

## MTA doktori értekezés opponensi véleményére adott válasz

Jelölt: Dr. Müller Tamás

Értekezés azonosítója: dc\_1972\_21

Értekezés címe: Keltetőházi halszaporítási gyakorlattól eltérő új- és újszerű módszertani eljárások

Opponens: Dr. Eszterbauer Edit, az MTA doktora

Tisztelt Opponens Asszony!

Mindenekelőtt köszönöm doktori értekezésem tárgyilagos és építő jellegű bírálatát, támogató véleményét!

*„A felsorolt közleményeken kívül, számos, a Jelölt első- vagy társszerzőségével megjelent cikk kapcsolódik közvetlenül az ismertetett kutatáshoz (...) érdemes lett volna a dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények között felsorolni az általános irodalomjegyzék helyett. Véleményem szerint a kutatási folyamat bemutatásának ezek a munkák is fontos részét képezik, és a kutatás íve, időbeli egymásra épülése, valamint főbb mérföldkövei a saját közlemények jegyzékében is jobban tükröződtek volna ezáltal.”*

Valóban, az angolna hormonálisan indukált ivarérelésével kapcsolatban több saját publikáció is megjelent a PhD megszerzését követően. Igyekeztem nem mozaikos, az angolna szaporodásbiológián belül is több altématerületet felölelő dolgozatot írni. Így mérlegelést követően úgy szűkítettem a felhasznált dolgozatok számát, hogy logikailag egységes témát öleljenek fel. Az „irodalmi áttekintésen” belül jelezni szándékoztam, hogy a kiválasztott tématerület (európai és japán angolna hibridizációs kísérletek mélyhűtött sperma felhasználásával) nem előzménynélküli kutatások, egyes elemeinek kidolgozására már korábban történtek kísérletek (például hímivarú angolnák ivarérelése édesvízben).

A helyesírásra, értelmezési pontatlanságokra, az előforduló zavaró megfogalmazásokra adott kritikai megjegyzések jogosak, elkerülhető hibáimért elnézést kérek. A jelzett hivatkozás (Shaliutina-Kolešová et al., 2016) pontyra vonatkozik és valóban nem tartalmazza az irodalomjegyzék.

*KÉRDÉS: A halak szaporodásának szabályozása alfejezetben (2.1.3.) felvetett evolúciós hipotézis nagyon érdekes. Mit gondol, az édesvízi és tengeri halak evolúciós szintű környezeti adaptációja között voltak-e/lehettek-e különbségek, és ha igen, milyenek? Ebből a szempontból hogyan látja a kataróm vándorló fajok (mint például az angolna) kialakulásához vezető, feltételezett adaptációs folyamatot?”*

A kérdést többféle aspektusból és többféle szinten is meg lehet közelíteni. A dolgozatban az állt, hogy „a fajok igénye az ívási környezet iránt a filogenezis során alakult ki, azáltal, hogy az adott fajra nézve mely környezet kedvezett leginkább az utódok túlélésének, a faj fennmaradásának” (11 oldal.). Amennyiben a szaporodási szokásokra, az ívási szubsztrátum

helyére és minőségére, anyagsere és oxigénviszonyokra, ragadozók elleni védelemre vonatkozóan közelítjük meg a kérdést, úgy a Balon-féle koncepcióban (Balon féle szaporodási közösségekbe (guilds) sorolás, Balon, 1981) vázoltak adnak megközelítő választ az édesvízi és tengeri halfajok evolúciós szintű környezeti adaptációja közötti eltérésekre, valamint az átfedésekre. Például hasonló reprodukciós „fülkébe” sorolódik a katadrom angolna, a tengeri halfajok túlnyomó többsége és például az édesvízben szaporodó garda (*Pelecus cultratus*) és amur (*Ctenopharyngodon idella*); nem ivadékgyógyító, nyílt szubsztráton ívó pelagofil fajok. Azonban vannak olyan olyan, speciális szaporodási guildok, amelyek kizárólag tengeri halakra jellemzőek; például nem ivadékgyógyító ivadékgyógyító aeropszammofil, a kaliforniai grunion (*Leuresthes tenuis*) a dagályok vízvonala fölött-, nedves homokpadokra ívó faj. Másik példa az ivadékgyógyító fészkekben ívó aktiniariofil csoportba tartozó közönséges bohóchal (*Amphiprion ocellari*), amely tengerirózsákat használ ivadékbölcsőnek. Természetesen ilyen specializált szaporodási mód az édesvízi fajoknál is előfordul, amelynek nincs tengeri hal megfelelője; például az ivadékgyógyító fészkekben ívó afrofil (buborékfészkek) csoportba tartozó sziámi harcoshal (*Betta splendens*).

