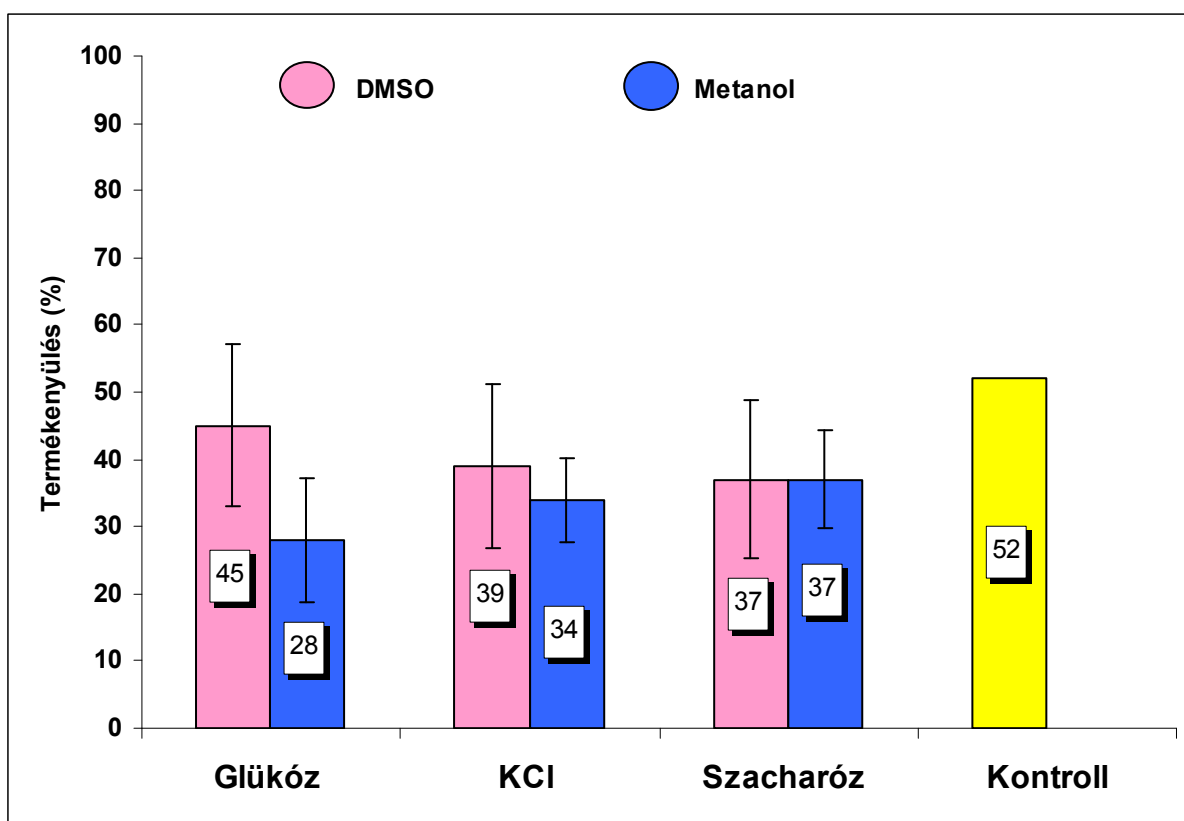


13. sz. ábra: A felolvasztott süllő sperma motilitása (n=15)

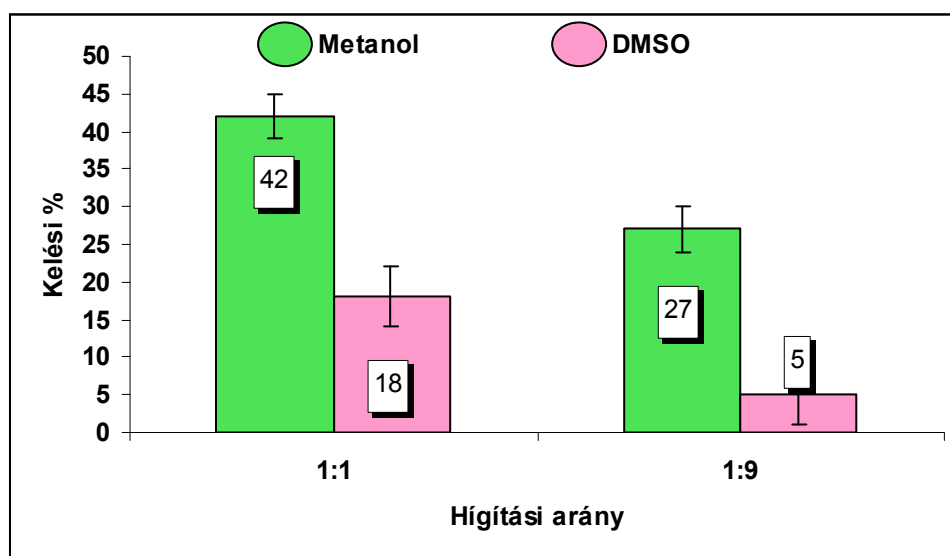
A termékenyítési kísérletekben a legmagasabb termékenyülést ($43 \pm 12\%$) a glükóz hígító és DMSO védőanyag alkalmazásával értem el (14. sz. ábra). Az adatok statisztikai elemzése során megállapítottam, hogy a hígító nem, de az alkalmazott védőanyag szignifikáns ($P=0,0338$) hatással volt a termékenyülési százaléokra.

A kelési eredmények vizsgálatánál (más tejesek felhasználásával) a legmagasabb kelési arányt ($41 \pm 22\%$) metanol védőanyag használata és 1:1 hígítási arány mellett kaptam (15. sz. ábra), azonban az eredmények statisztikai elemzése nem mutatott ki szignifikáns különbséget a kelési eredmények között.

