

MTA Doktori értekezés tézisei

**Keltetőházi halszaporítási gyakorlattól eltérő új- és
újszerű módszertani eljárások**

Dr. Müller Tamás

Gödöllő

2021

Tartalom

1.	Bevezetés	2
1.1.	1.1. Az értekezés felépítése	4
2.	Anyag és módszer	5
2.1.	Inszemináció, mint új halszaporítási módszer (mesterséges spermafelhelyezés petefészeklebe nybe).....	5
2.1.1.	A ponty fajban végzett kísérletek	5
2.1.2.	Afrikai harcsában végzett kísérletek.....	6
2.1.3.	Zebra dánióban végzett kísérletek	7
2.1.4.	Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek.....	8
2.2.	Európai angolna spermamélyhűtése és termékenyítési teszt.....	8
2.2.1.	Hím ivarú angolnák ivarérlelése.....	8
2.2.2.	Japán angolna ikrások ivarérlelése és termékenyítési tesztek	9
2.2.3.	Genetikai analízis	10
3.	Eredmények és értékelésük.....	11
3.1.	Inszemináció, mint új halszaporítási módszer technikai és biológiai alapjai 11	
3.1.2.	Sperma szeminalis plazma, mint hormonvivő anyag	13
3.1.3.	Sperma életképességének/termékenyítőképességének megőrzése a petefészekben az idő és a spermamennyiség függvényében.....	13
3.1.4.	Mélyhűtött sperma felhasználása indukált ivatás esetén	14
3.1.5.	Az utódok genetikai sokszínűségének növelésének lehetősége	15
3.1.6.	Sikeres utódlétrehozás ívás vagy ívatásos módszer alkalmazása során, tejes jelenléte nélkül	15
3.1.7.	Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek eredményei	16
3.1.8.	A módszer felhasználásának lehetséges területei	16
3.2.	Angolna spermamélyhűtés és mélyhűtött európai angolna és japán angolna ikrával végrehajtott hibridizáció	20
3.2.1.	Az angolna spermamélyhűtés felhasználásának lehetséges területei	21
4.	Új tudományos eredmények	23
5.	A dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények jegyzéke.....	24
6.	Köszönetnyilvánítás.....	25

1. Bevezetés

A XXI. századi, folyamatosan növekvő számú emberiség számára kiemelten fontos a megfelelő, biztonságos élelmiszerhez való hozzájutás. A Föld lakosságának nagy része számára a hal jelenti az elsődleges fehérjeforrást. A halhús, mint egészséges táplálék, könnyen emészthető, tápanyagokban gazdag élelmiszer, ami kedvező zsírsavösszetételével a szív- és érrendszeri megbetegedések megelőzéséhez is hozzájárul. Az elmúlt évtizedekben a tengerek és óceánok túlhalászata aggasztó méreteket öltött, ezért a növekvő igények kielégítésében a vízi szervezetek tenyésztése, az akvakultúra egyre nagyobb szerephez jut. Vannak régiók, ahol az akvakultúra-termelés szinte kizárólag haltenyésztésre korlátozódik. A fenntartható erőforrásokra alapozott akvakultúrából származó hal alkalmas lehet a növekvő fehérje igény kielégítésére, a természetes halállományok és vízi ökoszisztémák megőrzése mellett. A modern szemléletű haltenyésztés egyik alapkritériuma a biztonságos tenyészállomány-utánpótlás. A programozható halszaporítás napjainkban egyre inkább a halak hatékony hormonális indukálására támaszkodik. Ez a gyorsan fejlődő tudományterület hatalmas szakirodalommal rendelkezik, különböző részterületeiből nagyszámú összefoglaló cikk és könyv született. Az utóbbi időben azonban a termelés hatékonyságának maximalizálása mellett más prioritások is előtérbe kerülnek. Ilyenek például a termelés környezetre gyakorolt negatív hatásainak csökkentése (megújuló energia használata, a termelés karbonlábnyom mértékének figyelembevétele), vagy a genetikai erőforrások és a biológiai sokféleség megőrzése. Ezekon kívül a fogyasztók számára egyre fontosabb szempont az állatjóléti szabályok betartása is. Ebből az aspektusból a tömegtermelést felváltó, átgondolt és új termelési szemlélet kialakulása zajlik jelenleg a haltenyésztésen belül, elsősorban természetesen ott, ahol nem csak gazdasági faktorok játszanak szerepet a termékelőállításban. Ez a szemlélet új, egyes esetekben speciális kutatási területeket nyitott meg, sikeres esetben a kifejlesztett új és újszerű technológiai lépéseket a termelési rendszerekbe is beépítik.

A korszerű haltermelési eljárásoknak nem csak az élelmiszerellátás szempontjából lehet fontos szerepe, de az a vízi ökoszisztémák megőrzése és rehabilitációja szempontjából is fontos lehet. Az akvakultúra kutatások egy része kimondottan a természetvédelmi célú in situ és ex situ konzervációbiológiai vizsgálatokra fókuszál. Ezt többek között az is indokolja, hogy Freyhof és Brooks (2011) szerint az európai édesvízi halfajok közel 80%-a endemikus (tehát egyedülállóak Európában és máshol nem találhatóak meg a világban), 37%-uk pedig veszélyeztetett, amely kivételesen magas arány más rendszertani csoportokhoz képest. Például a vízinövények 7%-a, a lepkék 9%-a, a kétéltűek 23%-a, a hüllők 19%-a, a madarak 13%-a és az emlősök 15%-a tartozik veszélyeztetett kategóriába. Annak ellenére, hogy egyes országok nem rendelkeznek a további becslésekhez szükséges trendadatokkal, a jelenlegi felmérések alapján Európa édesvízi halfajai 17%-ánál csökken, 6% esetében stabil az állomány mérete, de mindössze 1%-nál tapasztaltak növekedést. A fajok fennmaradó 76%-ának esetében nem áll rendelkezésre elegendő adat az állomány-változás trendjének értékeléséhez. Napjainkra legalább 13 európai halfaj pusztult ki, és további 5 faj fennmaradása kétséges. A 2021-ben megjelent „The World's Forgotten Fishes (A világ elfelejtett halai, World Wildlife Fund International)” című jelentés alapján 80

kipusztult édesvízi halfajból 16 faj 2020-ban tűnt el véglegesen, mindössze egyetlen év alatt. Az őshonos halfaunákat veszélyeztető tényezők közismertek, ilyenek például a vizek szennyezése, a duzzasztógáták építése, a klímaváltozással összefüggő időjárási anomáliák, a folyók kiszáradása, újonnan megjelenő parazitózisok, az élőhelyek degradációja (élőhelyek lecsapolása) és az idegenhonos halfajok terjeszkedése. A halak megóvására irányuló munkák (visszatelepítési programok, amelyek tudományos munkákban megtalálhatóak) alulreprezentáltak. Seddon et al. (2005) szerint legalább 699 állat- és növényfaj esetében indult visszatelepítési program, amelyből csupán 20 foglalkozott halakkal. A napjainkban alkalmazott visszatelepítési programok alapja, hogy a telepítendő egyedek – jelen esetben halak – előállítását ellenőrzött körülmények között végzik. Ezek lehetnek nyilvános akváriumok, állatkertek, kutatóhelyek stb. Ebben az esetben (ex situ konzervációbiológia) a tartási körülmények is befolyásolják az egyedek mindazon adaptációs képességét, amelyek a majdani visszatelepítés sikerességét nagymértékben befolyásolják. Az ingerszegény, kiegyensúlyozott környezet például gyakran szorul gazdagításra. A kórokozó- és parazitaszegény környezet az immunrendszer rendellenes fejlődéséhez is vezethet. Ezért szükséges például az *ex situ* és az *in situ* konzervációbiológiai tevékenységek összehangolása. Ezeket a problémákat elsősorban tartás- és neveléstechnológiai fejlesztésekkel lehet orvosolni. A másik hangsúlyos szempont a genetikai aspektusból történő tevékenység és szemlélet menedzsment. Az *ex situ* konzerváció jellegéből adódóan egy olyan beavatkozás, amely már az anyahalak kiválasztása révén jelentősen befolyásolja az utódgeneráció genetikai hátterét: génsodródás, beltenyésztés, mesterséges szelekció révén a természetes szelekció fellazulása, a genetikai sokféleség elvesztése, a beltenyésztési depresszió, a genetikai háttér módosulása a fogságban történő tartás során, káros génmutációk feldúsulása. Természetesen törekedni kell a feltárt problémák megoldására, ezért olyan keresztezési programokat szükséges indítani, amellyel ezek a káros hatások mérsékelhetők. Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy vannak olyan helyzetek, amikor a meglévő erőforrások érdekében egyes elemeket nem lehet kiváltani mesterséges beavatkozásokkal. Eklatáns példa erre a Nagyváradi mellett található Püspökfürdői tó (Báile 1 Mai) „elvesztése” 2013-2015 között, amelynek során emberi beavatkozás következtében az eltűnő tóból kipusztult a váradi maradványcsiga (*Melanopsis parreyssii*) és a rakovitzcai kele (*Scardinius racovitzai*). Hazánkban jelenleg a kisméretű élőhely fragmentumokra szakadt lápi póc (*Umbra krameri*) példája említhető, amelynek populációi rohamosan tűnnek el élőhelyeinek felszámolása, valamint invazív halak (elsősorban az amurgéb (*Perccottus glenii*)) előretörése miatt. A helyzetet súlyosbítja, hogy reprodukciós sajátosságaiból adódóan – párban ívnak, generációs intervallumuk rövid, termelt ikramennyiségük kicsi, az *in vitro* fertilizáció (száraz termékenyítési szaporítási eljárás) jelenleg még nem kidolgozott – az előbb említett genetikai depressziós hatásoknak a megmaradt állományok is nagyon kitéttek. Az új problémák tehát (részben) új megoldásokat igényelnek.