Másfelől a két élettér eltérő tulajdonságai alapvetően határozzák meg a környezeti adaptációt. Az élet több milliárd évvel ezelőtt az óceánban kezdődött, a korai halak mind sósvízi körülmények között fejlődtek ki. Idővel ezek közül az óceánlakó élőlények közül néhányan képesek voltak kihasználni a még kiaknázatlan erőforrásokkal rendelkező édesvízi folyókat és tavakat. Az édesvizetbe való költözés azt jelentette, hogy alkalmazkodniuk kellett az új környezetükhöz, ami a fajok differenciálódásához is vezetett. Míg a tengervizek a Föld felszínének több mint 70 százalékát borítják, az édesvíz csak 1 százalékát. Meglepő módon azonban a 30 000 halfaj 40 százaléka édesvizekben él. A folyamatosan változó környezet és a tengeri környezethez viszonylatában kis édesvízi élőhelyeken belüli könnyű földrajzi elkülönülés az édesvízi halak nagyfokú diverzitását eredményezte. Az állandóan változó környezet arra is kényszerítette az édesvízi halakat, hogy egyre jobban alkalmazkodjanak a környezetükhöz. Ehhez képest a sósvízi halak viszonylag stabilabb, nagyobb óceáni környezetben tudtak boldogulni. Ezért az édesvízi halak általában jobban alkalmazkodnak a vízparaméterek szélesebb skálájához, mint a sósvízi halak. Szaporodást tekintve az édesvízi halak többségének (jelentős számú kivétel is akad, lásd Balon 1981) az ikrájuk ragados, ívási szubsztrát szükséges a szaporodásukhoz, ezzel szemben a tengeri halak jelentős része pelágikus ikrával szaporodik, amit a tengeri áramlatok tartanak lebegésben. A tengeri halak lárvái átlagosan kisebbek a kikeléskor, nagyobb mortalitási aránnyal, magasabb az úgynevezett súlyspecifikus légzési arányuk, lárvafejlődésük hosszabb, mint az édesvízi lárváké (Houde, 1994). A tengeri halak esetében az ívóhely megválasztása lehet az egyetlen eszköz arra, hogy kielégítsék az ikrától a fiatal korig tartó túlélés-, valamint a különböző élőhelyeken való szétszóródás kettős szükségletét. Miközben minimalizálják a ragadozók okozta veszteségeket és maximalizálják az elérhető táplálékfelvételt. A genetikai felépítés/meghatározottság (embrió-, és lárvafiziológiája, evolúciós kialakulás, az ívási stratégiák genetikai alkalmazkodásának határai) korlátozza a populáció adaptív genetikai változásainak sebességét és irányát a generációk során; vagyis a mikroevolúciós változások lehetőségét. Így ezek intenzitása fordítottan arányos az ívási és fejlődési fázisokat szabályozó tulajdonságokhoz kapcsolódó genetikai diverzitás szintjével (Ciannellie et al., 2015).

