

MTA Doktori értekezés tézisei

**A spermamélyhűtés szerepe egyes
természetvédelmi és gazdasági szempontból
jelentős halfajok genetikai tartalékainak
megőrzésében**

Dr. Horváth Ákos

Gödöllő
2018

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	5
1.1 CÉLKITŰZÉS.....	6
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	7
2.1 VIZSGÁLATI MÓDSZERTAN	7
2.2 VIZSGÁLATOK TOKALAKÚAKBAN	7
2.2.1 Az egyes tokalakú fajokban végzett vizsgálatok.....	8
2.2.1.1 Rövidorrú tok fajban végzett vizsgálatok	8
2.2.1.2 Sápadt tok fajban végzett vizsgálatok.....	8
2.2.1.3 Lapátorrú tok fajban végzett vizsgálatok.....	8
2.3 VIZSGÁLATOK PONTY FAJBAN.....	9
2.3.1 A kísérleti állományok származása.....	9
2.3.2 A ponty fajban végzett vizsgálatok részletes ismertetése	9
2.4 VIZSGÁLATOK LAZACFÉLÉKBEN.....	10
2.4.1 Az egyes lazacféle fajokban végzett kísérletek.....	10
2.4.1.1 Sebes pisztrángban végzett kísérletek	10
2.4.1.2 Márványpisztrángban végzett kísérletek	10
2.4.1.3 Szivárványos pisztrángban végzett kísérletek.....	11
2.4.1.4 Pénzes pérben végzett kísérletek.....	11
2.5 A KIDOLGOZOTT MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A GYAKORLATBAN	11
2.5.1 A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása.....	11
2.5.2 A lazacfélékben kidolgozott módszerek alkalmazása	11
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	12
3.1 A TOKALAKÚAKBAN KAPOTT EREDMÉNYEK	12
3.1.1 A rövidorrú tok fajban kapott eredmények.....	12
3.1.2 A sápadt tok fajban kapott eredmények	12
3.1.3 A lapátorrú tok fajban kapott eredmények.....	13
3.1.4 A tokalakuakban kapott eredmények értékelése.....	13
3.2 A PONTY FAJBAN VÉGZETT KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI	14
3.2.1 A ponty fajban kapott eredmények értékelése.....	14
3.3 A LAZACFÉLÉKBEN VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	15
3.3.1 A sebes pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei	15
3.3.2 A márványpisztrángban végzett vizsgálatok eredményei.....	15
3.3.3 A szivárványos pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei.....	15
3.3.4 A pénzes pérben végzett vizsgálatok eredményei	16
3.3.5 A lazacfélékben kapott eredmények értékelése.....	16

3.4 A KIDOLGOZOTT MÓDSZEREK GYAKORLATI ALKALMAZÁSÁNAK EREDMÉNYEI	17
3.4.1 A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása	17
3.4.2 A lazacfélékban kidolgozott módszerek alkalmazása	17
3.4.3 A kidolgozott módszerek gyakorlati alkalmazásának értékelése	17
3.5 JÖVŐKÉP	18
4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	20
5. A DOLGOZAT ELKÉSZÍTÉSÉHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	21
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	22

1. Bevezetés

A genetikai tartalékok megőrzése egy sokat kutatott és sokat vitatott terület, amelynek a fontosságát azonban nem lehet eléggé kihangsúlyozni. Az ember a természetnek az a része, amely képes ugyanennek a természetnek az értékeit, elemeit tudatosan használni és a saját javára fordítani. Az ember domesztikálja (házasítja) a különböző növény- és állatfajokat, ezek alapvető tulajdonságait tudatos tenyésztőmunkával szelektív módon kiemeli, felerősíti és ebből hasznot húz. Ahhoz, hogy a domesztikáció révén eljussunk odáig, hogy milliók élelmiszerigényét elégíthessük ki, arra van szükség, hogy a tenyésztett fajok, fajták minél egységesebbek, egyformábbak legyenek, azaz csökkenteni kell a tenyésztett csoportokon belüli változatosságot. A termelés intenzifikációjával természetes módon együtt jár a genetikai változatosság csökkenése. Mivel az ember ösztönösen a többet termelő, gyorsabban növekedő fajtákat, változatokat részesíti előnyben, az ilyen kritériumoknak kevésbé megfelelő csoportok háttérbe szorulnak, tenyésztésük lényegtelenné válik, majd idővel meg is szűnik. Ezek a megszűnő vad, félvad formák képviselik ugyanakkor a genetikai változatosságot, hiszen az egységes tenyésztett állományok kialakulásához a legtöbb esetben több populáció géneit használják fel.

A genetikai tartalékok megőrzése fontos a tenyésztés intenzitásának fenntartásához is. A tenyésztett állományok a fokozott szelekciós nyomás és termelési elvárások miatt különleges igényekkel rendelkeznek, ami sok esetben a fokozott igénybevétellel, a szervezet és az immunrendszer ellenálló-képességének csökkenésével és megnövekedett állategészségügyi kockázatokkal jár. Általános elv, hogy a szuperintenzíven tenyésztett fajták, állományok a legsérülékenyebbek egy adott fajon belül. A következmények kezelésének egyik módja a visszakeresztesés az adott fajta egyéb populációival és a genetikai változatosság növelése a fajtán belül. Ez azonban csak abban az esetben lehetséges, ha a fajtán belül léteznek egyéb populációk.

A fentiek mellett nem szabad megfeledkezni a genetikai erőforrások megőrzésének kézenfekvő és a közvélemény által jobban ismert területéről, a természetes környezetben élő fajok megőrzéséről. A Természetvédelmi Világszövetség (International Union for Conservation of Nature – IUCN) által gondozott vörös könyv (<http://www.iucnredlist.org>) adatai szerint a védelemre szoruló növény- és állatfajok száma eleve igen magas és szinte minden kategóriában folyamatosan növekszik. A természetes környezetben élő fajok, illetve azok megőrzésének jelentősége megkérdőjelezhetetlen, ezt különböző nemzetközi szervezetek, az Európai Unió jogszabályai, illetve Magyarország Alaptörvénye is garantálja.

A tenyésztett és természetes környezetben élő fajok, populációk fent említett megőrzése ugyanilyen fontos a szűkebb szakterületemen, a halgazdálkodásban is. A domesztikáció igen alacsony foka miatt a halgazdálkodás nagyon is összefügg a természeti erőforrások hasznosításával és megőrzésével. A halgazdálkodásban kidolgozott módszerek és eljárások nem csak a kereskedelmi célú haltenyésztésben kapnak szerepet, hanem egyéb területeken is, pl. a természetvédelmi szempontból lényeges fajok megőrzésében is. Az indukált halszaporítást és ivadéknevelést például széles körben alkalmazzák a fajmegőrzéssel foglalkozó programok, amelyeknek célja a felnevelt ivadék kihelyezése természetes vizekbe, nevezetesen arra az élőhelyre, ahonnan azok származtak. Az ilyen programokba bevont

fajokból tenyészállományokat tartanak fent haltenyésztő telepeken, amelyek utána részt vesznek a kihelyezésre szánt állományok létrehozásában. A szaporítás módszereit, pl. az indukált ivarérelés, vagy a hormonkezelés az ovuláció és spermiáció végső kiváltására mind a halgazdálkodás gyakorlatában dolgozták ki először, majd alkalmazták őket a faj- vagy fajtamegőrzési programokban.

Értekezésemben a halászati genetikai erőforrások megőrzésének egyik módjával, a hímivarsejtek mélyhűtésével foglalkozom. Az élő sejtek és szövetek mélyhűtése lehetővé teszi azok megőrzését emberi léptékkal mérve korlátlan ideig. A mélyhűtött sperma bármikor felolvasztható és felhasználható termékenyítésre, függetlenül attól, hogy az azt adó egyed életben, vagy még szaporodásra alkalmas állapotban van-e. A mélyhűtési módszerek, receptúrák folyamatosan fejlődnek, azokat egyre több halfaj esetében dolgozzák ki. Az így kifejlesztett módszerek használatával jobb termékenyítési eredmények érhetőek el, végső soron jobb termelési eredményeket is produkálva.