1.1. 1.1. Az értekezés felépítése

Az értekezés célja, hogy összefoglalja a hazai tógazdasági-, keltetőházi- és akvarisztikai halszaporítási gyakorlattól eltérő, alternatív módszerekkel történő szaporítási munkáim során kapott főbb eredményeimet. Az értekezés két fő részből áll. Az első részben azokat a főbb módszertani eredményeket mutatom be, amelyek elősegítették egy általam kidolgozott, de csapatmunkában végzett, új halszaporítási módszer kialakítását. A mesterséges spermafelhelyezés (inszemináció) módszer alapja, hogy a spermiumok biológiai aktivitásukat megtartva hosszabb ideig „tárolhatók” a petefészkek lebenyben az indukált szaporítás (vagy szaporodás) előtt, valódi külső megtermékenyítésű halfajokban. Íváskor (ovulációkor) ilyen esetben a gaméták együtt ürülnek és vízaktivációkor bekövetkezik az ivarsejt egyesülés, azaz a termékenyülés. Ebben a fejezetben gazdaságilag jelentős- (ponty (*Cyprinus carpio*), afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*), dél-amerikai ezüstharcza (*Rhamdia quelen*)), valamint egy laboratóriumi halfajon, (zebradánió (*Danio rerio*)) végzett kísérletsorozatok eredményein keresztül mutatom be a módszer technikai- és biológiai sajátosságait.

Az értekezés második részében a fokozottan veszélyeztetett európai angolna (*Anguilla anguilla*) ex situ konzervációbiológiai kutatás génmegőrzési munkáinak hímivarban elért legfőbb eredményeit mutatom be. Ezek magukban foglalják a hormonálisan indukált ivarérlelés folyamatát, az ivarsejt gyűjtését, a spermamélyhűtés módszerét, ezen technikák alkalmazásával történő termékenyítési tesztek japán angolna ikra felhasználásával, valamint a hibrid utódok származásellenőrzésének módszereit. Fontos kiemelni, hogy az itt ismertetett munkáink előtt ebben a fajban nem írtak le sikeres szaporítást mélyhűtött sperma felhasználásával.

2. Anyag és módszer

2.1. Inszemináció, mint új halszaporítási módszer (mesterséges spermafelhelyezés petefészeklebenybe)

Az egyes technológiai lépéseket azonos, vagy hasonló módon végeztük több kísérleti ciklusban. Emiatt célszerűnek tartottam egységesen bemutatni az egyes módszertani sajátosságokat, amelyek a vizsgálatokat jellemezték. A programozott ívársra felkészített és bódított ikrások petefészek lebenyébe fecskendőn rögzített szonda vagy automata pipetta segítségével juttatjuk az előzőleg gyűjtött és minőségellenőrzésen átesett, egy-vagy több hím-től származó, kevert sperma adagot/adagokat. A katéter könnyen irányítható, lehetőség van a petevezetéseken keresztül célzottan a jobb vagy a bal petefészek lebenyt kezelni, a hal méretétől függően 7-15 cm mélyre az ivarnyíláson-, valamint a petevezetőn keresztül (ponty, afrikai harcsa, dél-amerikai ezüst harcsa).

1. táblázat. Az inszeminációval kapcsolatos ismeretek összefoglaló táblázata. ¹nagykarácsonyi kísérlet (koi), ²attalai kísérlet, ³szeminális plazma, mint vivő anyagú kísérlet, ⁴petefészeklebeny sperma-expozíciós kísérlet, ⁵elektronmikroszkópos vizsgálat, ⁶sperma:ikra arány vizsgálatok, ⁷genetikai sokszínűség növelés lehetőségének vizsgálata, ⁸szaporítás tejes jelenléte nélkül. (tt kg: testtömeg kg)

	Ponty	Afrikai harcsa	Dél-amerikai ezüst harcsa	Zegradánió
Szaporítási mód	<i>in vitro</i> fertilizáció (száraz termékenyítési eljárás)			ívatás
Spermagyűjtés	bódítás, fejtés	túllátás / herekivétel	bódítás, fejtés	bódítás, fejtés
Beavatkozások során használt bódítószer	benzokain / szegfűszegolaj	benzokain	szegfűszegolaj	MS-222
Inszemináció eszköze	csecsemő etetőszonda: hossz: 400 mm, külső átmérő: 1,3 mm, belső átmérő: 1mm (Galmed, Lengyelország)			automata pipetta / üvegkapillaris
Inszeminált spermamennyiség	1 ml / ikrás ¹ 1 ml / tt kg ²	2 ml / tt kg ^{3,4,5} 0,5 ml / tt ⁶ 1 ml / tt kg ⁶ 2 ml / tt kg ⁶	2 ml / tt kg	~1 µl / tejes, min-max: 0,4–1,4 µl ⁷ 0,4 µl / tejes ⁸
Inszemináció helye	egyik petefészeklebenybe	mindkét petefészeklebenybe		petevezetőbe / ivarnyílás közepén véletlenszerű eloszlás
Ivanyílás elzárása	bevarrás	nem volt ivarnyílás elzárás		

2.1.1. A ponty fajban végzett kísérletek

Ponty, mint szaporítási kísérletek modellhalfajban végzett kísérleteket terepei körülmények között, két halkeltetőben végeztük (Nagykarácsony és Attala). A hormonális indukció (pontyhipofízis kezelés (CPE)) protokollja a ponty keltetőházi

gyakorlatának megfelelően történt. Az előadag 0,3 mg CPE / testtömeg kg, a döntő adag pedig 1,5 ml homogenizátum (2,7 mg CPE / testtömeg kg) volt. A tejesekből gyűjtött spermát előzetes vizsgálatok alapján szelektáltuk és összekevertük, majd ebből a poolból juttattunk fel spermaadagokat a döntőadaggal párhuzamosan, tehát 12 óra -, valamint 2 órával a programozott ovuláció előtt (nagykarácsonyi kísérletek, 3 csoport, csoportonként 7-7 ikrás). Az attalai kísérletben a döntő hormonkezeléssel egyidőben juttattunk fel spermát (n = 5 ikrás), majd a fejt gaméta-tételeket (spermium és ovulált ikra együttesen) ketté választottuk és az egyik részre még natív spermát adtunk. A vízaktiváció/termékenyítés, majd az ikrakezelés a keltetőházi szaporítási technológiának megfelelően ment végbe (ragadóság elvétel Woynárovich féle oldattal és duzzadást követően tannin oldattal).

2.1.2. Afrikai harcában végzett kísérletek

A hormonálisan indukált szaporításhoz szintén CPE használtunk. A pontytól eltérően a kiszámított hormon adagokkal egy menetben kezeltük a halakat.

2.1.2.1. Sperma szeminális plazma, mint hormonvivő anyag

A pontyban végzett kísérletek során megfigyeltük, hogy a petefészekben a sperma szeminális plazma felszívódott. Felmerül annak a lehetősége, hogy a felszívódó szeminális folyadék hatékony hormon vivőanyag lehet. A főkísérletben porított pontyhipofízist spermával kevertünk össze, majd felkészített-, egyedileg tartott ikrások petefészek lebenyébe juttattuk fel a keveréket (2 ml sperma + 5 mg CPE / tt kg, n = 7). Gaméta fejéskor (spermium és ikra együttesen) a nyert ikratételeket ketté osztottuk és az egyikre frissen gyűjtött kevert spermát adtunk még a vízaktivációt megelőzően.

2.1.2.2. Sperma életképességének/termékenyítőképességének vizsgálata a petefészekben az idő és a spermamennyiség függvényében

Hormonálisan indukált szaporításkor afrikai harcsa fajban a víz hőmérséklettől függően pontosan kiszámítható a beérési idő (hormon kezeléstől ovulációig). Ennek ismeretében két kísérleti ciklusban vizsgáltuk; első kísérletsorozat: a kevert sperma adagokat petefészek lebenyekben injektáltuk 5, 10, 15, 20, 25, 36 és 48 órával (n = 5 ikrás csoportonként) a programozottan kiváltott ovuláció előtt. Második kísérletsorozat: három különböző, 10 órával a gaméta fejés előtt petefészekbe feljutatott sperma adag hatását vizsgáltuk a termékenyítésre (2 ml sperma / testtömeg kg (n = 6), 1 ml sperma / testtömeg kg (n = 5), és 0,5 ml sperma / testtömeg kg (n=6)).

2.1.2.3. Mélyhűtött sperma felhasználása indukált ivatás esetén

Előkísérletben felolvasztottunk mélyhűtött afrikai harcsa szalmákat. Kicentrifugáltuk a mintákat, így lehetőségünk adódott a kicentrifugált spermiumpogácsa felszínéről a mesterséges szemínális plazmát (hígító és MeOH védőanyag) eltávolítani és ponty-, valamint afrikai harcsa kicentrifugált-, természetes szemínális plazmájával összekeverni. Előkísérleti eredmények alapján a ponty szemínális plazmában a felolvasztott spermiumsejtek magasabb mozgóképességet értek el, így a főkísérletben már ezt a kombinációt használtuk.

Főkísérletben mélyhűtött afrikai harcsa mintákat olvasztottunk fel, majd az előkísérletben felvázolt technikai lépésekkel készítettük fel inszeminálásra (felolvasztás – centrifugálás – mesterséges szemínális plazma eltávolítása – mesterséges ponty szemínális plazma összekeverés), majd bódított ikrásokba (n = 9) a hormonkezelést követően mindkét petefészek lebenybe katéter segítségével juttattuk fel (2 ml előkészített sperma / testtömeg kg). Ovulációkor az ikrásokat lefejtük, alap paramétereket felvétele után a nyert gaméta adagokat ketté bontottuk. Az egyik ikrátételt azonnal termékenyítettük (vízaktiváció), míg a másik tételhez frissen gyűjtött spermamintát adtunk még hozzá és ezt követte a vízaktiváció.