Angolnákkal kapcsolatban tudjuk, hogy az evolúció során kialakult egy fotofób aljzaton táplálkozó és élő haltaxon az Elopomorpha (tarponok és angolnák öregrendje), amely eredetileg az óceáni viszonyok között élt. A későbbi korokban ebből az eredetileg sztenohalin tengeri hal csoportból kivált egy limitált létszámú csoport az ún. édesvízi angolák (*Anguillidae*) családja (Aoyama 2009), amely a szaporodás szabályozási mechanizmusát konzervatívan megtartva (szaporodás a trópusi óceánok pelagiális régióiban) katadróm tulajdonságokat szerzett (elsősorban az eurihalin ozmoreguláció képességét). Bonyolult életciklusa során képessé vált

bizonyos életszakaszokban édesvíz élőhelyek (habitatok) meghódítására is (Horváth et al., 2018). A szaporodási vándorlás célja az atlanti angolnafajok az európai angolna (*A. anguilla*) és az amerikai angolna (*A. rostrata*) esetén a Sargasso-tenger 17 C°-os hőmérsékleti izoterma vonallal behatárolt ősi trópusi ívóhelyeinek elérése. Ezt a tengert nagy átlátszósága miatt „sivatag az óceán közepén” jelzővel is illetik, ezért a fény igen mélyre képes lehatolni. Ebben a régióban a különböző óceáni áramlatok hatására lassú köráramlás alakul ki. Tavasszal-nyáron a napfény hatására ez a hatalmas víztömeg felmelegszik, az intenzív párolgás miatt sótartalma megnövekszik, ezért a felszíni, oxigéndús vízréteg lassan lefelé áramlik, amelynek hatására az asszimiláció eredetű oldott oxigénben gazdag víztest a pelágiában ívó, lebegő ikrájú halfajok számára ideális ívóhely lehet.

A vándorlás alatti hőmérsékletnél lényegesen magasabb környezeti hőmérséklet az ívóhelyen fokozza az anyagcsere folyamatokat, ennek következtében pedig az energia igényes vitellogenézis felgyorsul. Az angolna feltételezett szaporodási területének legfontosabb becült fizikai-kémiai paraméterei 200 m-es mélységben, ahol feltehetőleg ívnak (Aarestrup et al. 2009, Aida et al. 2012): 17-19 C°-os vízhőmérséklet, 36 PSU feletti sótartalom (practical salinity unit: vízbeszárítással meghatározott sókoncentráció). A magasabb hőmérséklet az anyagcsere intenzitás növekedésén keresztül ösztrogén hatásra elindítja a májban a vitellogenin szintézisét, ami a vérárammal a már strukturálisan fogadókész oocitáig jut, ahol megkezdődik a nagy méretbeli növekedéssel járó vitellogenézis. Az angolnák ívására, feltehetően a teljes holdfényhiány idején, az újhold holdfázisban kerül sor. Az elképzelések szerint az ősi ívóhely az afrikai és dél-amerikai kontinens között helyezkedhetett el, ami fokozatosan vándorolt mai helye felé, ezt pedig a halak is követték.

- Aarestrup K., Rkland F., Hansen M., Righton D., Gargan P., Castonguay M., Bernatchez L., Howey P., Sparholt H., Pedersen M., Robert S., McKinley R. (2009). Oceanic spawning migration of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Science* 325, 1660.
- Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, T. (2003). Eel biology. *Science Springer V.* 1–472. pp.
- Aoyama, J. (2009). Life history and evolution of migration in catadromous eels (Genus *Anguilla*). *Aqua-BioSc Monogr* 2(1): 1–42.
- Balon, E. K. (1975): Reproductive guilds of fishes: A proposal and definition. *Journal of the Fisheries. Research Board of Canada* 32(6):821-864. p.
- Balon, E.K. Additions and amendments to the classification of reproductive styles in fishes. *Environ Biol Fish* 6, 377–389 (1981).
- Ciannelli, L., Bailey, K., Olsen, E.M. (2015). Evolutionary and ecological constraints of fish spawning habitats, *ICES Journal of Marine Science*, 72 (2), 285–296,
- Horváth, L., Mézes, M., Bodnár, Á., Csorbai B., Urbányi, B., Müller, T. (2018). Az édesvízi angolnák (*Anguilla* sp.) szaporodásának környezeti szabályozása. *Pisces Hungarici* 12, 95–110.
- Houde, E. D. (1994). Differences between marine and freshwater fish larvae: implications for recruitment *ICES Journal of Marine Science* 51, 91–97.