Előre bocsátom, hogy az értekezésemben felváltva használom a magyar nyelv egyes szám első személyű, illetve többes szám első személyű alakját. Meggyőződésem, hogy a 21. században senki nem végez kutatómunkát önmagában, mások segítségével nélkül. A csapatmunka, illetve a közreműködő kollégák iránti tisztelet okán a dolgozat nagy részében a többes szám első személyt használtam, kivéve azokat a vizsgálatokat, amelyeket valóban egyedül végeztem.

1.1 Célkitűzés

Az értekezésemben 11 év (2003-2014) kutatómunkáját foglaltam össze. A taglalt vizsgálatok célja a következő volt:

- Spermamélyhűtési eljárások fejlesztése tokalakúakban, pontyban és lazacfélékben.
- A mélyhűtött halsperma felolvasztás utáni minőségi paramétereinek vizsgálata, beleértve a sperma motilitását, életképességét (tokalakúakban) és termékenyítő képességét.
- Pontyban a mélyhűtött spermával termékenyített ikratételekből kikelő ivadék torzulásainak, illetve a torz fejlődésű ivadék ploidiájának vizsgálata.
- A kifejlesztett spermamélyhűtési eljárások alkalmazása a haltenyésztés gyakorlatában.

2. Anyag és Módszer

Az értekezésben ismertetett vizsgálatokat halfajok különböző csoportjaiban végeztem el. Ezek közé tartoznak a tokalakúak, pontyfélék és lazacfélék. A logikai sorrend miatt a vizsgálatokat a különböző rendszertani csoportok szerint ismertetem. Mivel a vizsgálatok egy részében a keltetőházi személyzet, illetve kollégáim, hallgatóim segítségét vettem igénybe, a szövegben szándékoltan keverten használom a többes szám első személyi és az egyes szám első személyi fogalmazást. Ennek használata minden esetben attól függ, hogy a munka meghatározó részét egyedül, vagy csapatban végeztem.

2.1 Vizsgálati módszertan

A sperma minőségének vizsgálatához a motilitást (mozgó sejtek százalékos arányát) becsléssel vagy számítógépes spermavizsgálattal (CASA) határoztam meg. A spermiumok életképességét Sybr-14 – propídium-jodid (PI) kettős fluoreszcens élő-halott festéssel és áramlási citometriával határoztam meg. A sperma sűrűségét 100× vagy 1000× nagyításon Bürker-típusú sejtszámláló kamra segítségével állapítottam meg.

A sperma mélyhűtéséhez 0,5 ml-es vagy 5 ml-es műszalmákat használtam. A spermaszuspenzióval megtöltött műszalmákat egy cseppfolyós nitrogénnel töltött polisztirol dobozban mélyhűtöttem. A műszalmákat egy 3 cm magas polisztirol keretre helyeztem, ami a cseppfolyós nitrogén felszínén úszott, majd a megfelelő hűtési idő elteltével a mintákat közvetlenül a cseppfolyós nitrogénbe eresztettem. A mintákat minden esetben 40°C-os vízfürdőben olvasztottam fel. A felolvasztott minták motilitását a fent említett módon határoztam meg, illetve azokkal termékenyítési vizsgálatokat is végeztem.

A ponty esetében a kikelt ivadék ploidiájának meghatározásához 0,05% kolhicines kezelést követően a szabadembriókat 0,075 M KCl-oldatban hipotonizáltam, majd rögzítettem. Ecetsavas szuszpendálás után az ivadékokat tárgylemezre cseppentettem, Giemsa-festékekkel festettem és a kromoszómákat 1000× nagyításon számoltam meg.

2.2 Vizsgálatok tokalakúakban

A tokalakúakkal kapcsolatos kísérleteket az Amerikai Egyesült Államokban végeztem a 2003-2005 közti időszakban. Az egyes fajokkal különböző helyszíneken végeztem a vizsgálataimat:

- Rövidorrú tok (*Acipenser brevirostrum* Lesueur, 1818) – Bears Bluff National Fish Hatchery, 7030 Bears Bluff Rd, Wadmalaw Island, South Carolina 29487
- Sápadt tok (*Scaphirhynchus albus* Forbes & Richardson, 1905) – Natchitoches National Fish Hatchery, 615 South Dr, Natchitoches, Louisiana 71457
- Ásóorrú tok (*Scaphirhynchus platorhynchus* Rafinesque, 1820) – Natchitoches National Fish Hatchery, 615 South Dr, Natchitoches, Louisiana 71457
- Lapátorrú tok (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792) – Aquaculture Research Center, Kentucky State University, 103 Athletic Road, Frankfort, Kentucky 40601

Az analitikai vizsgálatok egy részét a Louisianai Állami Egyetem Akvakultúra Kutatóállomásán (Aquaculture Research Station, Louisiana State University, 2410 Ben Hur Rd. Baton Rouge, LA 70820) végeztem.

2.2.1 Az egyes tokalakú fajokban végzett vizsgálatok

2.2.1.1 Rövidorrú tok fajban végzett vizsgálatok

1. A védőanyag fajtájának és koncentrációjának hatása a mélyhűtött sperma motilitására, termékenyítő- és életképességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Védőanyagok: metanol vagy DMSO;

1.1.2. Védőanyag-koncentrációk: 5, 10 vagy 15%;

1.1.3. Termékenyítéshez használt sperma mennyisége: 1 műszalma vagy fél műszalma.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás (%);

1.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejtes embriókban (%);

1.2.3. Termékenyülési arány gerinchúros embriókban (%);

1.2.4. Kikelt ivadékok aránya (%);

1.2.5. Életképes spermiumok aránya (%).

2. Különböző hígítók hatása a mélyhűtött sperma motilitására, termékenyítő- és életképességére.

2.1. Kísérleti tényezők:

2.1.1. Hígítók: mT, oT és mHBSS;

2.1.2. Védőanyag-koncentrációk (csak metanol): 5, 10, 15%.

2.2. Végpontok:

2.2.1. Felolvasztás utáni motilitás (%);

2.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejtes embriókban (%);

2.2.3. Kikelt ivadékok aránya (%);

2.2.4. Életképes spermiumok aránya (%).

2.2.1.2 Sápadt tok fajban végzett vizsgálatok

1. Kétféle hígító és védőanyag-koncentráció hatása a mélyhűtött sperma motilitására, termékenyítő- és életképességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Hígítók: mT, mHBSS;

1.1.2. Védőanyag-koncentrációk (csak metanol): 5 és 10%.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás (%);

1.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejtes embriókban (%);

1.2.3. Termékenyülési arány szívveréses embriókban (%);

1.2.4. Életképes spermiumok aránya (%).

2.2.1.3 Lapátorrú tok fajban végzett vizsgálatok

1. Kétféle hígító és védőanyag hatásának vizsgálata a mélyhűtött lapátorrútok-sperma felolvasztás utáni motilitására, termékenyítő- és életképességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Hígítók: mT, mHBSS;

- 1.1.2. Védőanyagok: metanol és DMSO;
- 1.1.3. Védőanyag-koncentrációk: 5 és 10%.
- 1.2. Végpontok:
 - 1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás;
 - 1.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;
 - 1.2.3. Életképes spermiumok aránya.
- 2. A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek termékenyülése és kelése közötti különbségek vizsgálata.
 - 2.1. Kísérleti tényezők:
 - 2.1.1. Különböző tejes egyedek.
 - 2.2. Végpontok:
 - 2.2.1. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;
 - 2.2.2. Kelési arány.
- 3. A védőanyag-koncentráció hatása a mélyhűtött lapátorrútok-sperma termékenyítő képességére.
 - 3.1. Kísérleti tényezők:
 - 3.1.1. Védőanyag-koncentrációk: 5 és 10%.
 - 3.2. Végpontok:
 - 3.2.1. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;
 - 3.2.2. Kelési arány.
- 4. A védőanyag-koncentráció és a hűtési idő hatása az 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött lapátorrútok-sperma termékenyítő képességére.
 - 4.1. Kísérleti tényezők:
 - 4.1.1. Védőanyag-koncentrációk: 5 és 10%;
 - 4.1.2. Hűtési idők (5 és 7 perc).
 - 4.2. Végpontok:
 - 4.2.1. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;
 - 4.2.2. Kelési arány.