2.1.2.4. Spermium-oocita kapcsolat ovariális körülmények között

Két afrikai harcsa ikrásba az indukált ovuláció előtt spermát injektáltunk hormonkezelésükkel egy időben. A scanning elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz az afrikai harcsa ikra és spermium elegyet közvetlenül a fejest követően (nem volt vízaktiváció) glutáraldehidben (5% 0,1 M foszfát pufferben) fixáltuk. Az ikraszemek mikropüle régiójának topográfiai jellemzőit egy EVO MA 10 Zeiss letapogató elektronmikroszkóp segítségével (SEM) vizsgáltuk.

2.1.3. Zebradánióban végzett kísérletek

Zebra dánió modell halfaj két változatával dolgoztunk; egy vad-(AB), és egy transzgénikus vonallal (Sonic hedgehog; Tg (shha:GFP), utódaik mikroszkóp segítségével jól elkülöníthetőek.

2.1.3.1. Genetikai sokszínűség növelésének lehetősége ivatásos szaporítás esetén

Kísérleti ivató medencékben egy AB ikrást (n = 30) mindig ugyanaz a két AB tejjessel ivattuk, úgy, hogy a programozott (fényritmussal szabályozott) ivás előtt 1 órával shha tejesekből származó spermaadagokat juttattunk fel automata pipetta és üveg kapilláris segítségével az ikrások petefészekébe. A sikeresen ívó pároknál az ikrákat

összegyűjtöttük és Petri-csészékben 72 óráig inkubáltuk (lárvakelés), majd mikroszkópos vizsgálattal utódellenőrzést végeztünk.

2.1.3.2. Ívatásos szaporítás tejesek közvetlen jelenléte nélkül

Ívató kádakba felkészített zebradánió ikrás csoportokat helyeztünk (n = 4 ikrás / csoport, kezelésenkénti ismétlés szám = 7) A halakat vagy egyáltalán nem kezeltük (negatív kontroll), vagy csak NaCl oldatot- (pozitív kontroll), vagy a sóoldattal megegyező mennyiségű spermát juttattunk a petefészeklebe nyekbe a fotoperiódus világos szakaszának kezdete előtt 1,5-2 órával (1. táblázat). Minden csoportot két módszerrel ívattuk; az ikrásokat egy átlátszó fallal választottuk el a tejesektől (van vizuális inger, illetve feromonhatás), illetve ívatás tejesek jelenléte nélkül.

2.1.4. Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek

A kísérleteket az Acquaviva Piscicultura in Rio Grande do Sul telepen, Braziliában végeztük. A 6 hónapos anyahalak saját szaporítású és nevelésű állományból származtak. Három kísérleti csoportot hoztunk létre, mindhárom csoportban 7-7 ikrást kezeltünk. A hormon dózis azonos volt, 5,0 mg CPE / testtömeg kg, és az ikrát az ún. „száraz eljárással” termékenyítettünk. Az 1. csoportba tartozó ikrásokat hagyományos-, keltetőházi szaporítási módon kezeltük (kontroll), a 2. csoport halainak petefészek lebe nyébe a hormonkezeléssel egyidejűleg 6 tejestől származó kevert spermát juttattunk katéter segítségével (2 ml sperma / testtömeg kg). A 3. csoportban a porított CPE-t spermával kevertük össze, majd az ikrások petefészkebe injektáltuk (2 ml sperma + 5 mg CPE / testtömeg kg). Az ikratételek termékenyülési értéket Zuger üvegből kiemelt mintákból számítottuk.

2.2. Európai angolna spermamélyhűtése és termékenyítési teszt

2.2.1. Hím ivarú angolnák ivarérlelése

A hím ivarú angolnák ivarérlelési és mélyhűtési munkáit a volt Pannon Egyetemen végeztük (ma Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Georgikon Campus). A tejeseket véletlenszerűen farmangolnák közül válogattuk ki (volt Aqua-Kultúra Kft, Körömi angolna farm), majd a laboratóriumban, édesvízben tartottuk. A kísérleti periódus alatt halainkat nem tápláltuk. Indukált ivarérlelésükhöz heti ismételt Chorionic Gonadotropint (hCG) használtunk (250 IU hCG / hét / hal). Spermamélyhűtésre a 8. heti kezelést követően fejtünk spermát. Azokat a mintákat választottuk ki, melyek átlagos becsült mozgóképessége elérte a 80%-ot. A 0,5 ml-es műszalma 400 µl kevert spermát, 400 µl védőanyagot (metanol) és 3,2 ml hígító

oldatot (módosított Tanaka hígító; 137 mM NaCl and 76,2 mM NaHCO₃) tartalmazott.

2.2.2. Japán angolna ikrások ivarérlelése és termékenyítési tesztek

Mindkét kísérleti helyszínen (Hokkaido University és Tokyo University of Agriculture), japán angolnára kifejlesztett protokoll alapján történt az ikrások ivarérlelése és indukált ovulációja. Az ikrások tengervízi ivarérlelése során intramuszkuláris injekcióban szárított lazac hipofízis homogenizátumot kaptak heti rendszerességgel 40 µg / g testtömeg adagban. A felkészült halakban az ovulációt egyszeri intramuszkuláris 17α,20β-dihydroxy-4-pregnene-3-one-nal váltották ki 1 µg / testtömeg kg-os adagban. A termékenyítést ún. száraz termékenyítési eljárással végeztük. A fejt ikratételekből 1 grammos mintákat vettünk ki (1700-1800 ikraszem), amelyeket 5 cm átmérőjű 50 ml-es főzőpohárba osztottuk. A kontrollokat 500 µl előhígított spermával (mesterséges szemínális plazma:sperma = 100:1) termékenyítettük. A mélyhűtött műszalmákat 40°C-os vízfürdőben felolvasztottuk (13 másodperc), majd az 1 g-os ikratételeket azonos módon termékenyítettük, mint a kontroll tételeket. 1 perccel később egy speciális szűrő segítségével az ikrákat eltávolítottuk és 50 ml-es Falcon csövekben, mint inkubáló edényben, 23°C-on keltettük. A fejlődő embriókról és lárvákról digitális fotók készültek. A Tokyo University of Agriculture University-n végrehajtott kísérleti ciklusban a termékenyülési értékek meghatározásához előkezelt tengervizet és a következő eszközöket használtuk: 48 lyukú plate (Iwaki Glass Co. Ltd., Tokyo, Japán), amelyet lyukanként 1 ml szűrt tengervízzel töltöttük fel (pólus nagyság 0,2 mm), amely antibiotikumokat tartalmazott (Penicillin G potassium, 5000 IU/L; Banyu Pharmaceutical Co. Ltd., Tokió, Japán, streptomycin sulfate, 0.05 g/L; Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokió, Japán) és 1 mg / l szarvasmarha-szérum albumin „V frakció” (Nacalai Tesque, Inc., Kiotó, Japán). 96 véletlenszerűen kiválogatott ikraszem került a 2×48 lyukú plate-be (1 ikra lyukanként), 1 órával a termékenyítést követően. Ebből számoltuk a termékenyítési-, kelési-, lárvá deformációs arányokat. Az ikraszemeket 23°C-os termosztátban inkubáltuk. A lárvákat kelést követően sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk a szikhólyag felszívódásáig. A lárvafejlődésről digitális fényképek készültek. A következő paramétereket számoltuk:

Termékenyítési % = termékenyült ikraszemek / összes ikraszem × 100

Kelési % = kelt lárvák száma / összes ikraszem × 100

Lárvá deformáció 1: kikelt deformált lárvák száma/ összes ikra × 100

Lárvá defromáció 2: kikelt deformált lárvák száma / kikelt lárvák száma × 100

A lárvadeformációba azokat az egyedeket soroltuk, amelyek farka meggörbült, és/vagy szívödémájuk volt.

2.2.3. Genetikai analízis

Az európai és japán angolna hibridizáció igazolásának alapja a faji elkülönítő bélyegekre tervezett molekuláris genetikai markerben, a két faj azonos génjében található pontmutáció kimutatása (restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus, *PCR-RFLP*) volt. Frissen kelt *A. japonica* és hibrid lárvákat-, valamint felnőtt *A. anguilla* egyedeket használtunk a genetikai elemzésekhez. Az utódokban jelenlévő európai angolna hím ivar genetikai hozzájárulásának ellenőrzéséhez a primerpárt úgy készítették, hogy amplifikálja a genomikus tüsző stimuláló hormon-béta alegység (FSH) 100 bp-os fragmentumát. Az amplifikációhoz a következő primereket használtuk: “FSH_Angolna_RsaI_F” 5'-CAACAGGCCTGCAACTTCA és “FSH_Angolna_RsaI_R” 5'-CTCAGAGCCACAGGGTAGGT. A reakciókeverék 0,1 µl Taq polimerázt és 0,2 µl puffert Dreaml szekvenciát tartalmazott. Az alapokból (100 pM / µl), 1,2 µl dNTP-ből (2 mM / µl; Fermentas) 1,5 µl templát DNS-t (30-140 µg / µl) használva 12,75 µl térfogatban. Az FSH-specifikus PCR körülmények 2 perc 94°C-on, majd 38 ciklus (30 másodperc 94°C-on, 30 másodperc 64,7°C-on és 30 másodperc 72°C-on), és egy ciklus végső meghosszabbítás 5 percig 72°C-on. Az összes amplifikációt egy Eppendorf Mastercycler (EP 384), majd a PCR-termékeket RsaI-dal kezeltük. Ezután restrikciós enzimet (Fermentas), 1 µl közvetlenül 10 µl DNS-fragmenseket alkalmazva, elválasztottuk 3% agarózgelen (Serva, Németország), és etidium-bromiddal megfestettük.