A mélyhűtött süllő sperma keltetőházi felhasználása során a sperma vizelettel való keveredését kiküszöböltem. A katéteres spermavétel eredményeként a frissen fejt süllő sperma motilitása $63 \pm 10\%$ lett. A spermakonzentráció a kísérletben $1,8565 \pm 0,1547 \times 10^{10}$, míg az 1 g-ban található ikraszemek száma 1351 ± 61 volt, így az egy ikraszemre jutó spermiumok száma a 10 g-os ikratétel esetében $3,396 \times 10^5$, a 30 g-os ikratételek esetében $1,132 \times 10^5$ körül alakult. A felolvasztás utáni motilitás esetében $53 \pm 5\%$ volt, így a frissen fejt és a felolvasztott minták motilitás értékei között szignifikáns különbség nem volt ($P=0,1135$).

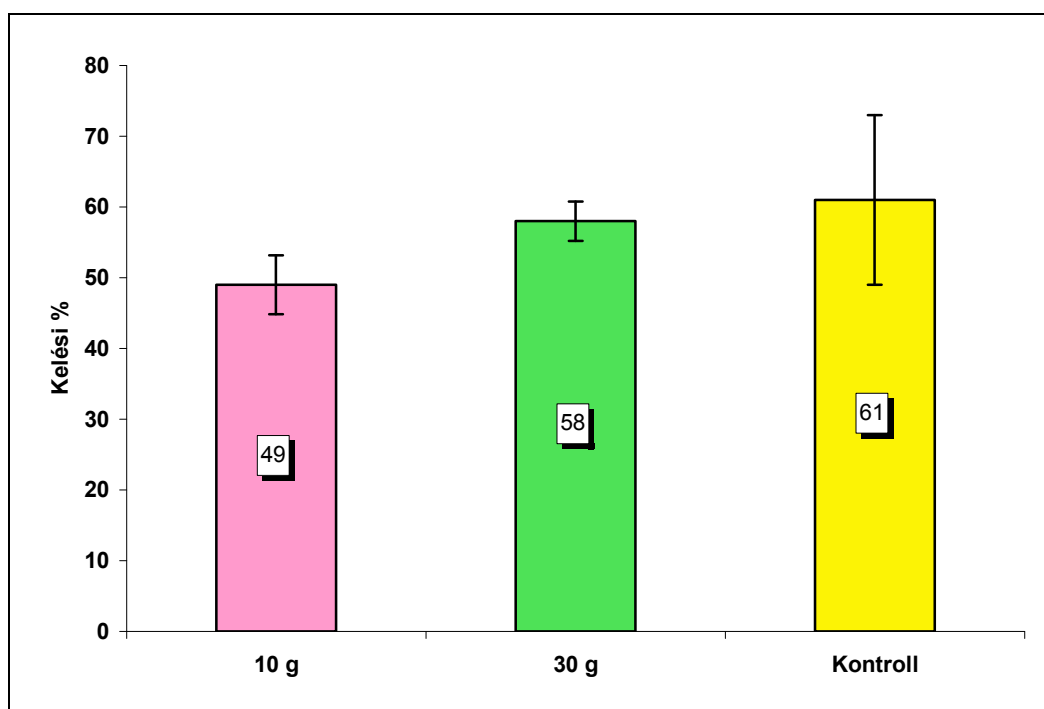


14. sz. ábra: A mélyhűtött süllőspermával kapott termékenyülési eredmények (n=16, kontroll termékenyülés: 51,7%)



15. sz. ábra: Kelési eredmények a hígítási arány és a védőanyag függvényében (n=13)

Amikor 10 g ikrát termékenyítettem 1 műszalmányi mélyhűtött spermával a kikelt lárvák aránya 49 ± 4 % volt, míg 30 g ikrát termékenyítéskor 58 ± 3 %. A két eredmény között ugyan nem találtam statisztikailag szignifikáns eltérést, azonban a t-próba eredménye ($P = 0,05701$) nagyon közel áll a szignifikancia-szinthez. Meglepő módon, amikor 50 g ikrát termékenyítettem egy műszalmányi felolvasztott spermával 87 %-os kelést tapasztaltam, igaz ebben az esetben ismétlés nem volt, az ábrán ezt az eredményt nem tüntettem fel (16. sz. ábra).



16. sz. ábra: Az 1 műszalmával termékenyített különböző ikratételek kelési eredményei (n=13)

3.5. Kecsege eredmények

A natív (kontroll) sperma motilitása $56,2 \pm 23,2\%$ volt. Etilén-glikolra vonatkozó adatokat nem közlök, mivel alkalmazása esetén nem tapasztaltam kimutatható motilitást.

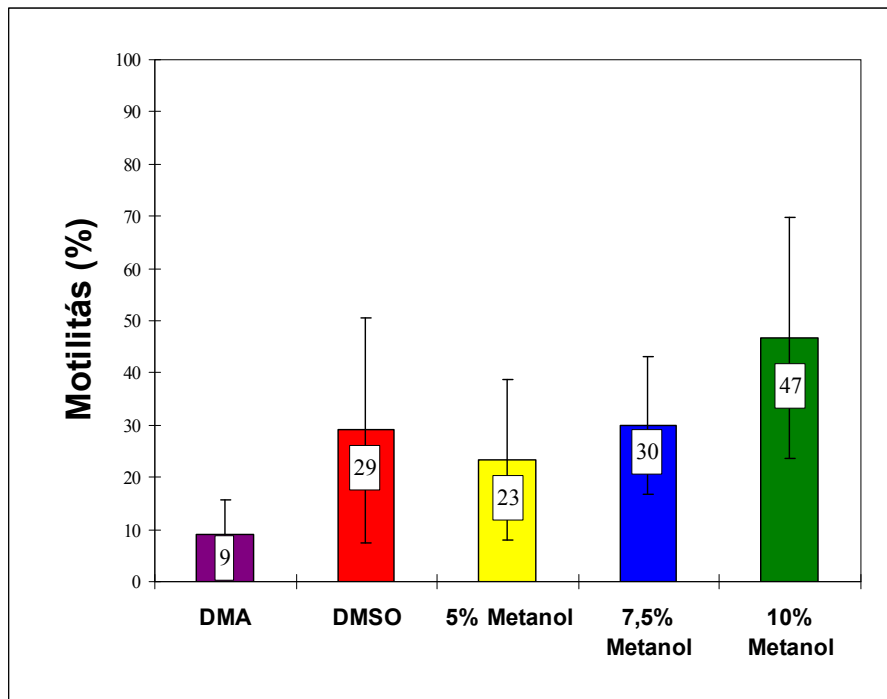
A Tsvetkova-féle hígító esetében különböző fagyásvédő anyagok alkalmazása nem eredményezett szignifikánsan ($P \leq 0,05$ szignifikanciaszint mellett) eltérő eredményeket (17. sz. ábra). Mindemellett a legjobb motilitási átlagértéket a metanol használatakor kaptam, 10%-os végkoncentrációnál: $46,7 \pm 23,1\%$ -ot. A metanol végkoncentrációjának csökkentésével csökkent a felolvasztás utáni motilitás is.