2.3 Vizsgálatok ponty fajban

2.3.1 A kísérleti állományok származása

A pontyfélék közül a vizsgálataimat kizárólag ponty (*Cyprinus carpio* Linnæus, 1758) fajban végeztem. A vizsgálatokat a Haltermelők Országos Szövetsége (jelenleg: Magyar Akvakultúra és Halászati Szakmaközi Szervezet) Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdaságában, illetve a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén végeztem.

2.3.2 A ponty fajban végzett vizsgálatok részletes ismertetése

- 1. A hűtési idő hatása az 1,2 illetve 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött pontysperma termékenyítő képességére.
 - 1.1. Kísérleti tényezők:
 - 1.1.1. Hűtési idők:
 - 1.1.1.1. 1,2 ml-es műszalmánál: 3, 4, 5 és 6 perc;
 - 1.1.1.2. 5 ml-es műszalmánál: 3, 5, 7 és 9 perc.
 - 1.2. Végpontok:
 - 1.2.1. Kelő ivadék százalékos aránya.

2. A sperma-ikra arány hatása az 1,2 és 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött pontysperma termékenyítő képességére, illetve az ivadékkori torzulásokra.

2.1. Kísérleti tényezők:

2.1.1. Különböző térfogatú műszalmák: 1,2 ml és 5 ml;

2.1.2. Különböző ikratételek:

2.1.2.1. 1,2 ml-es műszalmánál: 10, 20 és 30 g;

2.1.2.2. 5 ml-es műszalmánál: 40, 80 és 120 g.

2.2. Végpontok:

2.2.1. Kelő ivadékok százalékos aránya;

2.2.2. Torz felődésű ivadékok százalékos aránya;

2.2.3. A torz fejlődésű ivadékok ploidiája.

2.4 Vizsgálatok lazacfélékben

A lazacfélékben végzett vizsgálataimat a tokfélékhez hasonlóan különböző helyszíneken végeztem a 2009-2014 közötti időszakban. Az egyes fajokkal végzett vizsgálatok helyszínei a következők voltak:

- Sebes pisztráng (*Salmo trutta morpha fario* Linnæus, 1758) – Hoitsy & Rieger Kft., Lillafüredi Pisztrángtelep, 3517 Miskolc-Lillafüred, Erzsébet sétány 55.

- Márványpisztráng (*Salmo marmoratus* Cuvier, 1829) – Tolmini Horgászegyesület, Trg 1. maja 7, 5220 Tolmin, Szlovénia.

- Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) – INRA Fish Physiology and Genomics, Bat 16A, Campus de Beaulieu, F-35000 Rennes, Franciaország.

- Pénzes pér (*Thymallus thymallus* Linnæus, 1758) – Tolmini Horgászegyesület, Trg 1. maja 7, 5220 Tolmin, Szlovénia.

A számítógépes spermavizsgálatok egy részét a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén végeztem Gödöllőn.

2.4.1 Az egyes lazacféle fajokban végzett kísérletek

2.4.1.1 Sebes pisztrángban végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás hatása a mélyhűtött sperma motilitására és termékenyítő képességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 10 és 60 perc.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás;

1.2.2. Szempontos ikra százalékos aránya.

2.4.1.2 Márványpisztrángban végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás és kétféle védőanyag hatása a mélyhűtött sperma motilitására és termékenyítő képességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 10 és 60 perc;

1.1.2. Védőanyagok: metanol és DMSO.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás;

1.2.2. Szempontos ikra százalékos aránya;

1.2.3. Kikelt ivadék százalékos aránya.

2.4.1.3 Szivárványos pisztrángban végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás és kétféle védőanyag hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére.
 - 1.1. Kísérleti tényezők:
 - 1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 10 és 60 perc;
 - 1.1.2. Védőanyagok: metanol és DMSO.
 - 1.2. Végpontok:
 - 1.2.1. Szempontos ikra százalékos aránya;
 - 1.2.2. Kikelt ivadék százalékos aránya.

2.4.1.4 Pénzes pérben végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére.
 - 1.1. Kísérleti tényezők:
 - 1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 2, 5, 10, 30, 60 és 120 perc.
 - 1.2. Végpontok:
 - 1.2.1. Szempontos ikra százalékos aránya;
 - 1.2.2. Kikelt ivadékok százalékos aránya.
2. A sperma-ikra arány hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére.
 - 2.1. Kísérleti tényezők:
 - 2.1.1. Sperma-ikra arányok: 5×10^4 , 10^4 , 5×10^3 és 10^3 .
 - 2.2. Végpontok:
 - 2.2.1. Szempontos ikra százalékos aránya;
 - 2.2.2. Kikelt ivadékok százalékos aránya.

2.5 A kidolgozott módszerek alkalmazása a gyakorlatban

2.5.1 A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása

A ponty fajban kidolgozott módszertant a Haltenyésztési és Öntözési Kutató Intézet HAKI, mai jogutódja a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Halászati Kutatóintézet – NAIK-HAKI) hasznosította 2005-2007-ben a ponty mélyhűtött génbankjának létrehozásához. A HAKI által kezdeményezett munkát két időszakban hajtottuk végre, 2005. május 18 – június 29. között, illetve 2007. április 20-24. között. A 2005-ben végrehajtott munkát teljes egészében a HAKI szarvasi telephelyén, míg a 2007-ben elvégzett munkát a HAKI telephelyén, illetve a Magyar Országos Horgász Szövetség (MOHOSZ) kajászói tógazdaságában végeztük.

2.5.2 A lazacfélékben kidolgozott módszerek alkalmazása

A lazacfélékben kidolgozott módszereket jelenleg a szlovéniai Tolmin városában működő Tolmini Horgászegyesület, illetve az annak tulajdonában lévő Faronika d.o.o. cég alkalmazza. A spermamélyhűtést az általuk gondozott két faj, a márványpisztráng és a pénzes pér tenyésztőmunkája során használják az általam vezetett kutatócsoport aktív közreműködésével. Mindkét faj esetében a vadon élő populációk egyedeit használjuk.

3. Eredmények és értékelésük

3.1 A tokalakúakban kapott eredmények

3.1.1 A rövidorrú tok fajban kapott eredmények

A védőanyag fajtájának és koncentrációjának hatásait vizsgáló kísérletben a legmagasabb felolvasztás utáni motilitás $26 \pm 13\%$ volt, amit 5% DMSO védőanyag használatával értünk el. A kapott felolvasztás utáni motilitás eredmények statisztikai értékelése során azt tapasztaltuk, hogy a védőanyag típusa nem, ugyanakkor a koncentrációja szignifikáns hatást ($P = 0,0027$) gyakorolt az eredményekre.

A sperma-ikra aránynak nem volt szignifikáns hatása a termékenyülési és kelési eredményekre. A legmagasabb termékenyülési arány 4-8 sejtes stádiumban $40 \pm 15\%$, gerinchúros stádiumban $35 \pm 17\%$, illetve a legmagasabb kelési arány $31 \pm 15\%$ volt, mindhárom eredményt 5% metanol védőanyag használatakor kaptuk. A sejtek mért életképesség-értékei között nem találtunk szignifikáns különbséget, egyedül a 15% DMSO védőanyag használata eredményezett kevesebb ép membránnal rendelkező sejtet.