A hatékony genotipizáláshoz SNP kimutatására alkalmas, *HRM* (nagy felbontású olvadáspont elemzés) alapú vizsgálatot optimalizáltunk. Az FSH gén 100 bázispár hosszúságú PCR termékének felszaporítása Rotor-Gene Q 5plex HRM platformon történt, Type-it HRM PCR Kit (QIAGEN, Hilde, Germany) és EvaGreen interkaláló festék segítségével. A PCR reakciókat 17 ng teljes genomi DNS mintából indítottuk, 2x HRM PCR Master Mix-szel készült, 10 µl térfogatú reakcióelegyben a gyártó felhasználási ajánlásait figyelembe véve. A primerek azonosak voltak, mint a PCR-RFLP vizsgálatokban: FSH_Angolna_RsaI_F” és “FSH_Angolna_RsaI_R”. A reakciókat a következő hőmérsékleti profillal indítottuk. A 95°C-on 2 percig tartó elődenaturálást követően 40 ciklust alkalmaztunk az alábbi hőmérsékletekkel: 95°C, 15 másodperc, 60°C, 30 másodperc. Ezután az EvaGreen-nek megfelelő fluoreszcencia tartományban felvettük a HRM görbét 65 és 90°C között.

3. Eredmények és értékelésük

3.1. Inszemináció, mint új halszaporítási módszer technikai és biológiai alapjai

Kísérleteink során különböző termékenyítési arányban, de sikerült az ikrások hormonkezelésével egyidőben a petefészeklebe nyújtott spermával termékenyített ikratétételeket létrehozni ponty (minimum – maximum termékenyülési arány ($T_{\min-max}$): 24,2-81,2%), afrikai harcsa ($T_{\min-max}$: 41-93,7%), dél-amerikai ezüstharcsa ($T_{\min-max}$: 71,7-89,8%), zebraadánió ($T_{\min-max}$: 0-84,3%) fajokban. Amennyiben mindkét petefészeklebe spermát juttattunk, úgy a termékenyülési értékekben nem, vagy csak kissé maradtak el a hagyományos (*in vitro* termékenyítés) módszer alapján kapott értékekhez képest. Ezen kívül – a dolgozat tárgyfajain kívül – farkassügér (*Dicentrarchus labrax*), amur (*Ctenopharyngodon idella*) és európai angolna (nem publikált adatok) fajokban is eredményesen alkalmaztuk a módszert, ivatásukkor életképes utódokat nyertünk.

Kísérleti eredményeink alapján önmagában a katéter (vagy pipetta) használata nem befolyásolta az ovulált és kinyert ikramennyiséget a hagyományos módon kezelt halakhoz viszonyítva, amely arra utal, hogy a beavatkozás nincs negatív hatással a petesejtek végsőérésére.

A módszer előnye az elterjedten alkalmazott hormoninjektáláshoz viszonyítva, hogy a hormonbejuttatáshoz nincs szükség injekcióstűre (invazív kezelés), ezért a megfelelő átmérőjű és rugalmasságú katéter nem okoz szöveti sérülést, azaz nem-invazív kezelésnek minősül. Ennek a későbbiekben az Animal Welfare (az állattartás általános alapelveiről szóló EGK 923/1978 számú határozat) szempontjából lehet jelentősége.

3.1.1.1. Spermium életképességének/termékenyítőkéességének vizsgálata a petefészekben az idő és a spermamennyiség függvényében

Minden kezelt ikrás reagált a hormonkezelésre, a belőlük nyert relatív ikramennyiségek között statisztikailag igazolható különbség nem mutatkozott ($p > 0,05$, 5. táblázat). Az eltérő, 5-25 órás, kezelési csoportok között statisztikailag igazolható különbség volt kimutatható a termékenyülési – és kelési arányokban, de nem volt trendszerű a sperma petefészekben töltött idő függvényében. A különbségek az egyes csoportokon belül az egyes halak nagy egyedi varianciának tudható be. Ugyanakkor a 48 óra inkubációs idő alkalmával a termékenyülési- és kelési értékek már nagymértékben visszaestek, ami tisztán mutatta a sperma biológiai aktivitásának /termékenyülőkéességének a határát (átlag kelési arány: 19,8-39,3% 5 és 36 h csoportokban, míg 48 h csoportban 0,4%).

Második kísérleti ciklusunkban 0,5 ml inszeminált sperma / testtömeg kg -os adaggal értük el a legmagasabb termékenyülést (azonban nem tért el szignifikánsan a többi

csoport értékeitől $p > 0,05$), ami jelzi, hogy az előző kísérleteinkben alkalmazotthoz képest (2 ml inszeminált sperma / testtömeg kg) a petefészekbe feljuttatandó sperma mennyiség jelentősen csökkenthető.

3.1.1.2. Spermium-oocita kapcsolat ovarialis körülmények között

Az ovulált ikraszemek felszínén közvetlenül a mikropüle régióban számos spermiumsejtet figyeltünk meg. Elsőként igazoltuk, hogy valódi külső megtermékenyítésű halfajban úgynevezett „belső ivarsejt egyesülés” létrejöhet annak ellenére, hogy természetes körülmények között a két nem között nincs közvetlen kapcsolat - közvetlen spermabejuttatás a női belső ivarszervekbe - az ívás során. A folyamat alapja, hogy a petefészekben a spermiumsejtek az ovulált ikraszemek mikropüle régiójához vándorolnak és/vagy sodródnak, illetve egyes sejtek a mikropülén behatolva egészen az ooplazmáig hatolnak. A folyamat itt megáll (nincs gaméta összeolvadás), majd, amikor a beágyazott spermiummal az oocyták kiszabadulnak a hasüregből, a vízaktivációra befejeződik a termékenyülés folyamata. Habár a petefészeklebenyebe jutott sperma és ezen keresztül a spermium és oocita/ikra kapcsolatot csak egy esetben vizsgáltuk (afrikai harsa ikra: spermium elektronmikroszkópos tanulmány), közvetett információk alapján azonban kétféle kontaktus lehetőségét tételezzük fel:

1) Egyfelől a szeminalis folyadékban mozdulatlan spermiumok a petefészek ozmocomform környezetében sem fognak aktiválódni, így hosszabb ideig képesek megtermékenyítőkéességüket megtartva inaktív állapotban tárolódni. Ovulációkor a folliculáris tokból kiszabaduló oociták felszínére feltapadt, de még mindig inaktív spermiumok együtt ürülnek a genitális nyíláson keresztül a külvilágba. Vízrel érintkezve a spermiumok a környező folyadék ozmolalitásának csökkenés miatt aktiválódnak és megtermékenyítik a víz hatására szintén aktiválódott ikraszemeket.

2) Az afrikai harsa esetében a külső megtermékenyítésű, de kopulációval szaporodó halakhoz hasonlóan (*Alcichthys alcicornis*; *Blepsias cirrhosus* *Trachelyopterus galeatus*) „belső ivarsejt egyesülés” is létrejöhet a petefészek lebenyén belül. Feltételezhetően az ovarialis folyadék képes aktiválni a spermiumok egy részét. További vizsgálatokra van szükség a jelenség fiziológiai hátterének pontos feltáráshoz.

Amennyiben az inszeminált ikrás halak lefejt ivarsejteihez (spermium és ikra együttesen) további frissen fejt spermát is adagoltunk azzal a termékenyülési értéket nem lehetett növelni. Elképzelésem szerint a petefészeküregbe ovulált ikraszemek mikropüle régiója közelébe és/vagy a mikropüle csatornába került 10-12 órás kapacitáción átesett spermiumsejtek azonnal megindítják azokat a kortikális reakciókat, amely fizikális akadályt képez a hozzáadott friss spermiumok behatolására vízaktivációkor. Fontos lenne a továbbiakban vizsgálni azokat az új aspektusokat is, amelyeket a sajátságos új kapcsolat teremt:

1) Eddig a sperma (spermiumsejtek és szeminalis plazma együttesen) és az ovarialis folyadék kapcsolatát vizsgálták. Azonban kísérleteink során megfigyeltük, hogy a szeminalis plazma felszívódik a petefészekfalon keresztül (emiat is

alkalmazhattuk sikeresen hormonvivőanyagként), így fontos lenne az új gaméta kapcsolatot; a spermium – ovariális folyadék interakciót is megvizsgálni.

2) A spermakompetíció esetében az egyedek között és az egyedben belüli hatások is a kutatások homlokterébe kerültek. Nincsenek ugyanakkor ismereteink arra nézve, hogy a petefészekben lévő ovariális folyadék, mint közeg szerepet játszik-e a spermiumok közötti szelekcióban (a spermakapacitáció ideje akár 10-12 óra is lehet). Mindenképpen szükséges lenne ezért azt is megvizsgálni, hogy az inszeminált szaporításból származó utódok életképessége eltér-e “normál” termékenyítésből született társaikéhoz képest.

3.1.2. Spermia szeminális plazma, mint hormonvivő anyag

Afrikai harcsa és dél-amerikai ezüstharcsa fajokban porított ponty hipofízist frissen fejt spermával kevertünk össze és ezt a keveréket injektáltuk az ikrások petefészkek lebenyeibe. Mindkét faj esetében azt találtuk, hogy a szeminális plazma felszívódásával együtt a GtH hormonok is átjutottak a petefészkek szisztémás keringésébe, majd 9,5 – 11 óra alatt és indukálta(ák) az oociták végső beérését. Ezen időszak alatt a spermiumok nem károsodtak, és a vízaktivációt követően nagy hatékonysággal megtermékenyítették az ovulált ikraszemeket (termékenyülési arány afrikai harcsa: 41 – 93,7 %, dél-amerikai ezüstharcsa: 71,7 – 89,8 %). Gyakorlati halszaporítás során ennek alapján nem szükséges a hormonkezelést és a spermainjektálást külön menetben végezni, hanem egy időben, egy kezeléssel meg lehet oldani. A kezelt halakban nem léptek fel immunológiai problémák (pl. hasúri folyadék megjelenése a petefészkeküregben), amelyek a spermiumok termékenyítőképességét (jelentősen) befolyásolták volna.