A halszaporításban használt beavatkozásokban pontosításokat köszönöm.

KÉRDÉS: A szakirodalmi adatok összehasonlíthatók-e a hormonmennyiség szempontjából, és a bejuttatási módok hatékonysága összevethető-e a hormonmennyiségek figyelembevételével?

Bizonyos fenntartásokkal lehet csak összevetni az adatokat. Egyfelől a mesterséges hormon analóg készítmények gyártási módja, keverési aránya, tárolási módja nagyban befolyásolja a mennyiségfüggő hatékonyságukat (küszöb érték elérése) az alkalmazás pillanatában. Természetes gonadotrop hormon készítményeknél a gyűjtés időpontja, a donor halak faja és ivari állapota, a preparálás módszere szintén jelentősen befolyásolja fiziológiai hatásukat. Másfelől a szaporítandó halak felkészültségi állapota (oocita fejlettségi fázis és szinkronizáció a hormonkezelés pillanatában), egészségi állapot, tartási körülmények (vízhőmérséklet, vízminőség, stresszmentes tartási körülmények, csoportos vagy egyedi tartás stb.) nagyban befolyásolják a hormonkezelésre adott választ (parciális ovuláció, elhúzódó beérés, alacsonyabb termékenyülés stb.). Az összevetést akkor lehet kellő alaposággal vizsgálni, amikor ugyanolyan eredetű, nevelésű és felkészültségű szaporítóállományt kezelnek egy adott hormonzkészítménnyel. Az alábbi táblázatban (1. táblázat) látható ilyen összehasonlító vizsgálatok.

Faj	Intraperitoneális	Intramuskuláris	Petefészekmosás	Inszemináció	Forrás
	<i>5mg pontyhipofízis / testtömeg kg (beérési arányok)</i>				
	16,7 %	100 %			
	<i>5mg csatornaharcsa hipofízis / testtömeg kg (beérési arányok)</i>				
<i>Balantiocheilos melanopterus</i>	50 %	100 %			Lipscomb et al., 2018
	<i>0,5 ml Ovaprim / testtömeg kg; Ovaprim: 20 µg lazac gonadotropin-releasing hormon és 10 mg/ml domperidon (beérési arányok)</i>				
	83,3 %	83,3 %			
	<i>I. 1 pellet Ovopel / 2 ml vívőanyag / testtömeg kg; Ovopel: 10 µg GnRH-a (D-Ala6, Pro9NEt-mGnRH + 20 mg metoklopramid (kelési arány)</i>				
<i>Clarias gariepinus</i>	66,7 ± 9,3 %	55,1 ± 16,1 %	63,4 ± 9,0 %	39,1 ± 18,3 %	Kucska et al., 2022
	<i>II. 1 pellet Ovopel / 2 ml vívőanyag / testtömeg kg; Ovopel: 10 µg GnRH-a (D-Ala6, Pro9NEt-mGnRH + 20 mg metoklopramid (kelési arány) II.</i>				
		61,9 ± 12,0 %		35,1 ± 21,2 %	
	<i>I. 0,5 ml ovaprim / testtömeg kg; Ovaprim: 20 µg lazac gonadotropin-releasing hormon és 10 mg/ml domperidon, (kelési arány)</i>				
<i>Clarias gariepinus</i>	60,30 ± 0,80 %	72,83 ± 3,39 %	77,23 ± 1,23 %		Okomoda et al., 2023
	<i>II. 0,5 ml ovaprim / testtömeg kg; Ovaprim: 20 µg lazac gonadotropin-releasing hormon és 10 mg/ml domperidon, (kelési arány)</i>				
		82,27 ± 2,17 %		81,80 ± 4,19 %	

1. táblázat. Különböző szerzők adatai azonos hormonmennyiségek különböző hormonbejuttatási módszereinek hatására egyes reprodukciós paraméterekre.