A különböző hígítók hatását összefoglaló kísérletben a legmagasabb felolvasztás utáni motilitást mT ($18 \pm 10\%$) és oT ($12 \pm 6\%$) hígítók és 5% metanol használata mellett figyeltük meg. A legmagasabb termékenyülési és kelési eredményeket mT ($18 \pm 11\%$ termékenyülés és $17 \pm 12\%$ kelés), illetve mHBSS ($12 \pm 10\%$ termékenyülés és $11 \pm 12\%$ kelés) hígító és 5% metanol védőanyag használata mellett értük el. A sejtek életképessége általánosságban az mT hígító használata mellett volt a legalacsonyabb.

Összehasonlítottuk továbbá az oT és mT hígítók, a DMSO és metanol védőanyagok és az utóbbiak különböző koncentrációinak (5, 10 és 15%) hatását az így létrehozott hűtőmediumok ozmolalítására. Az eredményekből kiderült, hogy az oT hígító ozmolalítása (204 ± 8 mOsm/kg) szignifikánsan magasabb volt, mint az mT hígítóé (73 ± 9 mOsm/kg), illetve az is, hogy a DMSO védőanyag hozzáadása mindkét hígító esetében statisztikailag igazolható és koncentráció-függő módon növelte a mért ozmolalítás értékét, míg a metanol védőanyag használata nem változtatta meg az oldat ozmolalítását.

3.1.2 A sápadt tok fajban kapott eredmények

A sápadt tok mélyhűtött spermája mT hígító és 10% metanol védőanyag használata mellett mutatta a legmagasabb felolvasztás utáni motilitást ($70 \pm 10\%$) és életképességét, illetve ugyanezen hígító és 5% metanol kombinációjával eredményezte a legmagasabb termékenyülést ($88 \pm 6\%$ 4-sejtes stádiumban és $73 \pm 14\%$ szívveréses stádiumban).

3.1.3 A lapátorrú tok fajban kapott eredmények

A kétféle hígító és védőanyag hatását vizsgáló kísérletben a legmagasabb felolvasztás utáni motilitás ($85 \pm 2\%$) és termékenyülési ($80 \pm 3\%$) eredményeket mT hígító és 10% metanol védőanyag használata mellett érték el, azonban a legmagasabb életképességet ($59 \pm 2\%$) mHBSS és 5% DMSO használata eredményezte.

A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek termékenyülését és kelését vizsgáló kísérletsorozatban a három tejes egyed felolvasztott spermájával kapott eredményeket külön vizsgáltuk. A legmagasabb termékenyülési ($84 \pm 9\%$) és kelési arányt ($79 \pm 5\%$) az 1. számú tejes egyed esetében figyeltük meg.

A védőanyag-koncentrációk hatását vizsgáló kísérletben a legmagasabb termékenyülési ($69 \pm 14\%$) és kelési arányt ($33 \pm 13\%$) 5% metanol védőanyag alkalmazása mellett figyeltük meg.

Az 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött lapátorrútok-sperma termékenyítő képességét vizsgáló kísérletben a legmagasabb termékenyülést ($48 \pm 5\%$) és kelést ($47 \pm 11\%$) 5% metanol és 5 perc hűtési idő használatával érték el. Általánosságban az 5 perc hűtési idő magasabb termékenyülést eredményezett ($P < 0,03$), mint a 7 perc. Hasonló módon, az alacsonyabb metanol-koncentráció használatával is magasabb termékenyülést érték el ($P < 0,004$), mint a magasabb koncentrációéval.

3.1.4 A tokalakuakban kapott eredmények értékelése

A tokalakúakban kapott eredmények azt mutatták, hogy a metanol védőanyag használata magasabb felolvasztás utáni termékenyítő képességet eredményezett, mint a DMSO védőanyag. A felolvasztás utáni motilitás eredményei között ugyanakkor nem volt megfigyelhető hasonló kiugró különbség, különösen alacsony (5%) védőanyag-koncentráció mellett.

A védőanyagok hatékonysága függött a koncentrációjuktól is. Mindhárom vizsgált halfajban az alacsonyabb koncentrációjú védőanyagok általában magasabb felolvasztás utáni motilitást és termékenyülést eredményeztek. A magasabb koncentrációk (10 és 15%) esetében tapasztalt alacsonyabb termékenyülési eredmények azt jelzik, hogy ezek még metanol védőanyag esetében is toxikusak a sejtekre nézve. Ez alól csak a lapátorrú tokban végzett első kísérlet eredményei képeznek kivételt, azonban a későbbi kísérleteink ebben a fajban is igazolták a fenti hipotézist.

Az eredmények alapján a különböző hígítók is hatást gyakorolnak a mélyhűtött tok sperma termékenyítő képességére. A rövidorrú tok esetében az oT hígító használata szignifikánsan alacsonyabb termékenyülést eredményezett, mint az mT, illetve mHBSS hígítók használata. A sápadt tok és a lapátorrú tok esetében szintén az mT hígító bizonyult hatásosabbnak, mint az alternatívaként használt mHBSS hígító.

A rövidorrú tok fajban kapott eredmények késztettek arra, hogy megmérjem az egyes hígítók ozmolalitását különböző védőanyagok és védőanyag-koncentrációk jelenlétében. Az eredmények azt mutatták, hogy azok a kombinációk, amelyek esetében a tokfélék szeminális plazmájának fiziológiás ozmolalitásánál magasabb értéket mutattak, gyengébb termékenyülést és kelést eredményeztek. A DMSO védőanyag használata jelentős mértékben növelte a hűtőmedium ozmolalitását, függetlenül a használt hígítótól, míg a metanol védőanyag használata nem gyakorolt rá szignifikáns hatást.

A spermiumok életképessége fajoként eltérő volt és általánosságban megegyezett azzal a trenddel, amely szerint a rövidorrú tok spermája gyengébb minőségű volt, mint a másik két vizsgált fajé. Az egyes vizsgálati tényezők (motilitás, termékenyítő képesség) közötti finomabb

összefüggések kimutatására ugyanakkor nem bizonyult alkalmasnak, sőt, több esetben nyilvánvalóan hibás értékeket eredményezett, pl. azokban az esetekben, amikor a sperma felolvasztás utáni motilitása látszólag magasabb volt, mint az ép sejtmembránnal rendelkező sejtek aránya. Ennek okai elsősorban módszertani hibák lehettek, amik a kísérletek körültekintőbb végrehajtásával kiküszöbölhetők.

A lapátorrú tokban kapott további eredményeink megalapozzák egy üzemi méretű mélyhűtési módszertan kialakítását. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a lapátorrú tok spermája mind 0,5 ml-es, mind 5 ml-es műszalmákban mélyhűtve alkalmas nagyobb mennyiségű ikra sikeres megtermékenyítésére. A 0,5 ml-es műszalmákban kapott eredmények azt mutatják, hogy a termékenyülés sikere elsősorban a vizsgálatokhoz használt hím egyed spermájának minőségétől függ.

3.2 A ponty fajban végzett kísérletek eredményei

Az 1,2 ml-es műszalmák használatakor a hűtési időnek nem volt szignifikáns hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére. A legmagasabb kelési arányt ($69 \pm 16\%$) 4 perces hűtés után figyeltük meg, azonban statisztikailag igazolható különbséget nem találtunk az egyes kezelt csoportok között. Az 5 ml-es műszalmák esetében a hűtési idő szignifikáns hatást gyakorolt a kelési eredményekre ($P = 0,0175$). A legmagasabb kelés ebben az esetben $39 \pm 27\%$ volt és 5 perces hűtési idő mellett kaptuk.