3.1.3. Spermia életképességének/termékenyítőképességének megőrzése a petefészkekben az idő és a spermamennyiség függvényében

Afrikai harcsa fajban végzett kísérleteink eredményei alapján 5-36 órával az ovuláció előtt a petefészkekbe jutott spermiumok még megtartják termékenyítőképességüket. Ugyanakkor ennél hosszabb időtartam, 48 óra, elteltével a termékenyülési és kelési értékek már nagymértékben visszaesnek. Farkassügérben azt figyeltük meg, hogy a petefészkek lebenyekből visszanyert sperma életképessége hasonlóan 40 óra körüli, ezt követően azonban jelentős mértékben lecsökken, illetve megszűnik a spermasejtek vízaktivációt követő mozgóképessége (48 ± 2 óra 0-5%). Érdekes, hogy a két faj környezeti igényeiben meglévő jelentős különbségek (afrikai harcsa, Siluriformes édesvízi szaporítás 25 – 27 °C vízhőmérsékleten versus farkassügér, Perciformes, tengervízi szaporítás - 16 °C) ellenére is hasonló eredmények tapasztalhatók. Pontyban és a dél-amerikai ezüstharczában a keltetőházi gyakorlatnak megfelelő döntő hormonkezeléssel egy időben (9,5-12 órával az ovulációt megelőzően) a petefészkek lebenybe juttatott spermiumok sikeresen termékenyítették az ikratételeket.

Az első kísérletsorozatok során, pontyokkal végzett kísérleteinkben 1 ml / ikrás vagy 1 ml / testtömeg kg spermamennyiséggel kezeltük a halakat, és csak az egyik petefészkelebenybe injektáltuk a spermát. Ezt a mennyiséget afrikai harcsa és dél-afrikai ezüstharcában 2 ml sperma/testtömeg kg mennyiségre emeltünk. Harcsafélékben ez a mennyiség az, ami tapasztalataink szerint sperma visszafolyás nélkül feljuttatható petefészkelebenybe. A szakirodalomban fellelhető spermium: ikra arányok alapján azonban ez a mennyiség “sperma pazarlásnak” volt tekinthető. Afrikai harcsában vizsgáltuk a petefészkekbe fecskendezett különböző mennyiségű spermaadagok hatását a termékenyülésre. Eredményeik alapján nem volt különbség az elért termékenyítési- és kelési eredményekben a kontroll és a petefészkek lebenybe juttatott 2 ml, 1 ml és 0,5 ml sperma / testtömeg kg mennyiségek között. A keltetőházi, *in vitro* termékenyítési gyakorlat szerint a kívánt sperma: ikratömeg arány termékenyítéskor; 1:100. A 0,5 ml sperma/testtömeg kg kezelés esetén, 10% lefejt ikratömeg/testtömeg kg-al számolva, ez az arány 1:200, ami a termékenyülés valószínűsége szempontjából kedvezőbb, mint az üzemi javaslat. A lefejt ikra és a bruttó inszeminált sperma mennyiség alapján a becsült spermium: ikra arányok: 30 377±4 262:1 (2 ml sperma/testtömeg kg), illetve 21 620±14 969:1 (1 ml sperma/testtömeg kg) voltak. A nagy szórásértéket az eredményezte, hogy két ikrás csak kis mennyiségű ovulált ikramennyiséget adott. A 0,5 ml sperma /testtömeg kg esetében pedig az arány 2 418±635:1 volt. Elképzelhető, hogy a 10 órás időtartam alatt, amíg a spermiumok a petefészkeküregben tárolódtak a hal mozgásának hatására egyenletesen oszolhattak el a petefészkeküregben és ez okozhatta a kedvezőbb termékenyítési értékeket. Fontos kiemelni, hogy a kontroll és a kezelt halak, bár azonos spermaadaggal voltak termékenyítve, de a kezelés jellege miatt az ikrás halak beérésének ideje jelentős mértékben eltért a sperma injektált halakhoz viszonyítva. A kontroll halak hormonális indukcióra bekövetkező oocita érése a nappali időszakban ment végbe, míg azonos mennyiségű spermaadaggal kezelt, de spermajektált halak éjjel. Mivel természetes környezetben szaporodásbiológiai szempontból az afrikai harcsa (és a gazdaságilag jelentős halak döntő többsége) a kora reggeli órákban ívnak, így a kora délutáni provokált oocitaérést nehezítették az ellene ható stresszfaktorok. Éjjel ugyanis nyugalmi állapotban vannak a halak, így beérésük is nyugodtabb körülmények között mehet végbe. Ebből a szempontból a kontroll halak beérése – bár a kísérlettervezés ezt indokolta - gyakorlatidegennek tekinthető, emiatt az így kapott eredmények bizonyos fenntartásokkal kezelendők.

3.1.4. Mélyhűtött sperma felhasználása indukált ivatás esetén

Natív szemínális plazmával (centrifugált ponty szemínális plazma) hígítottuk a felolvasztott és centrifugált afrikai harcsa spermiumokat. A spermajektált halak mindegyikében sikerült ugyan termékenyülést kimutatni, a kelési százalék (18%) azonban elmaradt a kezeletlen kontroll csoport értékeitől (61%). A kísérlet során azért alkalmaztunk ponty szemínális plazmát, mert ez tűnt a legeredményesebbnek a spermagyűjtés jellegéből és előkísérleti eredményeink alapján. Az afrikai harcsa spermagyűjtése ugyanis a hasüregből eltávolított here macerációján alapszik. Ebben

az esetben a here szövetet fel kell sérteni, hogy a spermiumokat kinyerhessük, ugyanakkor nem lehet elkerülni, hogy más szöveti részek és vér ne kerüljön a gyűjtőcsövekbe. Ponty tejesekből viszont a spermát fejéssel nyerjük ki, így csak az esetleges bekerülő vizelet szennyezheti a mintát (katéteres fejéssel ez is kiküszöbölhető), így homogénebb és tisztább mintát kapunk. Először sikerült külső megtermékenyítésű halfajban mélyhűtött spermát felhasználni petefészki expozíció mellett, ami alapul szolgál (indukált) ívatásos módszer gyakorlati felhasználáshoz.

3.1.5. Az utódok genetikai sokszínűségének növelésének lehetősége

Programozott (fényritmussal szabályozott) ívás előtt transzgenikus tejesekből származó spermaadagokat juttattunk fel automata pipetta és üveg kapilláris segítségével előzőleg bódított vad ikrások petefészkebe. A sikeresen ívó pároknál az utódelőzítés eredménye alapján a transzgenikus spermából származó lárvák aránya ikrásonként 0 – 81,3% között mozgott, az átlag 36,1% volt. A fennmaradó lárvák az ívásban résztvevő apáktól származtak. A nagy szórás több, de eddig még nem pontosan azonosított okra vezethető vissza:

1) Egyes ikrásoknál az injektálást követően nyitva maradt a petevezető, amely utat engedett a vízkontaminációnak és ezzel együtt a spermaminőség csökkenésének.

2) Az ikrások szaporító és vizeletkiválasztó rendszerének anatómiai sajátosságai miatt az urogenitális nyíláson keresztül befecskendezett sperma a húgyvezetéken keresztül vizeletet képes „visszamosni”, ami csontos halakban rontja a sperma minőségét.

3) A spermiumok minőségében és a spermiumok alkalmasságában eddig még nem azonosított különbségek vannak, amelyek „spermiumversenyt” eredményeznek.

Kísérleteink eredményei alapján a genetikai változatosság valóban növelhető sperma petefészkekbe juttatásával (indukált) ívatásos szaporítás esetében. A módszert azonban optimalizálni szükséges (irányított spermafeljuttatás csak az egyik petefészek lebenybe, sperma: ikra arány beállítása stb.).

3.1.6. Sikeres utódlétrehozás ívás vagy ívatásos módszer alkalmazása során, tejes jelenléte nélkül

Nem figyeltünk meg spontán ikraszórást a kezeletlen halaknál. Kevés és terméketlen ikrát szórtak el azok a halak, melyek petefészek lebenyébe sóoldatot juttattunk. A petefészkekbe juttatott fiziológiás sóoldat ozmózis nyomása, vagy önmagában a halak kezelése (kifogás, altatás, beavatkozás) is okozhatta néhány folliculáris tok megrepedést és az ikrakiszabadulást. A petefészkekbe injektált spermával kezelt halakból statisztikailag igazolhatóan ($p < 0,05$) több ovulált ikraszemet lehetett nyerni és az elszórt ikratételek egy része termékenyült. A termelt ikra átlagos mennyisége: 16,1 ikra/ikrás (tejes nélkül) és 27,8 ikra /ikrás (tejesek válaszfallal), míg a

termékenyülési átlag: 12,6% (tejes nélkül) és 11,8 % (tejesek válaszfalal elválasztva). A kapott eredmények azt mutatják, hogy a nagyobb ovulációs rátát nem csak a halak kezeléséből adódó esetleges mechanikai ingerekkel lehet magyarázni, hanem abban fiziológiai okok is szerepet játszhattak. A kutatás újszerűsége miatt a témával kapcsolatos információink jelenleg korlátozottak, így csak feltételezésekre szorítkozhatok. Kimutatták például, hogy a perzsa tok (*A. persicus*) és a kaszpi sebes pisztráng (*S. trutta caspius*) sperma szemínális plazma különféle androgéneket tartalmaz, mint például tesztoszteront, 11-ketotesztoszteront, progeszteront és 17 α , 20 β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-ont. Ezek a hormonok - feltételezve, hogy a többi csontos hal sperma szemínális plazmájában is megtalálhatóak - a petefészekfalán keresztül felszívódva hatással lehetnek az ikrás halak vérenek hormonszintjére, esetleg a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengelyen keresztül bekapcsolódhatnak a neurohormonális szabályozási folyamatokba, így parciális ovulációt idézhetnek elő. Amennyiben a jövőben sikerül felderíteni ezeket a folyamatokat és megértjük a spontán oocita-felszabadulás specifikus mechanizmusait, akkor ezen ismeretek is hozzájárulhatnak a szaporítás fejlesztéséhez (hagyományos hormonkezelés kiváltás). Azok az ikrások, amelyek láthatták a tejeseket egy válaszfalon keresztül ívási sikerességük tekintetében (termelt ikraszám és termékenyülési százalék) statisztikailag igazolható módon nem különböztek a tejesek nélkül spontán ikraszórt társaikéhoz képest ($p > 0,05$). Tehát a tejesek vizuális jelenléte nem segített elő nagyobb arányú ovulációt.