Módosított Tsvetkova-féle hígító esetében a DMSO 10%-os és a metanol 10%-os alkalmazása között észleltem szignifikáns ($P \leq 0,05$) különbséget (18. sz. ábra). A legjobb felolvasztás utáni motilitást, $35,0 \pm 16,0\%$ -ot, 10 %-os metanol alkalmazása eredményezte.

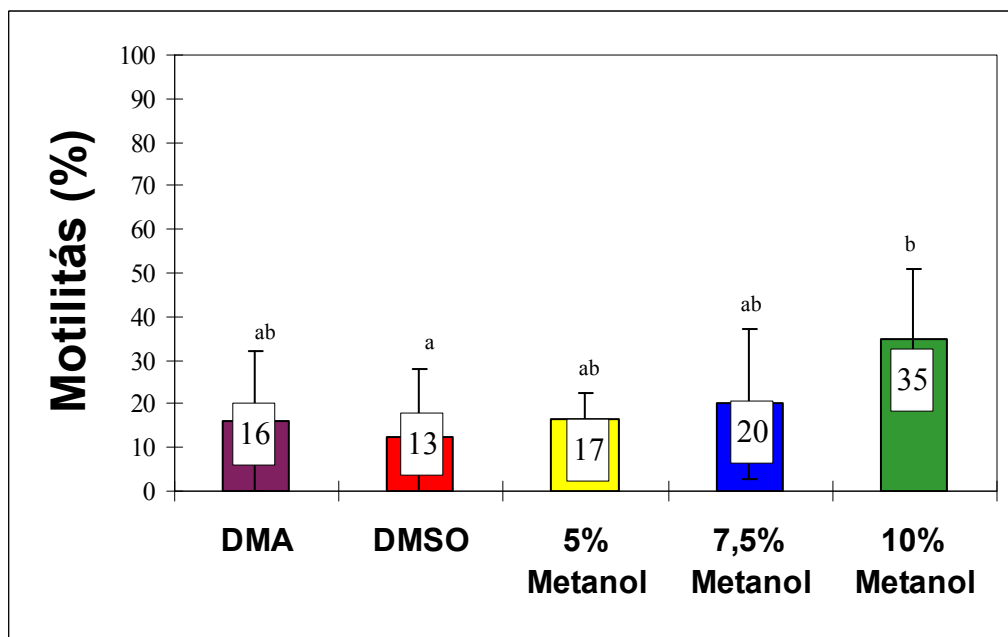
A Jähnichen által kidolgozott hígító használatakor a felolvasztás utáni motilitást illetően szintén a DMSO 10%-os és a metanol 10 %-os végkoncentrációban történő alkalmazása között tapasztaltam szignifikánsan ($P \leq 0,05$) kimutatható különbséget (19. sz. ábra). A legjobb átlagos motilitási értékeket, $30,0 \pm 26,0\%$ -ot, 7,5%-os végkoncentrációban alkalmazott metanol esetében kaptam.

Az előzetes vizsgálatokban legjobb eredményeket mutató hűtőmedium kombinációkat kiválasztva a módosított Tsvetkova-féle hígító és a védőanyagok 10%-os végkoncentrációban történő alkalmazásával hajtottam végre termékenyítési kísérleteket.

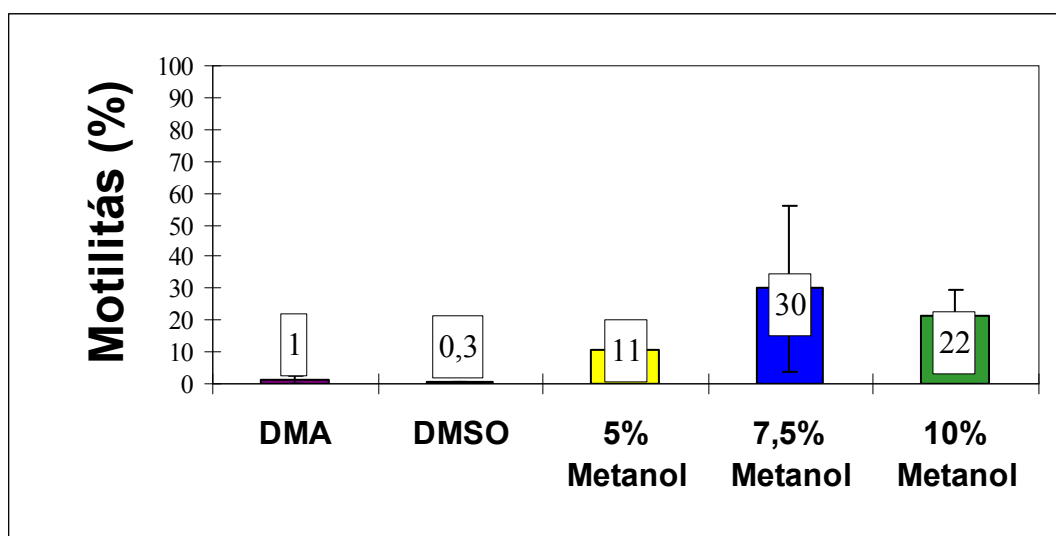
A legjobb eredményeket 10%-os metanol használatával értem el: $22,01 \pm 15,84\%$ -ot. Ez a termékenyülési százalék szignifikánsan ($P \leq 0,05$) nem tér el a natív spermával végzett termékenyítés eredményeitől (20. sz. ábra). A DMA esetén a tapasztalt termékenyülés 0% volt, így ez a védőanyag nem szerepel a grafikonon.