Az 1,2 ml-es műszalmák használatakor a legmagasabb kelési arányt ($86 \pm 12\%$) 10 g ikra termékenyítésekor, azaz a legmagasabb, $1,775 \times 10^6 : 1$ sperma-ikra aránnyal értük el, azonban a különböző ikratételek termékenyítésekor kapott kelési eredmények között szignifikáns különbséget nem kaptunk. Az 5 ml-es műszalmákkal a legmagasabb kelési arány $65 \pm 18\%$ volt, amit 80 g ikra termékenyítésekor ($8,875 \times 10^5 : 1$ sperma-ikra arány) figyeltünk meg, azonban statisztikailag szignifikáns különbség csak a 80 g és a 120 g ikra termékenyítésekor kapott eredmények között volt.

Meglepő módon a legtöbb torz fejlődésű szabadembriót ($15 \pm 9\%$) a kontroll csoportban kaptuk, míg a mélyhűtött spermával termékenyített csoportok közül a legmagasabb embrionális torzulást ($13 \pm 7\%$) 80 g ikra 5 ml-es műszalmában hűtött spermával végzett termékenyítésekor kaptuk. A embrionális torzulások a következőkben nyilvánultak meg: gerinctorzulások, behajlott vagy hiányzó farok, pigmenthiány, a feji szervek (pl. szemek) vagy az egész fej hiánya.

A kromoszómavizsgálatokat 268 frissen kelt szabadembrión végeztük el. A legtöbb torz szabadembrió diploid volt mindegyik vizsgálati csoportban. Haploid egyedeket mindegyik mélyhűtött spermával termékenyített csoportban találtunk, kivéve az 1,2 ml-es műszalmával termékenyített 10 g-os és 40 g-os ikratételeket, illetve az 5 ml-es műszalmával termékenyített 120 g-os ikratételeket, mivel ez utóbbiban nem is találtuk torz fejlődésű ivadékot. A haploid egyedek aránya a torz fejlődésű lárvákban belül igen alacsony volt, 2-6% között változott.

3.2.1 A ponty fajban kapott eredmények értékelése

A lapátorrú tokhoz hasonlóan, a ponty mélyhűtött spermájával kapott eredményeink azt mutatják, hogy mindkét műszalma-típus (1,2 ml és 5 ml) alkalmas a pontysperma mélyhűtésre és az azzal végzett termékenyítésre. Az említett műszalma-típusok kevésbé elterjedtek, mint a 0,25 és 0,5 ml-esek, azonban a halak esetében használatuknak van létjogosultsága, mivel a legtöbb halfaj nagy mennyiségű spermát termel és azzal nagy mennyiségű ikrát is kell megtermékenyíteni.

Vizsgálataink alapján a pontyban az ivadékkori torzulást nem lehet a mélyhűtött sperma alkalmazásának a számlájára írni, mivel torz ivadékokat a legmagasabb arányban a kontroll csoportban figyeltünk meg. A ponty esetében az ivadékkori torzulás valószínűsíthetően elsősorban az ikra kiindulási minőségétől (a kísérleteket az ívási időszak végén, június hónapban végeztük) és a keltetés során fellépő oxigénhiánytól eredeztethető, és a mélyhűtés esetleges hatását a fent említett tényezők nem tették kimutathatóvá.

Az ivadékkori torzulások arányától függetlenül, haploid egyedeket csak a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kikelt csoportokban találtunk. A kontroll csoportban nem találtunk haploid ivadékokat függetlenül attól, hogy a torz fejlődésű vagy ép szabadembriókat vizsgáltuk. Az, hogy a kísérletünkben nem találtunk haploid egyedeket a kontroll csoportban, arra utal, hogy a haploidia a mélyhűtött spermával végzett termékenyítés eredménye. Feltételezésünk szerint a ponty spermiumaiban a mélyhűtés (fagyasztás és felolvasztás) reaktív szabadgyökök képződését indukálta, ami több sejtben az örökítőanyagot teljes mértékben inaktíválta. Az ilyen spermiumok képesek voltak ugyan megtermékenyíteni az ikraszemeket, azonban a fejlődő embrióhoz genommal nem járultak hozzá. Eredményeink ugyanakkor azt is bizonyítják, hogy a pontyban – még akkor is, ha lehetséges – az ilyen jellegű haploidia előfordulásának az esélye jelentéktelen és az ivadékkori torzulás nem írható a mélyhűtés számlájára.

3.3 A lazacfélékben végzett vizsgálatok eredményei

3.3.1 A sebes pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

A felolvasztás utáni tárolást vizsgáló kísérletünkben a sebes pisztráng mélyhűtött spermájának a felolvasztás utáni motilitása $55 \pm 21\%$ volt közvetlenül a felolvasztás után, $56 \pm 15\%$ 10 perc és $53 \pm 12\%$ 60 perc tárolás után. A friss sperma motilitása $88 \pm 7\%$ volt. A különböző tárolási időpontokban megfigyelt motilitás értékek között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget. A termékenyülési eredmények tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes kezelések között, illetve a kezelések és a kontroll között. Az értékek $29 \pm 14\%$ (felolvasztás utáni azonnali termékenyítés esetében) és $45 \pm 22\%$ (60 perc felolvasztás utáni tárolást követő termékenyítés esetében) között ingadoztak.

3.3.2 A márványpisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

A márványpisztráng esetében a metanol védőanyag minden esetben jobb eredményeket adott, mint a DMSO. A felolvasztás utáni tárolás ideje szintén szignifikáns hatást gyakorolt a szempontos, illetve kikelt ikra százalékos arányára ($P < 0,0001$ mindkét esetben). A legmagasabb termékenyülést (szempontos ikra százalékos aránya), illetve kelést ($60 \pm 15\%$, illetve $55 \pm 13\%$) a felolvasztást követő azonnali termékenyítés esetében kaptuk metanol védőanyag használata mellett, azonban nem találtunk szignifikáns különbséget az azonnali és a 10 perc tárolást követő termékenyítéskor kapott eredmények között.

3.3.3 A szivárványos pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

A szivárványos pisztráng esetében a DMSO védőanyag használata gyenge termékenyülést eredményezett, a szempontos ikra százalékos aránya $17 \pm 10\%$ és $2 \pm 1\%$ között, a kelési arány pedig $16 \pm 9\%$ és $1 \pm 1\%$ között változott. Metanol védőanyag használata mellett jelentősen magasabb termékenyülést értünk el, a szempontos ikra aránya

$45 \pm 5\%$ – $32 \pm 4\%$, a kelés pedig $41 \pm 5\%$ – $30 \pm 4\%$ volt. A DMSO védőanyag használata esetében a termékenyülési mutatók a tárolási idő függvényében csökkentek, míg a metanol használatakor nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes tárolási időknél kapott eredmények között.

3.3.4 A pénzes pérben végzett vizsgálatok eredményei

A felolvasztás utáni tárolás hatását vizsgáló kísérletben a termékenyülési mutatókban nem jelentkezett szignifikáns különbség egészen a felolvasztás utáni 60. percig. A szempontos ikra aránya $60 \pm 2\%$ volt a felolvasztás utáni azonnali termékenyítéskor és $59 \pm 2\%$ volt 60 perc tárolást követően. A kelés ugyanezekben az időpontokban $47 \pm 3\%$ és $46 \pm 2\%$ volt.

A sperma-ikra arányt vizsgáló kísérletünkben a sperma-ikra arány szignifikáns hatást gyakorolt mind a szempontos ikra százalékos arányára, mind a kelési arányra ($P < 0,0001$ mindkét paraméter esetében). A legmagasabb arányú szempontos ikrát ($60 \pm 8\%$), illetve kelést ($53 \pm 7\%$) a legmagasabb, 5×10^4 spermium/ikraszem sperma-ikra arány esetében kaptuk. Ez az eredmény nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoportban elért eredményektől ($68 \pm 3\%$ szempontos ikra és $55 \pm 3\%$ kelés). Sikeres ikrakelést tapasztaltunk azonban még a legalacsonyabb sperma-ikra arány mellett termékenyített ikratételekben is (10^3 spermium/ikraszem, $5 \pm 3\%$ szempontos ikra és $4 \pm 2\%$ kelés).