Először sikerült „ívásból” termékeny ikrát nyerni külső megtermékenyítésű halból tejes közvetlen jelenléte nélkül.

3.1.7. Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek eredményei


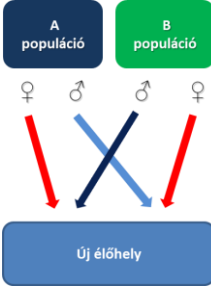
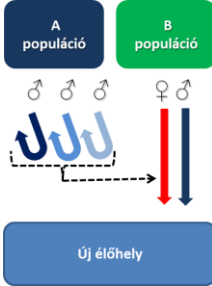
A vizsgált paraméterek (beérési idő, PGSI, termékenyülési %) nem mutattak statisztikailag igazolható különbséget a három csoportban ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey post hoc test). A beérési arányokban, habár különbségek mutatkoztak (1. csoport: 100%, 2. csoport: 85,7% és 3. csoport: 71,4%), de ezek nem voltak statisztikailag igazolhatók ($p > 0,05$).

3.1.8. A módszer felhasználásának lehetséges területei

3.1.8.1. Természetvédelmi célú halszaporítás

A degradált élőhelyeken szétaprózódott, kis állomány nagyságú populációk megsegítésére alkalmas, jól ismert stratégia új élőhelyek létrehozása és betelepítése. A genetikai sokféleség növelése érdekében két vagy több szomszédos-, zárt-, fragmentált beltenyésztett populációt lehet az újonnan létrehozott élőhelyre betelepíteni. A betelepítési stratégia párban ívó halfajok esetén lehet tradicionális állománymentés, amikor a két élőhelyről begyűjtött ikrásokat és tejeseket telepítenek

együttesen egy újonnan létrehozott élőhelyre. Az inszemináció a természetvédelmi célzatú állománymentés/*in situ* védelemben betöltött lehetséges előnyeit az 1. táblázatban foglaltam össze.

	Tradicionalis állomány mentés	Irányított szaporítás	Új módszerű szaporítás (sperma inszemináció)
Szaporítási/keresztezési stratégia	 <p>Random párválasztás, több a tejes</p>	 <p>Irányított keresztezés</p>	 <p>Több tejesből származó sperma az A populációból (sperma gyűjtést követően a tejesek visszatelepítése)</p>
Szülői génhozzájárulás az utódgenerációban (♀:♂)	1:1	1:1	1:1≤
Mentett élőhely I. generáció genetikai háttere (♀♂)	<p>Példa: 1 ikrás és 3-3 tejes esetén 2 lehetséges eset a 12 variációból:</p> <p>Ikrás A populációból; AA, AA, AA, AB, AB, AB</p> <p>Ikrás a B populációból; BB, BB, BB, BA, BA, BA</p>	<p>AB, BA</p>	<p>Példa: B populációból származó 1 ikrás és 1 tejes szaporítás, A populáció 3 különböző tejesből származó sperma részvétele mellett BA+BA+BA+BB</p>
Szülők száma: A populáció (♂♀) B populáció (♂♀)	<p>A♀ 1: A♂ >1 B♀ 1: B♂ >1</p>	<p>A♀ 1: A♂ 1 B♀ 1: B♂ 1</p>	<p>A♀ 0: A♂ 0 B♀ 1: B♂ 1</p>
Szülői génhozzájárulás az utódgenerációban (♀:♂)	1:1	1:1	1:1≤
Parazita átviteli esély	mindkét élőhelyről	mindkét élőhelyről	csak a B populáció élőhelyéről

1) Hagyományos halmentés esetén a kisszámú anyahal telepítés (amely még nem veszélyezteti az eredeti populációkat) az alacsony egyedsűrűség miatt kétséges eredményhez vezethet, ha az ikrások nem találnak alkalmas tejeseket és nem tudnak párba állni. A haltenyésztési gyakorlatban ivatásos módszer esetén nagyobb számú tejes betelepítésével igyekeznek növelni a párzási esélyt (ikrás:tejes = 1:2-5). További tejesek betelepítése azonban már kárt is okozhat, mert ez a származási populációban jelentős génkivonást eredményez. Mivel a párba rendeződést nem lehet irányítani, így amennyiben a két szülő azonos élőhelyről származik, akkor a rokonsági fok növekszik az utódgenerációban, emiatt csökken a szegregált/izolált populációk közötti egyesített

gécserre esélye. Egy másik lehetséges probléma lehet, ha a két populáció ektoparazita faunája különbözik és/vagy halak érzékenysége eltérő, mert így az újonnan létrehozott állomány parazita cserét is végrehajt.

2) Irányított, ellenőrzött szaporítás / szaporítási program hajtható végre például ívóketrec alkalmazásával és ellenőrzött szülő kiválasztással. Ebben az esetben megakadályozzák a véletlen párválasztást, így a szülők származási helyéről lényegesen kevesebb tejest kell kiválasztani. Az ellenőrzött ívási stratégia hátránya viszont, hogy az ebből eredő genetikai variabilitás továbbra is korlátozott, mivel az utódok genetikai állománya az eredeti élőhelyről kiválasztott szülők elérhetőségére és termékenységére korlátozódik. A parazita csere ebben az esetben is fellépő lehetséges probléma.

3) Az inszeminációs módszer alkalmazása esetén áttelepítéskor csak az egyik populációból van szükség anyahal állományokra. Irányított (ketreces) szaporítás esetén a másik populációból származó tejesekből csak egyszeri alkalommal spermagyűjtésre van szükség, majd a tejesek visszatelepíthetők. Fontos hangsúlyozni, hogy a tejesek 24 óra múlva ismét képesek az eredeti mennyiségben spermát termelni, így eredeti élőhelyükön is képesek lesznek részt venni az ívásban (nincs allélvesztés az egyik populációban!). Az előző két módszerrel szemben egy ikrás ikramennyiségét több tejes tudja megtermékenyíteni, így az utódok genetikai variabilitása jelentősen növelhető, ugyanakkor a klasszikus *ex situ* konzerváció kritikus pontjai csökkenhetnek, mint például a genetikai sokféleség elvesztése, beltenyésztéses leromlás, káros mutációk felhalmozódása, palacknyak hatás, genetikai degradáció. Mivel az alapító szülők egy állományból származnak, így nincs ektoparazita csere. A szakirodalomban ismert a taxonok közötti parazitacsere is, ami jelentős, populáció szintű problémát okozhat.

4) Vérfrissítés élőhelyen: Az inszemináció módszerének alkalmazásával lehetőség lenne az izolált, beltenyésztett populációk genetikai diverzitásának növelésére. Ebből a célból ívás előtt mintázott tejesekből kíméletes módon (bódítás) lehetne spermát gyűjteni, majd ivarsejt ellenőrzést követően rövid idejű tárolóedénybe helyezni (például az első 10 órán belül fenntartható a spermiumok termékenyítő képessége minőségvesztés nélkül, hűtőberendezésben/hungarocell dobozban jégágyon. A tejesek a bódításból „felébresztve” visszatelepíthetők eredeti élőhelyükre. Ezt követően a másik populációból kiemelt ikrások egyik petefészeklebenyébe lehet juttatni a gyűjtött spermamintát/spermamintákat. Az ikrások ikráérésének meghatározására alkalmas eszközök (katéteres oocita érettség vizsgálat) segítségével beazonosítható a várható szaporodás ideje. Amennyiben ez nem elegendő, úgy az ívás provokálható hormontartalmú szerekkel. Az ívó ikrás ikratétele így nem csak az ívásban résztvevő tejes fogja termékenyíteni, hanem a feljuttatott sperma is. Ezzel a módszerrel megnövekszik az utódgeneráció genetikai diverzitása. Mélyhűtött spermaminták használata is lehetséges (sperma génbank).