A kísérleti adatokból kiolvasható, hogy a cápamárna (*B. melanopterus*) intramuskuláris kezelés során 100%-os beérést értek el függetlenül a hipofízisdonor halfajtól azonos hormonmennyiség mellett. A hasüregi kezelés alkalmával a pontyhipofízissel kezelt halak lényegesen alacsonyabb beérési aránnyal reagáltak a csatornaharcsa hipofízis kezeléshez képest. GnRH analóg és dopamin receptor antagonistá kezelés a hormonkezelési helytől függetlenül azonos hatékonyságú volt.

Afrikai harcsa indukált szaporítás módszerénél (hormon: emlős GnRH-a + metoklopramid) vizsgáltuk, hogy a hormon bejuttatási módszerek milyen mértékben hatnak a termékenyülési értékekre (Kucska et al., 2022). Az eredményeink alapján a NaCl vívőanyagú kezelések között függetlenül az alkalmazott eljárástól (intramuszkuláris, intraperitoneális vagy petefészekmosás) nem volt statisztikailag igazolható különbség a mért szaporodásbiológiai paraméterekben (pszeudo-gonadoszomatikus index, termékenyülési érték), míg a sperma vívő anyag és inszeminált halak értékei statisztikailag igazolható módon elmaradtak a többi csoporttól.

Okomoda et al. (2023) vizsgálatai alapján az intraperitoneális kezelést követően termékenyített ikratételekben átlagosan alacsonyabb arányban keltek ki az utódok, mint az intramuszkuláris és petefészekmosás során nyert csoportok között (alkalmazott hormon: lazac gonadotropin-releasing hormon + domperidon). Ráadásul a hematológiai paraméterek vizsgálata során úgy találták, hogy az intraperitoneális beadási eljárás nagyobb stresszt váltott ki, mint az intramuszkuláris vagy a petefészekbe történő beadás ( $p < 0,05$ ). Egy másik kísérletsorozatukban, szemben a mi eredményeinkkel, az inszeminációs módszer 24 órás petefészki tárolást követően és az in vitro izomközi kezelés kelési értékekben nem mutatott statisztikailag igazolható különbséget ( $p < 0,05$ ).

Kucska, B., Quyen, N.N., Szabó, T., Gebremichael, A., Alebachew, G.W., Bógó, B., Horváth, L., Csorbai, B., Urbányi, B., Kucharczyk, D., Keszte, Sz., Müller, T. (2022) The effects of different hormone administration methods on propagation successes in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture Reports* 26, 101311.

Lipscomb, T.N., Wood, A.L., DiMaggio, M.A., Tuckett, Q.M., Lawson, L.L., Watson, C.A., 2018. Evaluation of spawning aids and administration routes on ovulation success in an ornamental cyprinid. *Aquac. Res.* 49, 3926–3929.

Okomoda, V.T., Amighty, R.O., Bem, T.M., Amaantimin, J., Nurizzati, I., Koh, I.C.C., Abol-Munafi, A.B., Ikhwanuddin, M. (2023). Ovarian lavage method as an alternative route for hormonal administration and short-term sperm storage in *Clarias gariepinus*. *Theriogenology* 198, 203-209.

**KÉRDÉS:** *Mivel a legtöbb kísérlet élő állatokon zajlott, hiányoltam az állatkísérleti engedélyek említését, valamint a genetikailag módosított, transzgenikus zebraadánió vonal (Tg-2.4shh:gfpABC) esetében a GMO engedély feltüntetését.*

A (transzgenikus) zebraadánióval végzett kísérleteket a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet zebraadánió laborjában végeztük. A labor rendelkezik a szükséges engedélyekkel; (1) Engedély géntechnológiai módosítást végző létesítmény létrehozására: SF6-6/2014, (2) Engedély géntechnológiával módosított szervezet zárt rendszerben történő felhasználására: SF6-8/2014. A dolgozatban ezeket meg kellett volna említeni.

**KÉRDÉS:** *A sperma minták minőségellenőrzése során a hímivarsejtek számának számtani közepét vették alapul (18. old. 2.2.2.2. alfejezet).*

Igen, így történt.