3.3.5 A lazacfélékben kapott eredmények értékelése

Vizsgálataink során a metanol egyértelműen hatékonyabb védőanyagnak bizonyult a DMSO-nál, amit a kapott motilitási, termékenyülési és kelési eredmények is bizonyítanak. A metanol védőanyag hatékonyságát már a tokalakúakban végzett kísérletek tárgyalásakor részletesen ismertettem, ezért itt nem térek rá ki külön. Fontos ugyanakkor a két védőanyag kölcsönhatásának tárgyalása a sperma felolvasztás utáni tárolásának függvényében.

Eredményeink azt mutatták, hogy a lazacfélék spermája a felolvasztást követően legalább 10 percig (a szivárványos és márványpisztrángban), de akár egy óráig is (a sebes pisztrángban és a pénzes pérben) megőrzi a termékenyítő képességét. Eredményeinkből az is kiderül, hogy ez a tárolhatóság nem csak a fajtól, hanem a használt védőanyagtól is függ, azaz a fent leírt tárolhatóság csak metanol védőanyag használata mellett valósult meg. A korábbi szakirodalmi források lazacfélékben a felolvasztott sperma azonnali felhasználása mellett érveltek, sőt a közölt eredmények azt mutatták, hogy már 30 másodperces tárolás is szignifikánsan csökkentette a sperma termékenyítő képességét. Saját eredményeink alapján kijelenthető, hogy a lazacfélék spermája a felolvasztás után biztonsággal tárolható legalább 10 percig (illetve egyes fajokban 60 percig) és felhasználható termékenyítésre.

Az általunk tanulmányozott lazacfélék közül a pénzes pér spermája bizonyult a legellenállóbbnak a mélyhűtés káros hatásaival szemben. Ez nem csak abban mutatkozott meg, hogy azonos mélyhűtési módszertan mellett ebben a fajban tapasztaltuk a legmagasabb termékenyülési arányokat, hanem abban is, hogy az extrém alacsony sperma-ikra arány ($10^3 : 1$) használata mellett is találtunk termékenyült ikrát, amelyekből egészséges ivadék kelt ki.

A pénzes pérben termékenyítéshez használt mélyhűtött sperma abszolút térfogata is igen alacsony volt. Így például az $5 \times 10^4 : 1$ sperma-ikra arány esetében a termékenyítéshez felhasznált sperma tényleges mennyisége $22 \pm 12 \mu\text{l}$ volt. Ez azt jelenti, hogy egy műszalma tartalma ($500 \mu\text{l}$) 1100 g ikra megtermékenyítéséhez elegendő a termékenyülés hatékonyságának megőrzése mellett. Figyelembe véve az ebben a fajban ikrásonként átlagosan lefejthető ikra mennyiségét ($100\text{-}150 \text{ g}$), a kereskedelmi forgalomban kapható $0,5 \text{ ml}$ -es

műszalmák jól használhatók az üzemi szintű mélyhűtésre és nincs szükség ennél nagyobb térfogatú eszközök alkalmazására.

3.4 A kidolgozott módszerek gyakorlati alkalmazásának eredményei

3.4.1 A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása

A 2005-ben végzett munka során tervezett 180 egyeddel szemben 187 egyed spermáját hűtöttük le. A tervezett fajtákból 8 hazai és 2 külföldi fajta esetében sikerült lehűteni a megállapodásban rögzített 10 egyed spermáját, sőt az amuri fajta esetében 4 egyeddel túl is teljesítettük azt. Hét hazai és egy külföldi fajta esetében nem sikerült lehűteni a tervezett 10 egyed spermáját, sőt a dinnyési fajta esetében mindössze egy egyedről kaptunk spermát. Ezeken kívül azonban, lehűtöttük a megállapodásban nem szereplő 2 hazai és 5 külföldi fajta különböző egyedeinek spermáját, amelyek közül a poljanai fajta esetében eltároltuk az előírásos 10 egyed mintáit. A minták visszaellenőrzése során a felolvasztott 50 mintából 46 műszalmában találtunk mozgó spermiumokat.

A 2007-ben végzett munka során mind a 25 tervezett egyedről hűtöttünk le spermamintákat. Az egyik egyedről nem sikerült (19. számú, Dunai vadponty fajta) 40 db műszalmányi spermát lehűteni, ebben az esetben csak 38 szalmát tudtunk eltenni.

3.4.2 A lazacfélékben kidolgozott módszerek alkalmazása

A genetikai vizsgálatok eredményei alapján 2009-ben 15-ből 3, 2010-ben 19-ből 4, 2011-ben pedig 25-ből 5 egyedeket választottak ki a Tolmini Horgászegyesület munkatársai felhasználásra. Ezeket 2009-ben egy, 2010-ben kettő és 2011-ben négy keltetőházi szaporításban használták fel. A termékenyülési eredmények szempontos stádiumban 27,4% és 91,3% között, míg a kelési eredmények 25,4% és 82,3% között váltakoztak. Az egymást követő három évben összesen 21 467 ivadékot állítottak elő mélyhűtött spermából az egyesület munkatársai.

A márványpisztráng esetében a Huda Grapa-patakban élő állomány hímjeinek spermáját gyűjtjük be minden év novemberében és mélyhűtjük a kidolgozott módszertannal. A mélyhűtött spermát a Tolmini Horgászegyesület munkatársai használják fel a szaporítási időszakban a tenyészállományukban található és a Huda Grapa-patakból származó (azaz populáció-azonos) ikrások ivartermékének megtermékenyítésére. A szempontos stádiumú ikrát mesterséges fészkekbe helyezik ki előre kiválasztott patakokban (pl. a Bača folyó forráshoz közeli izolált szakaszain), ahol a kikelő ivadékok új populációkat hoznak létre.

3.4.3 A kidolgozott módszerek gyakorlati alkalmazásának értékelése

A NAIK Halászati Kutatóintézetében (HAKI) létrehozott és a mai napig fenntartott mélyhűtött pontysperma-génbank Magyarországon egyedülálló. Azt is fontos kiemelni, hogy a HAKI génbankjában eltárolt minták egyrészt az élő génbank kiegészítéseként működnek, másrészt lehetővé teszik, hogy egyes fajtákat visszakeresztezzünk önmagukkal, hogy elkerüljük a beltenyésztéses leromlást.

A felolvasztott spermaminták nagy részében találtunk mozgó sejteket, ennek megfelelően a génbankban eltárolt minták lehetővé teszik a sikeres termékenyítést. Ennek próbájára 2013-ban került sor, amikor a Szarvasi P22 fajta szaporításakor használtak fel a mélyhűtött spermamintákból és a kikelt ivadékokat tenyészállomány-jelöltként nevelték fel.

A lazacfélékben kidolgozott módszer gyakorlati alkalmazása a mélyhűtött halsperma alternatív felhasználási területét jelenti. Ezekben a fajokban a génbanki munka a fajmegőrzési célú haltenyésztést egészíti ki. A Tolmini Horgászegyesület élen jár két helyi jelentőségű NATURA 2000-es faj (illetve változat) megőrzésében. Mindkét populáció esetében súlyos következményekkel járt a XX. század során végrehajtott haltelepítés. A Soča (Isonzo) folyó és vízrendszere az Adriai-tenger vízgyűjtőjéhez tartozik és halfaunája jelentősen különbözik a dunai (végső soron fekete-tengeri) vízgyűjtőtől. A folyó vízrendszerében több alkalommal telepítettek „fajbővítés” címmel nem őshonos, a dunai vízgyűjtőtől származó fajokat. Ezek közül a sebes pisztráng a márványpisztránggal képezett hibrideket, a pénzes pér pedig az adriai pénzes pérrel, ami ugyan fajazonos, azonban genetikailag és fenotípusosan is jelentősen elkülönült populációt alkotott.