3.1.8.2. Gazdasági célú halszaporítás

Az új módszer alkalmazásának lehetőségét egyes esetekben gazdaságilag jelentős halfajok termelésnövelési-, tenyésztési célú szaporításában is látom. Hazánkban a gazdaságilag jelentős halfajok keltetőházi szaporításának alapja az *in vitro* termékenyítés (száraz termékenyítési eljárás). Az ívatásos módszer jelentősége kisebb. Kínában és más ázsiai országokban még mindig a tradicionális ívatásos módszerrel szaporítanak a legnagyobb mennyiségben. Ez azt jelenti, hogy ívató tavakban, medencékben, ketrecekben, úgynevezett hapákban, és kör alakú betonmedencékben hormonális indukcióval, de természetes úton hagyják szaporodni a halakat. A tengeri halak szaporításában ez szintén elterjedt módszer (pl. farkassügér, aranydurbincs (*Sparus aurata*) stb.). Szaporításuk szintén az ívatáson alapul, ahol az anyahalak felkészítését kizárólag a környezeti tényezők befolyásolásával (vízhőmérséklet, fényprogram mesterséges szabályozása) végzik. Az ívás vagy spontán módon következik be, vagy hormonkezeléssel segítik elő. A lebegő, megtermékenyített ikraszemek begyűjtését az ívató medence elfolyó vizére telepített ikrafogó berendezésekkel oldják meg. Mivel az ívató medencében az ikrások több tejjel is összeívhatnak, így irányított keresztezés (szűkebb értelemben vett tenyésztés) ezidáig csak korlátozott mértékben valósulhatott meg. Az általunk kifejlesztett módszerrel azonban ezekben az esetekben az ivararány megfordításával, egységnyi területről több termékeny ikra gyűjthető, irányított keresztezések hajthatók végre az ívató medencékben, a tömeges halszaporítást pedig a tervszerű tenyésztés alapjai válthatják fel. Nagy genetikai értékű tejesek spermájával több ikrás ikratételét is lehet egy időben termékenyíteni. Párban ívó halaknál a genetikai sokszínűséget is növelni lehet ezzel a módszerrel (ívás vagy ívatás előtt 5-10 tejesből származó spermaminta bejuttatása), amit gazdaságilag jelentős halfajoknál is alkalmazni lehet. Megoldható emellett a sperma manipulálása is (például mélyhűtött sperma alkalmazása) az indukált ívatásos módszernél. Az új módszer beilleszthető a keltetőházi szaporítási technológiába is, így egységnyi területről nagyobb mennyiségű termékenyült ikramennyiséget lehet előállítani, hiszen spermainjektálás esetén nincs szükség tejes állomány fenntartására.

Külső megtermékenyítésű halak esetében az eredményes íváshoz (hormonális indukció nélkül), vagy ívatáshoz (hormonális indukciót követően) minden esetben minimum egy ikrás és egy tejes jelenlétére van szükség. Amennyiben az ikrás halak képesek spontán ikraleadásra (sok pontyféle, süllő, angolna, stb), valamint az ovariális folyadék nem aktiválja a spermiumsejteket akkor íváskor/ívatáskor nincs szükség tejes jelenlétére, amennyiben az ikraszórás előtt (például hormonindukcióval egyidőben) spermát juttatunk a petefészekbe.

Bízunk abban, hogy a gyakorlatba hamarosan átültethetővé, és széles körben használhatóvá válik ez az újszerű szaporítási módszer

A hagyományos ivatás és petefészekmosási szaporítási módszerek közötti elméleti összevetés

	Hagyományos ivatás		Inszejmináció	
	Ivar arány ♀:♂	Egységnyi területről megtermelhető elvi ikramennyiség	Ivar arány ♀:♂	Egységnyi területről lehozható ikramennyiség
3 hal / egységnyi hely (kistörzses ivatás)	1:2	n	2:1	2n
5 hal / egységnyi hely (nagytrzses ivatás)	2:3	2n	3:2 vagy 4:1	3n, vagy 4n
Utódok genetikai sokszínűsége	limitált, véletlenszerű kombináció		ikrás oldaláról korlátozottan -, tejes oldaláról hatványozott mértékben növelhető	
Tenyésztési program mélyhűtött sperma felhasználása	korlátozott mértékben irányítható		irányítható	
	ivatás esetén nem megoldható		felhasználható	

3.2. Angolna spermamélyhűtés és mélyhűtött európai angolna és japán angolna ikrával végrehajtott hibridizáció

Módosított Tanaka hígító és 10% metanol védőanyag használatával először sikerült európai angolna mélyhűtött spermájával sikeres termékenyítési tesztek végrehajtani és élő lárákat létrehozni. Az első kísérleti ciklusban, a kontroll csoportban is tapasztalt alacsony termékenyülési érték (<1%) jelezte, hogy az ikrás felkészítése nem volt megfelelő. Az eredmények azt mutatják, hogy habár 50 éve sikeresen szaporítanak angolnát Japánban, még így sem lehet garantálni minden szaporítási ciklusban a jó minőségű ikrá és lárva nyeresét.

Ugyanakkor először sikerült édesvízben ivarérett tejesek felhasználásával lárva nyerni, így először bizonyítottuk, hogy habár a katadrom angolna természetes ívóhelye a tengervíz (Sargasso tenger), de nem szükséges sósvízi körülmény zárt rendszerben történő indukált ivarérelésükhöz.

A második kísérleti ciklusban európai angolna mélyhűtött spermájával való termékenyítés során magas arányban kaptunk deformált, rendellenesen fejlődő lárvaakat (kikelt deformált lárva száma / kelt lárva száma $\times 100 = 70,1 \pm 15\%$). Ez a jelenség nem általános a halsperma fagyasztása során, mert a mélyhűtés általában nem idéz elő lárvafejlődési problémát. A sperma a mélyhűtés folyamán ugyanakkor sok káros tényezőnek van kitéve, ebbe beleértve a membránsérülést, a védőanyagok

„szobahőmérsékleten” előidézett genotoxikus hatásait. Ezek a hatások hozzájárulhattak a nagyobb arányú rendellenesen fejlődő lárvához. Ki kell hangsúlyozni, hogy a nagy egyedi különbségek miatt a lárvatorzulások arányában nem volt statisztikailag igazolható különbség a kontroll csoport eredményeihez képest ($32,5 \pm 28\%$, $p > 0,05$), de feltételezzük, hogy nagyobb elemszám bevonása esetében már a különbségek már szignifikánsak lehetnek.

A genetikai vizsgálatok (PCR-RFLP, PCR-HRM) bizonyították a hibridek diploid jellegét, így az esetleges nagyszámú haploid, torz lárvák előfordulása is kizárható. Az általunk használt markerek (FSH Angolna F és FSH Angolna R) egyértelmű, gyors és olcsó detektálási lehetőséget nyújtanak a japán és az európai angolna fajok, továbbá azok hibridjeinek elkülönítésére is.

A hibridek embriófejlődése nem különbözött jelentős mértékben a kontroll japán angolna embrióktól. Így például lárvakeléskor mind a hibrid, mind a japán angolna lárvák hasonló szomitaszámokat mutatnak (57-58), jelezve, hogy a szomatogenezis hasonló mértékű, miközben a hibrid lárvákban pigmentáció volt észlelhető az ízületi redőben a japán angolna lárvákhoz képest. A megtermékenyítés után 34 órával sikeresen kikeltettük a lárvákat. Ebben a szakaszban normális szívverést figyeltünk meg. A második kísérleti ciklusban nem vizsgáltuk és hasonlítottuk össze részleteiben a lárvák ontogenetikus fejlődését.

3.2.1. Az angolna spermamélyhűtés felhasználásának lehetséges területei

Az angolna fajban végzett hazai spermamélyhűtési munkák alapul szolgáltak „üzemi” mennyiségű irkatételek termékenyítésére alkalmas technológia fejlesztéshez. Japán kutatók 2017-ben sikeres japán angolna spermamélyhűtési kísérleteket folytattak le 5 ml műszalmát alkalmazva, ahol hígító ASP volt, a védőanyag pedig metanol. Japánban, ahol az angolna tenyésztésének és fogyasztásának jelentősen nagyobb tradíciói vannak, további fejlesztésekre nyílik lehetőség e tématerületen is. Európai viszonylatban, habár először sikerült életképes utódokat nyerni mélyhűtött sperma felhasználásával, ennek gyakorlati alkalmazásához a faj indukált szaporítási technológiájában is el kellene érnie egy olyan szintet, hogy a benne rejlő lehetőségeket ki lehessen aknázni. Tisztában kell lenni a ténnyel is, hogy az angolna szaporodásbeli sajátosságainak köszönhetően a lárvagenezis ideje nagyon hosszú (~6-10 hónap), valamint a kontrollált körülmények között történő lárvatartás rendkívül bonyolult technológiai lépések sorozatát igényli (táplálkozás kontra kiváló minőségű tartásbeli körülmények fenntartása, ú.n. Kreisel nevelőedény használat, speciális paraziták – Vibriosis – elleni védekezés stb.). Jelenleg az európai fajban – irodalmi adatok alapján – a lárva nevelését nem sikerült két hónapnál túl megoldani. A speciális eszköz- és tudásigényű angolna lárvá zárt rendszerű nevelése a gazdaságossági szempontokat is figyelembevéve távolinak tűnik. A gazdaságilag jelentős halfajok esetében is megfogalmazódott, hogy termelésük volumene – kivéve a lazactenyésztést – még nem biztosítja azokat a speciális tenyésztői feladatokat, amelyeket a

spermamélyhűtés nagymértékben támogatni tudna. Kísérleti eredményeink jelentőségét így elsősorban nem a szelekciót elősegítő tenyésztői munkákban látom, hanem egyes, egyedi populációk megőrzésére irányuló ex situ konzervációbiológiai munkákban, ahol a spermamélyhűtés a géntartalékok megőrzésében nyújthat segítséget. Mivel a leírt módszert „tükörkísérletekben” a japán kutatók is sikeresen alkalmazták, így feltételezhetően a többi angolna fajban is eredményesen alkalmazható.