**KÉRDÉS(ek):** *Általában mennyi párhuzamos sperma minta alapján számoltak átlagot és történt a minőségellenőrzés? Az afrikai harcsán, mélyhűtött spermával végzett, inszeminációs kísérlet esetében a spermaminőség ellenőrzése két minta alapján történt. Elegendőnek bizonyult ez az valóságot tükröző állapot becsléséhez?*

Általában 3-6 ismétlés alapján becsülünk sperma motilitás értéket a kísérleteinkben. A dolgozatban egy esetben használtunk CASA rendszert spermaminőség feltáráására. Ebben az esetben két mintából történt a pontos adat meghatározás és ez számunkra elegendő volt (valamint a folyóirat bírálati folyamatain sem történt erre kritikai megjegyzés). Fontos kiemelni, hogy a kísérletben nem volt cél a pontos sperma minőség meghatározás, hanem a kísérlet jellege alapján eldöntendő kérdések alapján minősítettük a különböző fajokból származó szeminális plazmákat. A kérdés az volt, hogy pontyból vagy afrikai harcsából kinyert szeminális plazmát fogunk felhasználni a felolvasztott mélyhűtött sperma minták szeminális plazma cseréjéhez.

„A 2.3.6. alfejezetben az afrikai harcsán, mélyhűtött spermával végzett inszeminációs kísérletek eredményének tárgyalásakor említi, hogy a fajazonos szemínális plazmával kezelt spermaminták motilitási értékei elmaradtak a ponty szemínális plazmával kevert mintákeitól. Ez számomra, laikusként, meglepőnek tűnik.” KÉRDÉS: Mit gondol, mi lehet ennek a magyarázata?

Az afrikai harcsa hím ivarszerv felépítési sajátossága miatt nem fejéssel gyűjtik a spermát. A here és az ondóvezetés között helyezkedik el a harcsaalakúak rendjére jellemző szerv, a szemínális vezikulum, amely egy nagyon viszkózus váladékkal vonja be a spermiumokat. Ez a harcsafajok sajátos ívási viselkedésével áll kapcsolatba (íváskor a tejesek sokszor kis adagú ikratételeket termékenyítenek bonyolult párzási viselkedés közben). A spermagyűjtés – labor és terepi szaporításnál egyaránt – post mortem történik, és a kioperált herét megvágva a spermát a heréből közvetlenül nyerjük ki préseléssel. Ebben az esetben elkerülhetetlen, hogy a sperma (érett spermiumsejtek és szemínális plazma) mellett más szöveti eredetű anyagok (vér, here szövet darabok és szövetplazma, a spermogenezis korábbi szakaszaiban álló ivarsejtek) kerüljenek a gyűjtött mintába. Ebben az esetben a spermagyűjtéssel bejutott más eredetű szöveti törmelék befolyásolhatja a kinyert szemínális plazma tulajdonságait. Ezzel szemben pontyfélékbe tartozó fajoknál a here közvetlen kapcsolatban áll az ondóvezetékkel, ami a külvilágra juttatja a spermát. Így fejéssel spermát (spermiumsejtek és szemínális plazma) nyerünk, esetleges rossz technikai módszert alkalmazva kisebb mennyiségben vizelet keveredhet be. A centrifugált szemínális plazma biológiai sajátosságai jóval közelebb állnak a természetes állapothoz, mint az afrikai harcsa esetében. A pontos különbségeket feltárásához további vizsgálatok szükségesek.

„A kísérletek során többféle altató és bódító hatású szert használtak a halak kezelése előtt: MS222-t, Norcaine-t (benzokain), szegfűszegolajat (eugenol), vagy éppen a tartósítószerként ismert fenoxietanolt.” KÉRDÉS(ek): Miért volt szükség többféle bódítószer alkalmazására? Melyik szert találták a leghatékonyabbnak és legmegbízhatóbbnak?