A Tolmini Horgászegyesület felismerve ezt a problémát, akciótervet dolgozott ki a két faj genetikai tartalékainak megőrzésére. A márványpisztráng esetében tenyészállományokat hoztak létre a 7 megmaradt fajtisza populációból a halgazdaságukban. E mellett a populációk „másolatait” hozták létre ún. menedékpatatokban, ahova a fajtisza populációk szempontos ikráját helyezik ki mesterséges fészkekbe. Így új populációkat hoznak létre, amelyek később magukban rejtik az önálló genetikai fejlődés és a faj diverzifikációjának lehetőségét. A pénzes pér esetében a céljuk az, hogy molekuláris markerek segítségével felmérjék a populáció genetikai helyzetét és az őshonos adriai genotípus arányát. Ez után irányított szelekcióval – a magasabb arányban adriai genotípust hordozó egyedek felhasználásával – egy új tenyészállományt hoznak létre, amelynek utódait telepíthetik a helyi folyókba. Ebbe a munkába tudtunk mi bekapcsolódni az említett fajok spermájának mélyhűtésével.

A Sočában és vízrendszerében élő lazacfélék esetében a mélyhűtés egy viszonylag rövid időszak (1-2 hónap) áthidalására szolgál. A pénzes pér esetében a genetikai vizsgálatok hossza határozza meg azt az időszakot, amit a spermának mélyhűtött állapotban kell töltenie. A szaporodási időszakban vadon befogott egyedektől kinyert sperma folyamatosan, évente biztosítja a gének bevándorlását a tenyészállományba, ugyanakkor a markerekre alapozott szelekció növeli az eredeti adriai genotípus hányadát az állományban. Mivel ezt a munkát 2009 óta folyamatosan végezzük, mára elmondható, hogy az egyesület teljes pénzes pér tenyészállománya vadon élő egyedek mélyhűtött spermájából származik.

A márványpisztráng esetében az egyik legkisebb létszámú, ezért legsérülékenyebb fajtisza állomány, a Huda Grapa-pataokban található populáció hím egyedeivel dolgozunk. Itt a spermamélyhűtés az ivási időszak előtti egy-két hónap áthidalására szolgál. Mivel az egyedeket elektromos halászgéppel kell befogni a pataokban, az ivási időszakban ez tönkretethetné magát az ivást: a párokat elüldöznék a fészkektől és a taposás a fészkeket is megsemmisíthetné. Ezért a hímektől még novemberben vesszük le a spermát, amikor már termelnek elegendő ivarterméket, de az ivást még nem kezdték meg. A később (december-januárban) felhasznált mélyhűtött sperma egy újabb generáció létrehozásában segít, amiből egy menedékpatok populációját alakítják ki a szlovén kollégák.

3.5 Jövőkép

A kidolgozott és a gyakorlati alkalmazásba átkerült módszerek egy hosszú és elmélyült kutatómunka eredményei. Az, hogy sor került valamilyen szintű gyakorlati alkalmazásukra, bizonyítja, hogy van létjogosultságuk és van igény a fejlesztésükre. Azt is látnunk kell azonban, hogy a halak spermamélyhűtésének megvannak a saját korlátai. Nem várható, hogy a haltenyésztésben a sperma mélyhűtése ugyanolyan sikeres üzletgá válik, mint a szarvasmarha-tenyésztésben. A szarvasmarha-tenyésztésben a spermamélyhűtés pontosan akkor érkezett a tenyésztők segítségére, amikor arra a legnagyobb szükség volt. Az 1950-es

években már akkora szelekciós nyomás volt – elsősorban a tejelőmarha-ágazatban – a bikákon, ami jelentősen felértékelte az egyedeket és lehetővé tette az örökítőanyagukkal végzett kereskedelmet. Az egyes nagy tenyésztékű bikák spermájának is önálló értéke lett, a mélyhűtés pedig lehetővé tette, hogy akár kontinensek között is kereskedhessenek vele. A tenyésztett halfajokban a hím tenyészegyedekre nem nehezedik ilyen szelekciós nyomás, az egyes egyedeknek nincs önálló tenyészértékük. Ezen kívül a halszaporításban a sperma ritkán korlátozó tényező – a legtöbb esetben szaporításkor az ikra kinyerése okoz gondot, nem a spermáé. Ez alól természetesen léteznek kivételek, azonban ezek ritkák és nem a legfontosabb tenyésztett halfajokban fordulnak elő.

A haltenyésztésben a spermamélyhűtés üzemi alkalmazása a lazacfélék szaporításában terjedt el leginkább. Több lazactenyésztéssel foglalkozó norvég és izlandi cég állt át a mélyhűtött sperma használatára a keltetőházi gyakorlatban, mivel csak így biztosítható a termékenyítés biztonsága. A mesterséges szaporítást és inszeminálást kiszolgáló nemzetközi cégek között már van olyan, amelyik a pisztráng- és lazacsperma mélyhűtésére is kínál szabványosított hígítókat és komplett hűtőmédiúmokat. Így megállapítható, hogy a sperma mélyhűtése fokozatosan teret nyer az olyan halgazdasági ágazatokban, ahol a piac folyamatos kiszolgálása nélkülözhetlenné teszi az iparszerű tenyésztési rendszereket – és a lazactenyésztés kétségkívül ilyen ágazat.

A halak esetében azonban nem csak a sperma mélyhűtése teszi lehetővé a genetikai tartalékok megőrzését. Az elmúlt évtized kutatási eredményei bizonyították, hogy a halak esetében az ősvarsejtek izolálhatók, majd átültethetők recipiens egyedekbe, amelyek mintegy dajkaként a donor ivarsejtjeit fogják termelni. Ez a technológia valóban új lehetőségeket biztosít a génbanki munkában. A donor egyedekből nem csak a primordiális ivarsejtek, hanem a spermatogóniumok, illetve oogóniumok is átültethetők a recipiens ivarmirigyeibe, ahol azok sikeresen megtapadnak és proliferálódnak. Ennek megfelelően mind frissen kelt ivadékok, mind felnőtt egyedek használhatók donorként. A recipiens egyedek saját ivarsejt-termelése különböző módszerekkel gátolható, pl. triploidizációval vagy antiszensz oligonukleotidok (morpholinók) használatával. A képződő ivarsejtek típusát (spermium vagy ikra) a recipiens ivara határozza meg. Recipiensként használhatók fajazonos egyedek, illetve közeli rokon fajok egyedei is. A donor ivarsejtjei, illetve ivarmirigyei mélyhűthetőek, ahogy azt saját kísérleteink is bizonyítják.

Génbanki használat szempontjából a technológia új lehetőségeket nyújt. Az izolált ivarsejtek vagy ivari szövetek mélyhűtésével lehetővé válik a génbankokban a mélyhűtött sperma kiváltása. Mivel az ősvarsejtek diploidok és mindkét végső ivarsejt-típussá differenciálódhatnak a recipiens ivarától függően, nincs szükség sem a sperma, sem az ikra vagy embriók – mindmáig megoldatlan – mélyhűtésére. Elviekben ez a technológia valóban lehetővé teszi egy faj helyreállítását egyetlen hím egyed spermatogóniumainak felhasználásával. Reményeim szerint tehát az ivari szövetek mélyhűtésének, az ivarsejtek izolációjának és átültetésének komoly szerepe lehet a jövő génbankjaiban.