A hibridizációs kísérletek járulékos eredménye a két faj azonosítását elősegítő genetikai vizsgálatok kidolgozása volt. Említésre került, hogy már gyakorlatban is szükség volt ezt a módszert illegális ivadékszállítmány fajazonosítása érdekében felhasználni. Mivel a Távol-Keleten a faj gazdasági értéke jelentősebb, nagy keresleti piaccal rendelkezik, így nem zárható ki, hogy a jövőben is illegális ivadék szállítmányokat próbálnak majd becsempészni elsősorban Kínába, ahol felnevelve a japán piacra juttatják tovább. Nem csak az ivadékok illegális kereskedelme jelent azonban problémát, hanem az illegális úton beszerzett angolnák kijutása természetes vízrendszerekbe is. Például az Uono folyóból (Niigata Prefektúra, Japán) már kimutatható mennyiségben vándorolnak együtt az európai és japán angolnák az ívóhely felé. Növekedési képességük viszont erőteljesebb, mint az őshonos fajé, továbbá az is aggodalomra ad okot, hogy nem csak az ívási viselkedést módosítja a japán fajban (ívási vándorlás megindítása), hanem az ívóhelyeket elérő halak esetleg hibridizálódhatnak is. Ezentúl az ételmisszer eredet ellenőrzésben is szerepet játszhat a genetikai fajazonosítási vizsgálat.

4. Új tudományos eredmények

1. Egy új halszaporítási módszer kifejlesztésének alapjait tettem le. A módszer alapja, hogy külső megtermékenyítésű halfajok spermium sejtjei biológiai aktivitásukat megtartva, hosszabb ideig „tárolhatóak” a petefészek lebenyben indukált szaporítás (vagy szaporodás) előtt. Íváskor (ovulációkor) a gaméták együtt ürülnek, és vízaktivációkor bekövetkezik a termékenyülés.
2. Megállapítottam, hogy a sperma szemínális folyadék alkalmas hormonvívóanyag is lehet. A spermában diszpergált porított pontyhipofízis katéteres petefészek kezelése nyomán a kezelt halak ovuláltak, a petefészekbe juttatott spermiumok megtermékenyítették a vízaktivált ovulált ikrákat.
3. Meghatároztam a spermiumok életképességének idejét afrikai harcsa petefészek körülmények között *in vivo*.
4. Megállapítottam, hogy a természetben elő nem forduló gaméta egyesülés mesterséges körülmények között létrejöhet.
5. Elsőként igazoltam, hogy külső megtermékenyítésű fajokban íváskor/spontán ikraszóráskor a tejes közvetlen jelenléte nélkül is lehet utódot nyerni, amennyiben az ovulációt megelőzően spermát juttatunk az ikrások petefészeklebenyébe.
6. Először sikerült mélyhűtött európai angolna spermával sikeres megtermékenyítést végrehajtani és annak használatával életképes hibridet keltetni.
7. Kísérletes úton bizonyítottam, hogy a tengervízben szaporodó angolnák tejeseinek esetében nincs szükség tengervízi ivarérelésre, az édesvízben ivarérelt halak az eltérő ozmolalítású környezet ellenére is megtermékenyítőképes spermiumokat termelnek.

5. A dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények jegyzéke

- Müller, T., Horváth, L., Szabó, T., Ittész, I., Bognár, A., Faidt, P., Ittész, Á., Urbányi, B., Kucska, B. (2018). Novel method for induced propagation of fish: sperm injection in oviducts and ovary / ovarian lavage with sperm. *Aquaculture* 482, 124-129.
- Müller, T., Kucska, B., Horváth, L., Ittész, Á., Urbányi, B., Blake, C., Guti, Cs., Csorbai, B., Kovács, B., Szabó, T. (2018). Successful, induced propagation of African catfish (*Clarias gariepinus*) by ovarian lavage with sperm and hormone mixture. *Aquaculture* 485, 197-200.
- Müller, T., Szabó, T., Kollár, T., Csorbai, B., Marinović, Z., Horváth, L., Kucska, B., Bodnár, Á., Urbányi, B., Horváth, Á. (2019). Artificial insemination of African catfish (*Clarias gariepinus*) using cryopreserved sperm. *Theriogenology* 123, 145-150.
- Müller, T., Ács, É., Beliczky, G., Makk, J., Földi, A., Kucska, B., Horváth, L., Ittész, Á., Hegyi, Á., Szabó, T., Urbányi, B., Nguyen, N.G., Orbán, L., Havasi, M. (2020). New observations about fertilization capacity and latency time of sperm inseminated into ovary in African catfish (*Clarias gariepinus*) as an oviparous model fish. *Aquaculture* 522, 735109.
- Ittész, I., Kronbauer, E.C., Szabó, T., Horváth, L., Urbányi, B., Müller, T. (2020). Propagation of jundia *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) by applying the ovarian sperm injection method. *Aquaculture Reports* 16, 100275.
- Gazsi, Gy., Ivánovics, B., Berta, I., Szabó, T., Zarski, D., Kucska, B., Urbányi, B., Horváth, L., Müller, F., Müller, T. (2021). Artificial sperm insemination in external fertilised fish as a novel tool for *ex situ* and *in situ* conservation of valuable populations. *Endangered Species Research* 45, 169-179.
- Gazsi, Gy., Butts, I.A., Zadmajid, V., Ivánovics, B., Ruffili, L., Urbányi, B., Csenki, Zs., Müller, T. (2021). Ovarian inseminated sperm impacts spawning success in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) even in the absence of a male stimulus. *Theriogenology* 172, 315-321.
- Müller, T., Horváth, Á., Takahashi, E., Kolics, B., Decsi, K., Bakos, K., Kovács, B., Taller, J., Bercsényi, M., Horváth, L., Urbányi, B., Adachi, S., Katsutoshi, A., Yamaha E. (2012): Artificial hybridization of Japanese and European eel (*Anguilla japonica* × *A. anguilla*) by using cryopreserved sperm from freshwater reared males. *Aquaculture* 350-353, 130-133.
- Müller, T., Matsubara, H., Kubara, Y., Horváth, Á., Kolics, B., Taller, J., Stéger, V., Kovács, B., Horváth, L., Asturiano, J.F., Peñaranda, D.S., Urbányi, B. (2018). Testing cryopreserved European eel sperm for hybridization (*A. japonica* × *A. anguilla*). *Theriogenology* 113, 153-8.

6. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Urbányi Béla, Prof. Horváth László, Prof. Mézes Miklós professzor uraknak a szakmai-, financiai, erkölcsi támogatásért, melyek nélkül sem a bemutatott munka, sem a dolgozat nem készülhetett volna el! Ezúton szeretném őszinte köszönetemet kifejezni Dr. Szabó Tamás, Dr. Kucska Balázs, Dr. Ittész István uraknak, akik a „magjai” voltak az új típusú halszaporítási munkák kezdeti lépéseinek kidolgozásában, Prof. Bercsényi Miklósnak, Prof. Horváth Ákosnak, Dr. Kolics Balázs, Dr. Kovács Balázsnak, Gazsi Gyöngyinek, Berta Roberta Izabellának, Bodnár Ádámnak, Ivánovics Bencének, Ittész Áronnak, Dr. Havasi Máténak, Dr. Beliczky Gábornak, Prof. Ács Évának, Dr. Földi Angélának, Makk Juditnak, Prof. Orbán Lászlónak, Dr. Csorbai Balázsnak, Dr. Hegyi Árpádnak akik magyar oldalról segítettek az angolnás- és új típusú szaporítási munkákat! Köszönettel tartozom a dolgozatban leírt kísérletekben nyújtott segítségért számos külföldi munkatársnak: Prof. Etsuro Yamaha, Prof. Katsutishi Arai (Hokkaido University, Japán), Prof. Hajime Matsubara (Tokyo University of Agriculture / Kanazawa University, Japán), Prof. Juan F. Asturiano (Universitat Politècnica de València, Spanyolország), Dr. Ian A.E. Butts (Auburn University, USA), Dr. Vahid Zadmajid (University of Kurdistan, Irán), Mr. Luca Ruffilli (University of Bologna, Olaszország), Dr. Daniel Zarski (Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences, Lengyelország), Mr. Blake Chris (Swansea University, Egyesült Királyság), Mr. Ernani C. Kronbauer (AcquaViva Piscicultura, Brazília). Szeretném megköszönni PhD hallgatóim (Dr. Kolics Balázs, Dr. Demény Ferenc, †Buza Eszter, Dr. Tatár Sándor, Dr. Varju-Katona Milán, Nguyễn Ngọc Quyên), tanszéki munkatársak és dolgozók (MATE Akvakultúra és Környezetbiztonság Intézet halasai), graduális hallgatók segítségét, akik a kutatásaim egyes szakaszaiban segítettek, hogy idáig eljuthassak! Külön szeretném megköszönni Dr. Staszny Ádámnak és Ivánovics Bencének a segítségét, akik segítettek az ábrák elkészítésében, valamint a kézirat formázásában, javításában!

Az egyetemi források mellett célzottan az inszeminációs és angolnás munkákat a következő pályázatok támogatták: OTKA (NKFI_K_135824 és OTKA PD 73466), MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (2007-2010 (I.) és 2012-2015: BO 54/12/4 (II.)), Japán-Magyar Tét (TÉT_10-1-2011-0066567), Török-Magyar Tét (2020-1.2.4-TÉT-IPARI-2021-00011), The Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund (No: 162512761 (I.) és No: 12252178 (II.)), Kutatási és Technológiai Innovációs Alap (KMR_12-1-2012-0222), Balatonkutató Alapítvány, Haltudományok Fejlesztéséért Alapítvány, Állattenyésztés Tudományok Fejlesztéséért Alapítvány, amiért e helyen is köszönetet mondok.

Külön köszönettel és hálával tartozom Feleségem-, Fiaim-, Szüleim-, Testvérem-, Rokonaim-, és Barátaim türelméért, rendíthetetlen támogatásukért!