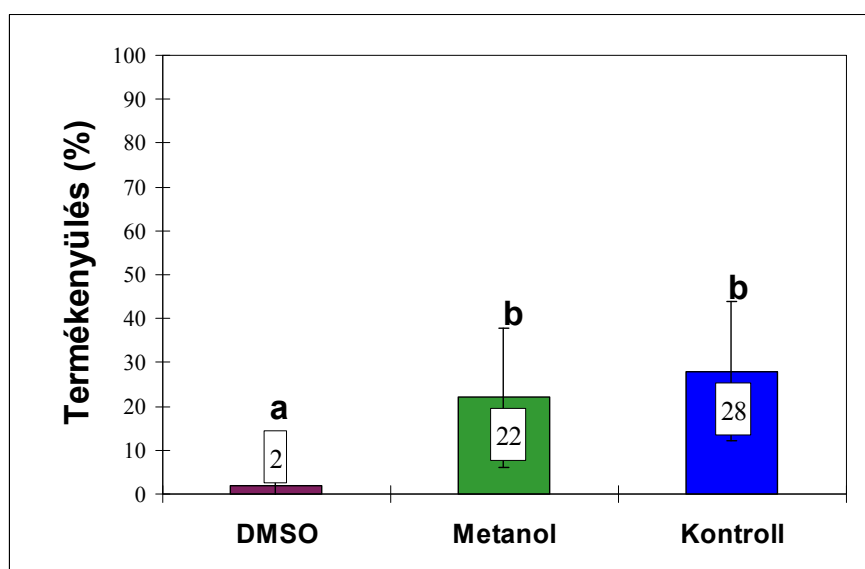
17. sz. ábra: Az eredeti Tsvetkova-féle hígítóval elért felolvasztás utáni motilitási eredmények (n=11)



18. sz. ábra. A módosított Tsvetkova-féle hígítóval elért felolvasztás utáni motilitási eredmények (n=11)



19. sz. ábra: A Jähnichen-féle hígítóval elért felolvasztás utáni motilitási eredmények (n=11)



20. sz. ábra: Mélyhűtött kecsge spermával elért termékenyülési eredmények (n=8)

3.6. A standardizálás eredményei

Fontos elkülöníteni a kutatás-fejlesztés során alkalmazott dimenziókat és metodikát az iparszerű alkalmazásba történő bevezetés minimum követelményeitől, melyek hiánya megkérdőjelezi a módszer gazdasági alkalmazhatóságát. Ezen tényezőket veti össze és mutatja be a 10. sz. táblázat.

A táblázat jól szemlélteti, hogy az a módszertan, mely kis volumenű, elsősorban kísérleti vagy csak csekély egyedszámú, elsősorban természet- és környezetvédelmi céllal (génmegőrzés) kerül kialakításra nem alkalmas a nagymennyiségű igénnyel fellépő és gyors-precíz metodikát feltételező iparszerű termeléssel.

10. sz. táblázat: A halivarsejt-mélyhűtéssel szemben támasztott követelmények összehasonlítása a két potenciális alkalmazási területen

Kísérleti volumen	Iparszerű volumen
Kézi munkaerő	Gépesített
Percek/minta kapacitás	Másodpercek/minta kapacitás
Néhány 10-100 minta/nap	1000 minta/nap
Szárazjég, folyékony nitrogén	Programozható hűtőberendezés
Egyszerű, manuális jelölés	High tech címkézés
Egyszerű, manuális töltés	Megbízható töltés
Hígított minták	Sejt koncentrációs sorozatok
Minták nagy változatossága	Minták alacsony változatossága
Alacsony standardizáltsági fok	Magas standardizáltsági fok
Csekély minőség ellenőrzési szint	Magas minőség ellenőrzési szint
Alacsony kezdeti beruházás igény	Magas kezdeti beruházás igény
Magas mintánkénti költséghányad	Alacsony mintánkénti költséghányad

Ezt a kontrasztot növeli, hogy napjainkban olyan „high-tech” berendezéseket alkalmaznak, melyek a szakszerű, hibanélküli, gyors ivarsejt mélyhűtést (elsősorban spermamélyhűtést segítik. Ilyen automata eszköz pl. automata címkéző (bár kód számot nyomtat a műszalmára), töltő és lezáró berendezés, mely akár 1000 db szalma kapacitást is elér óránként.

Határozottan kijelenthetem, hogy a kísérleti volumen és az iparszerű volumen közötti különbséget nem lehet anélkül áthidalni, hogy ne lépésről-lépésre, szisztematikusan fejlesszük a technológiát. A nagy teljesítményű mélyhűtéshez az átmenetet az alábbi 3 pont figyelembevételével javasolnám végrehajtani:

1. Az eljárás minden lépésének önálló, egyenkénti fejlesztése, illetve az egyes lépések közötti interakciók meghatározása,
2. A lépések racionalizálása és bevezetése a módszertanba többszörös ismételéseket követően,
3. A módszertan standardizálása alkalmazhatósági kritériumok elsődleges figyelembevételével, a hatékonyság átfogó javítása és tökéletesítése objektív paraméterek (felolvasztás utáni motilitás, termékenyülési és kelési arány) alapján.

A tapasztaltak alapján a kritikus metodikai és a technológiai lépéseket az alábbiakban határozhatom meg (11. sz. táblázat). Az egyes lépéseknél figyelembe vettem azokat a technikai elemeket is (CASA és spektrofotométer), melyeket disszertáciomban nem alkalmaztam, viszont hiányukat és alkalmazhatóságukat megvizsgáltam, és a technológiai lépésekben használatukat fontosnak tartom.

A fentiekben általánosságban, a kísérleti tapasztalataimra hagyatkozva igyekeztem rávilágítani a mélyhűtés standardizálási és kereskedelmi forgalomba hozatali aggályaira és lehetőségeire.

Két nagyon fontos tényezőt azonban szándékosan kihagytam, mivel a gyakorlati észlelések és a tudomány jelenlegi állása szerint ezeknek a paramétereknek a befolyásolására egyelőre nem találhatunk megoldást:

- ⇒ Fajon belül, az egyes hímek termékenyítőképességének szórása, függetlenül attól, hogy a sperma minőség kitűnő volt,

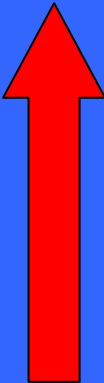
⇒ Fajon belül, az egyes hímek által produkált sperma koncentráció közötti jelentős eltérés, mely paraméter a termékenyítés sikerességét alapjaiban meghatározhatja.