4. Új tudományos eredmények

1. Kísérletesen bizonyítottam, hogy a tokalakúak és lazacfélék spermájának mélyhűtésekor a metanol védőanyag használata általánosságban kedvezőbb felolvasztás utáni motilitást, termékenyülést és kelést eredményez, mint a dimetil-szulfoxid védőanyag alkalmazása. Bizonyítottam továbbá, hogy a tokalakúak esetében ez a különbség a hűtőmedium párányomás-ozmométerrel mért ozmolalításával áll összefüggésben.

2. A lapátorru tok és a ponty spermájának mélyhűtésére sikerrel alkalmaztam az 5 ml-es műszalmákat, amivel lehetővé válik az adott fajok szaporításakor a spermamélyhűtés üzemi méretű alkalmazása.

3. A pontysperma mélyhűtésekor bizonyítottam, hogy az embrionális és ivadékkori torzulások százalékos aránya általánosságban nem emelkedik a mélyhűtött sperma használatakor, ugyanakkor a torz ivadékok között haploid egyedek is előfordultak.

4. A lazacfélék spermájának mélyhűtésekor kísérletesen bizonyítottam, hogy a felolvasztott sperma legalább 10 percig – sebes pisztráng és pénzes pér esetében 60 percig – tárolható a termékenyülési és kelési eredmények csökkenése nélkül.

5. A pénzes pér mélyhűtött spermájával végzett termékenyítéskor meghatároztam, hogy a termékenyülési és kelési eredmények csökkenése nélkül biztonságosan használható sperma-ikra arány $5 \times 10^4 : 1$.

6. A kialakított módszertant sikerrel alkalmaztam Magyarországon a ponty, Szlovéniában pedig a márványpisztráng és az adriai pénzes pér fajokban végzett génbanki munkában.

5. A dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények jegyzéke

Horváth, Á., Wayman, W.R., Urbányi, B., Ware, K.M., Dean, J.C., Tiersch, T.R., 2005. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture* 247, 243–251.

Horváth, Á., Urbányi, B., Mims, S.D., Bean, W.B., Gomelsky, B., Tiersch, T.R., 2006. Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. World Aquac. Soc.* 37, 356–362.

Horváth, Á., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Ósz, K., Szabó, K., Urbányi, B., 2007. 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, 251–257.

Horváth, Á., Wayman, W.R., Dean, J.C., Urbányi, B., Tiersch, T.R., Mims, S.D., Johnson, D., Jenkins, J.A., 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: A retrospective study. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 443–449.

Horváth, A., Urbányi, B., Wang, C., Onders, R.J., Mims, S.D., 2010. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 715–719.

Horváth, Á., Jesenšek, D., Csorbai, B., Bokor, Z., Raboczki, É., Kaczkó, D., Bernáth, G., Hoitsy, G., Urbányi, B., Sušnik Bajec, S., Snoj, A., 2012. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 358–359, 213–215.

Horváth, Á., Bokor, Z., Bernáth, G., Csenki, Z., Gorjan, A., Herráez, M.P., Urbányi, B., Jesenšek, D., 2015. Very low sperm–egg ratios result in successful fertilization using cryopreserved sperm in the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 435, 75–77.

Horváth, Á., Labbé, C., Jesenšek, D., Hoitsy, G., Bernáth, G., Kaczkó, D., Bokor, Z., Urbányi, B., 2015. Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 119–124.

6. Köszönetnyilvánítás

Egy tudományos karrier soha nem egy ember kizárólag saját teljesítménye. A jelen dolgozat sem kivétel ez alól, az abban foglalt kísérletes munka végzése során számtalan kollégának, barátoknak és támogató szervezetnek tartozok köszönettel.

A munkámat támogató szervezetek közül köszönettel tartozom az Európai Uniónak a COST Action FA1205 AQUAGAMETE pályázatért, a Magyar-Amerikai Oktatási Csereprogram Bizottságnak a Fulbright Ösztöndíjért, az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramoknak (OTKA), illetve utódszervezetének a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak (NKFIH) az F35170, D38498, F 038389, K109847 és SNN116912 projektekért, illetve a SI-03/2007, TÉT_10-1-2011-0630 és TÉT_10-1-2011-0727 számú Tudomány és Technológia (TÉT) pályázatokért, az Oktatási Minisztériumnak az FKFP0033/2001 pályázatért, a Magyar Tudományos Akadémiának a számomra megítélt Bólyai János Ösztöndíjért, végül a Szent István Egyetem számára megítélt TÁMOP-4.2.2.B-10/1-2010-0011, TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003, GOP-1.1.1-09/1-2010-0141, KMOP-1.1.1-09/1-2009-0049, 8526-5/2014/TUDPOL, 9878-3/2016/FEKUT és EFOP 3.6.3.-VEKOP 16-2017-00008 pályázatokért.

Hálámat szeretném kifejezni Dr. Mézes Miklós professzor úrnak, az MTA tagjának, aki biztatott a jelen dolgozat megírására és folyamatos támogatásáról biztosított. Hálával tartozom Dr. Horváth László professzor úrnak, aki elindított tudományos pályámon és megtanított a halászat-halgazdálkodás szeretetére. Köszönettel tartozom a dolgozatban leírt kísérletekben nyújtott segítségért számos külföldi kollégának: Dr. Terrence R. Tiersch és Dr. Jill A. Jenkins (Louisiana State University, Amerikai Egyesült Államok), Dr. William R. Wayman és Dr. Jan C. Dean (U.S. Fish and Wildlife Service, Amerikai Egyesült Államok), Dr. Steven D. Mims (Kentucky State University, Amerikai Egyesült Államok), Dr. Catherine Labbé (INRA, Franciaország), Dr. María Paz Herráez és Dr. Sonia Martínez-Páramo (Universidad de León, Spanyolország), Dr. Juan F. Asturiano (Universitat Politècnica de València, Spanyolország) és végül annak a kollégának, aki a legnagyobb hatással volt munkámra és gondolkodásomra külföldi ismerőseim közül, Dušan Jesenšek úrnak a Tolmini Horgászegyesülettől, Szlovéniából. Külön köszönet illeti azokat a hazai halgazdasági vállalkozásokat, illetve ezek vezetőit, akik segítettek munkámat, elsősorban Szabó Krisztiánt a Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdaság vezetőjét és Hoitsy György urat, a Lillafüredi Pisztrángtelep vezetőjét, aki megtanított a pisztrángok szeretetére.

Köszönettel tartozom a SZIE Halgazdálkodási Tanszéke minden munkatársának, aki az elmúlt évek során segítette a kutatómunkámat. Külön kiemelném egykori tanítványaimat, Dr. Miskolczi Editet, Mihálffy Szilviát, Ősz Katalint, Vranovics Károlyt, Dr. Bokor Zoltánt, Dr. Bernáth Gergelyt, Ősz Ágneszt, illetve a kutatócsoportunk jelenlegi tagjait: Dr. Jelena Lujić-ot, Dr. Kása Esztert, Kollár Tímeát és Zoran Marinović-ot. A Tanszék munkatársai közül mégis a legtöbb köszönet munkahelyi vezetőmet és barátomat, Dr. Urbányi Béla egyetemi tanárt illeti meg, akivel 1993 óta ismerjük egymást és dolgozunk együtt és aki mindig meghatározó szerepet töltött be tudományos karrieremben és szakmai előmenetelemben. Béla mellett,

hogy kitartó és gondoskodó barát, igazi közösség-szervező, aki folyamatosan a munkatársai érdekeit tartja szeme előtt.

Végül köszönetet szeretnék mondani családomnak a hosszú évek során nyújtott támogatásért és szeretetért. Köszönet illeti meg szüleimet, akik felneveltek és megtanítottak a valódi értékek tiszteletére, illetve elindítottak az agrártudományi pályán. Szavakkal nehezen kifejezhető az a hála, amit feleségem, Horváth-Karip Krisztina, Ádám fiam és Borbála lányom iránt érzek, aki szerettek, segítettek és időnként el kellett viseljék, hogy a munkám miatt nem vagyok velük annyit, amennyit kellett volna.