Kísérleteinket különböző halfarmokon és különböző tanszékek hallaborjaiban végeztük. Az ott alkalmazott halkezelési protokollokba nem avatkoztunk be, igyekeztünk a helyi halszaporítási módszertanba beilleszteni az inszeminációt, mint kezelést. A bódítás, altatás időigénye sok tényezőtől függ (oldatnak használt víz fizikai-kémiai tulajdonságai elsősorban vízhőmérséklet, az oldat oldott oxigéntartalma, ezentúl a használt halak faja, mérete (kopoltyúfelület), kondíciója stb.), de általánosan nem volt számottevő hatáskülönbség (alkalmazás során elhullást nem tapasztaltunk) az alkalmazott bódítószerek között.

Idézet a 2.4.5. alfejezetből: „Kísérleteink eredményei alapján a genetikai változatosság valóban növelhető sperma petefészekbe juttatásával (indukált) ivatásos szaporítás esetében. KÉRDÉS: Miért javasolja azt, hogy az inszemináció csak az egyik petefészek lebenybe történjen, ne pedig mindkettőbe?

*In vitro* fertilizációs kísérleteink alkalmával amennyiben az inszeminált ikrás halak lefejt ivarsejteihez (spermium és ikra együttesen) további tejesekből származó frissen fejt spermát is adagoltunk, azzal a termékenyülési értéket nem lehetett növelni (2.3.1., 2.3.2., 2.3.6. fejezetek). Ahogy a 2.3.5. fejezetben is megfogalmaztam inszemináció esetén „(...) az ovulált ikraszemek

felszínén közvetlenül a mikropüle régióban számos spermiumsejtet figyeltünk meg. Elsőként igazoltuk, hogy egy valódi külső megtermékenyítésű halfajban a Munehara et al. (1989) által korábban leírt, úgynevezett „belső ivarsejt egyesülés” létrejöhet, annak ellenére, hogy természetes körülmények között a két ivar között nincs közvetlen kapcsolat – közvetlen spermabejuttatás a női belső ivarszervekbe – az ivás során (10. ábra). A folyamat alapja, hogy a petefészekben a spermiumok az ovulált ikraszemek mikropüle régiójához vándorolnak vagy sodródnak, illetve egyes sejtek a mikropülén behatolva egészen az ooplazmáig hatolnak.” Feltételeztük, hogy a friss hozzáadott spermából származó spermiumsejtek már nem tudtak fizikailag olyan közel kerülni a mikropüle régióhoz (inszeminált spermiumsejtek fizikai akadályt képeztek), hogy termékenyíteni tudjanak. A feltételezésünket megerősítette az az ivatásos kísérlet, amelyet a dolgozat leadását követően végeztünk el (Quyen et al., 2022). Ebben az esetben petefészeklebenybe juttattunk fel spermát (*Heterobranchus longifilis* sperma inszemináció afrikai harcsa ikrásokba), majd fajazonos tejesekkel ivatva (afrikai harcsa tejes) az utód generációban a hibridizáció 95-100 % volt. Így, ha mindkét petefészeklebenybe juttattunk fel spermát, az ivásban résztvevő tejeseknek nincs lehetősége termékenyíteni és az utódgeneráció genetikai diverzitását növelni.

Ezzel szemben a zebraadániós kísérletben, ahol az inszemináció nem irányítottan történt, a genitális nyílás közepébe juttatva a spermát, a spermiumsejtek véletlenszerű arányban és mennyiségben oszlottak el a jobb és bal petefészek lebenyben. Emiatt az ovulált ikraszemek egy részét nem az ivás előtt inszeminált spermiumok termékenyítették, hanem az ivásban résztvevő tejesekből származó spermiumainak is volt lehetősége „szabad” ikratételeket találni.

Összegzésképpen, amennyiben csak az egyik petefészeklebenybe juttattunk fel több tejestől származó kevert spermát, ebben az esetben van lehetőség az ivásban résztvevő tejesnek is hozzájárulni az utódgeneráció kialakításához.

Munehara, H., Takano, K., Koya, Y., 1989. Internal Gametic Association and External Fertilization in the Elkhorn Sculpin, *Alcichthys alcicornis*. *Copeia* 1989, 673.