11. sz. táblázat: A hal ivarsejt mélyhűtés metodikai és technológiai lépései

Metodikai lépések	Technológiai lépések
Minta gyűjtés	Minta gyűjtés és elemzés
	Motilitás vizsgálat
	Hígítás
Minta feldolgozás	CASA analízisre előkészítés
	Motilitás minősítése
	Spektrofotométer vizsgálat
	Koncentráció vizsgálat és beállítás
Hűtés és osztályozás	Tároló közeg előkészítése
	Mélyhűtés előkészítése
	Equibráció és mintatöltés
	Hűtés
	Minták elrendezése és osztályozása
Tárolás	Hosszútávú tárolás
Felhasználás	Szállítás
	Felolvasztás és termékenyítés

Összefoglalva a disszertációmban bemutatott 10 éves eredményeket, a következő állapotban látom jelenleg a halivarsejt-mélyhűtés iparszerű alkalmazásának helyzetét (12. sz. táblázat).

12. sz. táblázat: Az iparszerű hal ivarsejt mélyhűtés fejlettségi szintje napjainkban

Fejlődési irány	Fejlődési lépések	Státusz
	Törvényi/politikai szemlélet fejlődés	Hiány
	Szállítási szabályozás	Hiány
	Költség szerkezet elemzés	Hiány
	Biológiai biztonság (Biosecurity)	Hiány
	Standardizálás	Hiány
	Minőség ellenőrzés	Részben kész
	Kereskedelmi méretű infrastruktúra	Részben kész
	Mélyhűtési volumen növelés	Elkészült
	Alap módszertan	Elkészült
	Alkalmazott kutatások	Elkészült

A saját tapasztalataim és a szakirodalom áttekintését követően, azok összegzéseként elkészítettem a halsperma-mélyhűtés SWOT elemzését, mely a 13. sz. táblázatban látható. Igyekeztem azokat a legfontosabb paramétereket figyelembe venni és felsorolni, melyek alapvetően befolyásolhatják ezen biotechnikai módszer elterjedését és gyakorlati bevezetését.

13. sz. táblázat: A halsperma-mélyhűtés SWOT analízise

Erősségek ⇒ jól képzett kutatói csoportok, ⇒ megfelelő szakirodalmi adatbázis, ⇒ szakmaspecifikus workshopok és konferenciák, ⇒ relative fejlett műszaki infrastruktúra, ⇒ jó kommunikáció az egyes csoportok között, ⇒ előrehaladott kísérletek, számos halfajon, ⇒ jól működő rendszerek más gazdasági állatfajok esetén (pl. szarvasmarha).	Gyengeségek ⇒ körülményes mélyhűtési technológiák, ⇒ nem megbízható és nem ismételhető technológiák, ⇒ marketing teljes hiánya, ⇒ kevés adat gyakorlati tesztekéről, ⇒ kis mennyiségű ivartermék (0,5-1 ml) hűtése áll a kutatások fókuszpontjában, ⇒ gyenge tudás- és technológiatranszfer, ⇒ általános bizalmatlanság a mélyhűtött spermával szemben.
Lehetőségek ⇒ probléma az egyes halfajok mesterséges szaporítási technológiájában, ⇒ veszélyeztetett halfajok számának növekedése, ⇒ nemesítési munka alacsony szintje a haltenyésztésben, ⇒ a mélyhűtés alkalmazása az iparszerű haltermelési technológiákban.	Veszélyek ⇒ műszaki berendezések magas költségigénye, ⇒ a hazai haltenyésztési ágazat alacsony technológiai igényessége, ⇒ az új kutatási eredmények bevezetésének nehézségei a gyakorlatba, ⇒ a technikai színvonal alacsony szintje miatti piacvesztés.

4. Új tudományos eredmények

A disszertációban bemutatott halfajok spermamélyhűtési kutatómunkám során végzett kísérleteimben tapasztaltakból az alábbi új tudományos eredményeket és megállapításokat teszem:

1. Nagy egyedszámbra alapozva meghatároztam egyes halfajaink hímivarsejtjeinek fagyasztása során a kritikus technológiai lépéseket, azon kritériumokat, melyek alapjaiban determinálják meg a hímivarsejtjeik mélyhűtésének sikerességét és eredményességét.
2. Ponty fajnál meghatároztam a hűtőmedium optimális összetételét: glükóz hígító és 10%-os metanol védőanyag végkoncentráció összetételben.
3. Ponty fajnál optimalizáltam a mélyhűtés kritikus tényezőit: 3 cm vastag polisztirol kereten 3 perc időtartamig folytatott mélyhűtés, hígítási arány 1:9 mértékben, míg a felolvasztás során a 40 °C-os vízfürdő 13 másodperc időtartamig bizonyult megfelelőnek.
4. A pontyféléken végzett kutatások során a bodorka, karikakeszeg és márna esetében a glükóz és 10% metanol együttese, míg dévérkeszeg esetében a fruktóz és 10% metanol produkálta a legjobb kelési eredményt.
5. Erős korreláció mutatkozik pontyfélék esetében a natív sperma motilitás és termékenyülési százalék, valamint a felolvasztott sperma motilitás és a kelési százalék között. Ezen paraméterek mérésével nagy biztonsággal prognosztizálható a mélyhűtés sikeressége.
6. A harcsa faj spermájának eltarthatósága növelhető, amennyiben a natív spermához cukoralapú hígítót: fruktózt vagy glükózt adagolunk.
7. Harcsa faj esetében optimalizáltam a nagy - 5 ml űrtartalmú - műszalma alkalmazásának körülményeit: 3 cm vastagságú polisztirol kereten 7 percre szükséges hűteni a spermaadagokat.
8. A harcsa mélyhűtésének kritikus paramétereit az alábbiakban határoztam meg: 1:1 hígítási arány, 6%-os fruktóz hígító és 10%-os metanol védőanyag (végkoncentrációban).
9. A mélyhűtést harcsa fajon alkalmaztam először üzemi méretű szaporítási technológia szerves elemeként, és kaptam a natív spermával végzett termékenyítésekkel megegyező eredményeket.
10. Süllő faj esetében a legmagasabb termékenyülési eredményeket a glükóz és 10%-os DMSO hűtőmedium adta, míg kelési eredményeknél a glükóz és 10%-os metanol kombináció bizonyult a legeredményesebbnek.
11. A süllő esetében a mélyhűtés kritikus elemeit az alábbiakban határoztam meg: 1:1 hígítási arány, 3 cm vastag polisztirol keret alkalmazása mellett 3 perces mélyhűtési időtartam, felolvasztás 40 °C-os vízfürdő-13 másodperc.
12. Kecsege fajon a mélyhűtés során a módosított Tsvetkova-féle hígító és a 10%-os végkoncentrációjú metanol alkalmazásával lehet a legjobb termékenyülési eredményt realizálni.
13. Tapasztalati úton meghatároztam a mélyhűtés teljesítmény fokozásának szükséges kritériumait, elkülönítettem és definiáltam a metodikai és technológiai lépéseket, és SWOT analízis alkalmazásával prognosztizáltam a hal hímivarsejt fejlődés lehetőségeit és korlátait.

5. Összefoglalás

Az MTA Doktori értekezésemben **egyes gazdasági haszonhalaink hímivarsejtjeinek (spermájának) mélyhűtési eredményeit tárgyalom**, mely kísérleteket 2001-2010. évek közötti időintervallumban végeztem kollégáimmal.

A disszertációm **legfontosabb célkitűzése** volt, hogy az eredmények prezentálása lehetőség szerint gyakorlati szemléletű megközelítést és bemutatást képviseljen, és egyben magában hordozza a tudományos igényességet, az új és újszerű megoldások világos ismertetését.

A **ponty** fajon végzett munkáim során kidolgoztam egy olyan mélyhűtési eljárást, melynek alkalmazásával biztonságosan lehet, elsősorban kisadagú ivarterméket hűteni. A 0,5 ml-es műszalma főképpen a génbanki megőrzésre alkalmas, viszont a mélyhűtés többi eleme már jól adaptálható nagyobb volumenű és nagyobb tároló eszköz alkalmazásának technológiájába. A glükóz hígító, a 10%-os metanol védőanyag alkalmazása, 1:9 hígítási arány, a 3 cm vastag polisztirol kereten végzett 3 perc időtartamú hűtés, valamint a 40 °C-os vízfürdőben 13 másodperc időtartamig folytatott felolvasztás alapját képezte és képi ezen technika fejlesztésének, melyet számos kutatás és ezekből származó eredmény támaszt alá. A kidolgozott technológia bemutatásra került többek között könyvfejezetben (Urbányi és Horváth, 2008), valamint a módszer képezte a továbbfejlesztés alapját a nagyobb tároló eszközök alkalmazása felé (Horváth et al., 2007).

A **pontyféléken** végzett vizsgálatokat elsősorban gén és fajmegőrzési céllal végeztem, melynek indukálása a tiszai ciánszennyezésre vezethető vissza. Kijelenthető, hogy a pontyon kapott eredmények kiválóan felhasználhatóak és átültethetőek a folyóvízi pontyfélék spermájának fagyasztási munkálataiba, azok tervezésébe és végrehajtásába. Az eredmények értékelése során nagyon szoros korrelációkat állapítottam meg egyes, a mélyhűtés sikerességét alapvetően befolyásoló paraméterek között. Ez a szoros összefüggés alátámasztja azt a feltételezést, hogy a sperma motilitás (mind a kiindulási, mind a felolvasztás utáni) nem nyújt kellő információt és nem biztosít megfelelő termékenyülést. A vizsgált halfajok esetében a dévérkeszegnél a fruktóz és 10%-os metanol kombináció, míg bodorka, karikakeszeg és márna fajoknál a glükóz és 10%-os metanol eredményezte a legjobb értékeket. A halfajok mélyhűtési eredményeiről beszámoltam tudományos közleményben is (Urbányi et al., 2006).

A disszertációmban tárgyalt **két ragadozó halfaj, a harcsa és a süllő** sperma mélyhűtésének igénye a gyakorlat felől érkezett. Ezen halfajok keltetőházi szaporításának kidolgozottsága közel áll a tökéleteshez, de van egy-egy tényező, mely veszélyezteti a szaporító munka sikerességét. Ez pedig a hímivartermékek megfelelő időben való rendelkezésre állása. Harcsa esetében ezt elsősorban a hím egyedek előlésével biztosítják, míg süllő esetében, amennyiben a szaporodás szinkronizálása nem megfelelő, akkor a sperma limitáló tényezővé lép elő. A kidolgozott technológia mindkét faj esetében keltetőházi, vagyis nagyüzemi bevezetésen is túljutott, és a gyakorlati szakemberek is alkalmazzák a szaporítási tevékenységük segítésére és könnyítésére.

A harcsa esetében a módszer kidolgozott: 6%-os fruktóz és 10%-os metanol hűtőmedium, 1:1 hígítási arány, 3 cm vastagságú polisztirol kereten 7 perces hűtést követően olyan minőségű sperma áll rendelkezésre, mely a natív spermával megegyező kelési eredményeket biztosít. Ezen munkám eredményét közöltük tudományos folyóiratban (Bokor et al., 2010), illetve adaptáltuk más harcsafélékre (Kovács et al., 2010).

A süllő esetében a módszer kidolgozottsága majdnem közelít a tökéleteshez. Az optimális metodika még nem egyértelmű, további vizsgálatokat igényel az a tény, miszerint a termékenyülési és a kelési eredmények esetében a legjobb eredményt eltérő védőanyag alkalmazása eredményezi. A termékenyülési adatoknál a glükóz és 10%-os DMSO, míg kelési eredményeknél a glükóz és 10%-os metanol kombináció bizonyult a legmegfelelőbbnek. A többi kritikus paramétert meghatároztam: 1:1 hígítási arány, 3 cm vastag polisztirol keret alkalmazása mellett 3 perces mélyhűtési időtartam, felolvasztás 40 °C-os vízfürdőben 13 másodperc időtartam alatt. Eredményeimről beszámoltam (Bokor et al., 2008), a módszert más sügérféléknél is alkalmaztuk (Bokor et al., 2007).