Quyen, N.N., Alebachew, G.A., Kucska, B., Kovács, Gy., Halasi-Kovács, B., Ferincz, Á., Staszny, Á., Horváth, L., Urbányi, B., Müller, T. Practical application of inseminated sperm method for production of interspecific hybrids (*Clarias gariepinus* × *Heterobranchus longifilis*). *Aquaculture Reports* 27, 101418.

*A 13. táblázat (59.old.) szemlélteti a hagyományos ivatás és az inszeminációs szaporítási módszerek közötti főbb különbségeket. KÉRDÉS(ek): Hogy látja, milyen szinten épülhet be az inszeminációs módszer a hazai halszaporítási gyakorlatba? Milyen feltételek teljesülése szükséges a rutinszerű alkalmazáshoz?*

Dolgozatomban modell kísérleteken keresztül mutattam be az inszemináció, mint külső megtermékenyítésű halak új halszaporítási módszerének sajátosságait. A gyakorlatba bevezetést megkezdttük, például a módszer bemutatásra került egy sor olyan szakmai fórumokon is, ahol nem csak a tudomány képviselői vettek részt, hanem a termelői szféra résztvevői is megismerkedhetnek az alkalmazás gyakorlati előnyeivel és hátrányaival. Kutatócsoportunk jelenleg egy Török-Magyar Bilaterális Tét pályázat keretében belül (2020-1.2.4 TÉT Ipari TR (2021-00015; „Új és továbbfejlesztett halszaporítási módszerek gyakorlati alkalmazása a haltermelés fejlesztése érdekében” 2022-2024) foglalkozik a módszer tengeri süllő (*Dicentrarchus labrax*) és süllő (*Sander lucioperca*) nagyüzemi szaporítási gyakorlatba ültetésével. A módszer technológiai lépéseinek finomítása során egy protokoll szintű leírásra van szükség a mindennapi halszaporítási gyakorlatba vezetéshez.

*Az európai és japán angolna hibrid utódok genetikai elemzésének módszerismertetése kissé pontatlan (...), a PCR kondíciók leírása helyenként zavaros (...). (...) Mindezekről függetlenül a módszer lényege világos, és eredményei érthetőek.*

Egyetérték a Bírálóval, elnézést kérek az elkövetett hibákért.

*KÉRDÉS(ek): Mit gondol, az európai angolna mesterséges szaporításának gyakorlatba is átültethető protokollja mikorra lesz kidolgozva? Mi hiányzik hozzá?*

Az utóbbi évtizedben már nem egyedülálló dolog leszáporítani az európai angolnát, kísérleti rendszerekben olasz (Bologna University), dán (Technical University of Denmark) és holland kutatók (Glasaal Volendam B) rendszeresen állítanak elő lárvát nagy tételben. Gyakorlatban átültethető protokoll akkor tűnik reálisnak, ha sikerül angolna lárvát nevelni üvegangolna korig, ahogy a dolgozatban is megfogalmaztam „*A speciális eszköz-, és tudásigényű angolna lárvá zárt rendszerű nevelése a gazdaságossági szempontokat is figyelembevéve távolinak tűnik*”. Japán kutatók, habár üzemi körülmények között dolgoznak (INAGO Co) és a 6. generációs angolna ciklusnál járnak a nagyon speciális takarmányozási – és tartási körülmények között évente mindösszesen néhány ezer halat tudnak felnevelni. Európai angolnában messze járunk ettől az eredménytől jelenleg. A lárvanevelés nagy kihívás és emiatt (is) kutatócsoportunk megelégedett azzal, hogy számos alkalommal sikerült termékenyítésig eljutni, valamint egyszer 8 napos lárvát előállítani.

Végezetül szeretném ismételtelen megköszönni Dr. Eszterbauer Editnek, hogy elvállalta és elkészítette a dolgozatom bírálatát. Bízok abban, hogy kérdésekre, felvetésekre és megjegyzésekre adott válaszaimat elfogadja és támogatja számomra az MTA doktori cím odaítélését!

Gödöllő, 2023.01.18.

Dr. Müller Tamás