A **kecsege** fajon végzett munkám eredményei még ezen halfaj spermamélyhűtési kutatásaink kezdetén születtek, viszont számos további, a tokféléken folytatott együttműködés és kísérleti munka alapjait képezi. A módosított Tsvetkova hígító kidolgozása, valamint a metanol, mint védőanyag bevezetése alapjaiban változtatta meg a tokfélék spermamélyhűtési módszertanát, melyet azóta is számos helyen alkalmaznak a világban. Ezen munka eredményeképpen számos publikáció született tudományos folyóiratban (Horváth et al., 2010, Horváth et al., 2008a), vagy könyvfejezetként (Horváth et al., 2008b).

A disszertációban bemutatott eredmények rendezőelve volt az **alkalmazhatóság**. A lépések és módszerek tervezésénél fontos volt azon kritérium figyelembevétele, hogy a kidolgozott metodika milyen mértékben vezethető be a gyakorlat számára.

A spermamélyhűtés technológiáját napjainkra több mint 200 halfajra kifejlesztették, de gyakorlati alkalmazásról szinte nincs információnk. A mélyhűtés gyakorlati felhasználása még gyerekcipőben jár, ellentétben a szarvasmarha ágazattal, ahol a mélyhűtött sperma felhasználása mindennapossá vált és önálló iparágga fejlődött. Ezért is tartottam fontosnak, hogy az eredményekből levont következtetések mellett fokozott figyelmet fordítsak a módszer praktikumba való bevezetésének analizálására, feltérképezzem és meghatározom azokat a kritikus tényezőket és faktorokat, melyek az iparszerű alkalmazást gátolják. Így a disszertációmban külön fejezetben tárgyalom a **standardizálás** problémakörét, melyben elemeztem a mélyhűtés teljesítmény fokozásának szükséges kritériumait, elkülönítettem és definiáltam a metodikai és technológiai lépéseket, és SWOT analízis alkalmazásával prognosztizáltam a hal hímivar-sejt-mélyhűtés fejlődés lehetőségeit és korlátait.

Bízom benne, hogy a módszer rövid időn belül teret nyer a haltenyésztésben és halgazdálkodásban, és olyan rutinszerű technológiává válik, mely elősegíti az akvakultúra ágazat fejlődését.

6. Az értekezés témakörében megjelent 10 jelentősebb közlemény

1. Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T: Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 54: pp. 1477-1498. (2000)
2. Horváth, Á., Miskolczi, E. and Urbányi, B.: Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources* 16: pp. 457-460. (2003)
3. Urbanyi B, Horvath A, Kovacs B: Successful hybridization of Acipenser species using cryopreserved sperm. *Aquaculture International* 12:(1) pp. 47-56. (2004)
4. Urbanyi B, Szabo T, Miskolczi E, Mihálffy S, Vranovics K, Horvath A: Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 22:(3) pp. 201-204. (2006)
5. Horváth Á, Miskolczi E, Mihálffy Sz, Ősz K, Szabó K, Urbányi B.: Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology* 54: pp. 251-257. (2007)
6. Horváth, Á., Urbányi, B., Mims, S.D.: Cryopreservation of sperm from species of the order Acipenseriformes. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (szerk.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton: Taylor and Francis, pp. 409-414. (2008)
7. Bokor Z, Horvath A, Horvath L, Urbanyi B: Cryopreservation of Pike Perch Sperm in Hatchery Conditions. *Israeli Journal Of Aquaculture-Bamidgeh* 60:(3) pp. 168-171. (2008)
8. Urbányi, B, Horváth, Á.: Cryopreservation of common carp sperm. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (szerk.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton: Taylor and Francis, pp. 351-356. (2008)
9. Bokor Z, Urbányi B, Horváth L, Horváth Á: Commercial-scale cryopreservation of wels catfish (*Silurus glanis*) semen. *Aquaculture Research* 41:(10) pp. 1549-1551. (2010)
10. Horváth, Á., Urbányi, B., Wang, C., Onders, R.J., Mims, S.D.: Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *Journal of Applied Ichthyology* 26: pp. 715-719. (2010)

7. Publikációs adatok

Tudományos közlemények a tud. fokozat után	száma	Impakt Faktor
Lektorált szakfolyóiratokban közl. összesen	66	---
Ebből: első vagy utolsó szerző	19	---
nemzetközi IF-es folyóiratban	30	32,114
hazai IF-es tud. folyóiratban magyarul	1	0,088
hazai IF-es tud. folyóiratban idegen nyelven	8	5,437
nemzetközi nem IF-es szakfolyóiratban	0	---
hazai nem IF-es szakfolyóiratban magyarul	15	---
hazai nem IF-es szakfolyóiratban idegen nyelven	1	---
Kongr. proceedings (teljes terjedelem)	9	---
ebből külföldi kiadványban	0	---
magyar kiadványban	9	---
Ismeretterjesztő közleményei száma:	2	---
A tud. fokozat utáni impakt faktor	---	37,639
A teljes életműre vonatkoztatott impakt faktor	---	42,35
Az alábbi adatok: összes és tud. fokozat után	Összes	Tud. fok. után
Tud. könyv magyarul, egyszerűs	0	0
idegen nyelven egyszerűs	0	0
könyvrészlet magyarul	3	3
könyvrészlet idegen nyelven	9	9
Tankönyv magyarul egyszerűs	0	0
magyarul többszerzős	0	3
Ismeretterjesztő közlemények	4	2
könyvek	0	0
Publikációinak független idézettsége	371	283
a) ebből külföldi folyóiratban, könyvben	340	252
b) hazai folyóiratban, könyvben, magyarul	0	0
c) hazai folyóiratban, könyvben idegen ny.	31	31
Kongresszusi előadásai száma itthon	38	31
Kongresszusi előadásai száma külföldön	27	22

8. Szakmai-tudományos önéletrajz

Név: Dr. Urbányi Béla
Születési hely, idő: Székesfehérvár, 1971. 02. 04.
Családi állapot: nő
 feleség: Rákóczi Katalin közgazdász
 gyermek: Sára Katalin 10 éves, Kinga Erzsébet 8 éves,
 Júlia Mária 6 éves
Beosztás: egyetemi docens, tanszékvezető
Lakcím: Diósd, 2049 Zöldfa u. 44.
Telefon/fax: 06-23-370-266
E-mail: urbanyib@t-online.hu
Munkahely: Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
 Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási
 Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, Gödöllő, Páter K. u. 1.
 2103.
Telefon: 06-28-522-000/1912 mellék
Fax: 06-28-410-804
E-mail: Urbanyi.Bela@mkk.szie.hu

Iskolai végzettség és kompetencia

1977-1985: Általános iskola, Soponya
1985-1989: Teleki Blanka Gimnázium, Székesfehérvár
1990-1995: Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Állattenyésztő szak
 Halászat és halgazdálkodás fakultáció
Agrármérnöki Diploma 118/1995. sz. oklevél
1994: Vadgazdálkodás-vadászat képesítés
1994: Felsőfokú külkereskedelmi üzletkötő szakképesítés
1996: *Halászat és halgazdálkodás szakirányú diploma, 12/1996. sz. oklevél*
1999: *Ph.D. fokozat megszerzése, 25/1999. sz. oklevél*
2004: *Minőségügyi szakmérnök diploma, 34/2004. sz. oklevél*
2005: *Pályázatok készítése és gondozása felnőttképzési kurzus*
PL 0603/2005/2/154 sz. oklevél
2005: *Habilitáció-Szent István Egyetem, Gödöllő*

Nyelvvizsgák, nyelvismeret

1992-1993: német középfokú nyelvvizsga (C típusú, 04469/1992, 27172/1993)
1995: angol alapfokú nyelvvizsga (C típusú, 08997/1995)

Elismerések, díjak

1994: ETDK Takarmányozási, etológiai és vadgazdálkodási szekcióban II. helyezés, Gödöllő
1995: Agrár OTDK Állattenyésztési szekcióban különdíj (II. helyezés), Mezőtúr
1996: V. Országos Környezetvédelmi konferencia (I. helyezés és rektori különdíj)
1998: A "Tíz Kiemelkedő Fiatal" (TOYP) pályázat "Tudományos eredmény" kategóriájának győztese.
1998: Magyar Tudományos Akadémia "Stratégiai Kutatások Irodája" pályázatának Elnöki fődíja

1998:	1 éves SOROS predoktori ösztöndíj elnyerése (SOROS Alapítvány)
1999:	MTA Agrártudományok Osztályának Darányi Ignác ösztöndíj elnyerése
1999-2001:	Magyary Zoltán posztdoktori ösztöndíj
2001-2004:	OTKA posztdoktori ösztöndíj
2004:	Dékáni dícséret
2009:	SzIE arany Babérkoszorú kitüntetés
2009:	OTKA hónap kutatója
2010:	„Kari Tudományos Munkáért” kitüntetés

Hazai és nemzetközi szervezetekben betöltött tagság

- ⇒ MTA Agrártudományok Osztálya, köztestületi tag 1999-től
- ⇒ Magyary Zoltán Ösztöndíjasok Társaságának tagja 1999-től
- ⇒ EAS (European Aquaculture Society) tagja, 2002-től

Egyetemi tisztségek

- ⇒ A SzIE Szenátusának tagja, MKK képviselőként, 2011. június 30-ig
- ⇒ MKK Kari tanács tagja KTI képviselőként, 2011. június 30-ig
- ⇒ A SzIE Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola titkára, 2000-
- ⇒ A SzIE Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola belső alapító tagja, 2009-
- ⇒ Regionális Egyetemi Tudásközpont, operatív igazgató, 2006-2008
- ⇒ Regionális Egyetemi tudásközpont, mb. igazgató, 2009-
- ⇒ TÁMOP 4.2.1. pályázat, SzIE projektmenedzser, 2009-
- ⇒ Rektori megbízott, pályázatok és K+F+I területen, 2008-2010
- ⇒ MKK AVOP pályázat, projektmenedzser, 2005-2007

Publikációk

- ⇒ Lektorált szakfolyóiratban közölt közlemények (PhD fokozat megszerzését - 1999- követően) száma: 66
- ⇒ Impakt faktor (teljes életműre vonatkozóan): 42,35
- ⇒ Független idézettség (teljes életműre vonatkozóan): 371

Bírálnói tevékenység

- ⇒ 26 alkalommal bíráló (OTKA pályázat, GOP-111/KMOP-111 pályázat bírálója, FP7)
- ⇒ OTKA Agrár2 zsűri tag (2011-től)
- ⇒ 14 alkalommal hazai és nemzetközi folyóirat felkért bírálója

Tudománypolitikai tevékenység

- ⇒ Innovációs járulék hasznosulása a gazdaságban munkacsoport felkért tagja
- ⇒ Európai halászati és innovációs technológiai platform egyik hazai képviselője
- ⇒ Halászati Tudományos Tanács tag
- ⇒ Halászati Tanácsadó Testület tag

Utánpótlás nevelés

- ⇒ Fokozatot szerzett doktoranduszok száma: 2 fő
- ⇒ Doktori cselekményt végző hallgatók száma: 5 fő
- ⇒ TDK hallgatók száma: 26 fő
- ⇒ Szakdolgozatos és diplomadolgozatos hallgatók száma: 27 fő

Pályázati aktivitás (1995-től)

- ⇒ 6 alapkutatási pályázat témavezetője és közreműködője (OTKA, Norvég OTKA és FKFP pályázatok)
- ⇒ 33 alkalmazott kutatási pályázat témavezetője és közreműködője (OMFB, NKFP programok)
- ⇒ 14 K+F+I vállalati projekt megrendelés koordinátora (GOP és KMOP pályázatok)
- ⇒ 1 EU FP7 pályázat témavezetője

Egyéb készségek és kompetenciák

- ⇒ Fradi szurkoló
- ⇒ vadászvizsga
- ⇒ sport (labdajátékok)
- ⇒ borszakértő
- ⇒ kártyajátékok
- ⇒ síelés