

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. Nagy Szabolcs, az MTA doktora

Tisztelt Opponens Úr!

Először is szeretném megköszönni Professzor úr doktori értekezésem szakmai bírálatára fordított idejét és energiáját! Külön köszönöm Professzor úr kritikai észrevételeit és lényegre törő kérdéseit!

Kérem engedje meg, hogy először a dolgozat tartalmát érintő kritikai megjegyzésekre, kérdésekre válaszoljak.

A spermiumok energiaellátásának kérdésére adott javaslatot elfogadom, a jövőbeni kísérletek tervezésekor mindenképpen figyelembe fogom venni.

Bíráói kérdés: „*Homológ vagy heterológ szeminális plazmát használtunk fel a spermakezelésekhez?*”. Amennyiben az Opponens úr arra gondolt, hogy ugyanazon fajból származó szeminális plazmát használtunk-e fel, akkor az előkísérletben homológ és heterológ, míg a főkísérletben kizárólag heterológ plazmát használtunk fel. Amennyiben az Professzor úr arra gondolt, hogy ugyanabból a fajból, ugyanabból az egyedből származó szeminális plazmát használtunk-e fel, akkor kizárólag heterológ mintákat használtunk mindkét kísérleti ciklusban. Halak esetében nincs tudomásunk az inszemináció állategészségügyi kockázatairól, valamint, hogy ezzel kapcsolatban valaki vizsgálatot végzett volna-e. A dolgozatban (42. oldal) jeleztem, hogy az ilyen módon kezelt ikrás halak életben maradnak és tovább tartottuk azokat. „*Fontos kiemelni, hogy a kezelést követően nyomon követtük az anyákat – minden egyed túlélte a beavatkozást – és egy héttel szaporításuk után a felkínált táplálékot mindegyik elfogadta.*”. Kiegészíteném a hivatkozást azzal, hogy a kezelt halak reprodukciós tulajdonságai nem sérültek és ismételt sikeres szaporításra voltak foghatók (afrikai harcsa, nem publikált adatok).

A fluoreszcens mikroszkópos hullámhossz-értékek közlésénél valóban gerjesztési és emissziós értékeket mértünk.

32. oldalon található „n=4 tejes” valóban elírás. Helyesen: 2. csoport (negatív kontroll, (AB♀)) a zebra-dánió ivó tartályokban nem voltak hímek (n = 4 ikrás / ivató tartály, 2. táblázat, 8. ábra). Az ikrásokat nem kezeltük.

Igaza van az Opponens úrnak abban, hogy nem paraméteres statisztikai elemzéssel (Mann-Whitney-féle U-próba) ki lehetett volna értékelni az eredményeket. A hivatkozott munka előkísérletében a két leírt kezelés „működőképességét” teszteltük (igen-nem válasz). Úgy

gondoltuk, hogy az alkalmazott kis számú ismétlés felett nincs gyakorlati vagy statisztikai előny az eredmények értékelésében. Magyarán elsősorban azt vizsgáltuk, hogy a porított pontyhipofízisben lévő gonadotrop hormonok vivő anyaga lehet-e a petefészekfalán felszívódó natív sperma szemínális plazma, illetve, hogy a petefészeküregben tárolódó spermiumsejtek a beérési idő alatt megőrzik-e termékenyítőképességeiket. Az elért előkísérleti eredmények alapján terveztük meg a főkísérletet.

Valóban pontatlanul fogalmaztam meg, hogy a két genotíusból származó örökítőanyag megléte az utódokban nem jelenti feltétlenül azt, hogy diploid egyedek lennének. Az egyes minták ploiditási szintjét számos módszerrel határozhatjuk meg, mint például áramlási sejtanalízis (flow cytometry), a sejtmag (általában eritrocita) kromatin állomány Feulgen-festése (denzitometria), az eritrociták magméret vizsgálata (Drozd et al., 2010) korlátozott mértékben ikranyagyság (csíkfélék, Matsubara et al., 1995), vagy citogenetika (kromoszóma kariotipizálás) segítségével (például, Buza et al., 2018). Ploiditás vizsgálatot nem folytattunk le.

Buza, E., Kolics, B., Kovács, B., Demény, F., Horváth, Á., Müllerné, T.M., Urbányi, B., Müller, T. (2016). Előzetes eredmények a ginogenetikus réticsík (*Misgurnus fossilis*) poliploidizációjáról. *Pisces Hungarici* 10, 47–50.

Drozd, B., Flajshans, M., Ráb, P. (2010): Sympatric occurrence of triploid, aneuploid and tetraploid weatherfish *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes, Cobitidae). *Journal of Fish Biology* 77, 2163–2170.

Matsubara, K., Arai, K., Suzuki, R. (1995): Survival potential and chromosomes of progeny of triploid and pentaploid females in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 131/1–2, 37–48.

Bíráói kérdés: „A Szerző tervezi-e a munka folytatását a spermiumok petefészeklebensben történő tartózkodása során esetlegesen fellépő kromatin elváltozások dinamikájának nyomon követése. A kromatin esetleges károsodása ugyanis nem a termékenyülést, hanem a későbbi embrionális fejlődést, esetleg az utódgeneráció egyedek életműködéseit zavarhatja meg.”

A múlt évben közöltünk le egy hibridizációs kísérlet eredményeit, ami részben választ ad az opponensi kérdésre. Hibridizációs szaporítás céljából ugyanazon *Heterobranchus longifilis* tejtes ketté osztott spermátételeivel „termékenyítettünk” *Clarias gariepinus* ikratételeket; (1) inszeminációval (10 órás petefészki tárolást követően ívatás) és (2) *in vitro* termékenyítési eljárással (ikragyútést követő száraz termékenyítés eljárás). Mindkét szaporításból származó utódokat felneveltük 28 napig. Az *in vitro* fertilizációból származó halak két genotíusból származtak: 50 hibrid és 50 afrikai harcsa / nevelési egység 4 ismétlésben, míg az ívatásból származó halak (n=3 pár) 100 hal / nevelési egység szintén 4 ismétlésben. Egytényezős ANOVA szignifikáns különbségeket mutatott ki a túlélési arányokban (ANOVA: F=7,827; df=3, p=0,0037). A post hoc tesztek szerint mind a három inszeminált ikrásból származó ivadékok statisztikailag igazolható módon (p<0,05) magasabb túlélési arányt mutattak (66,75±5,52 %, min-max: 58–75 %, hibrid:afrikai harcsa arány 98,1:1,9 %) mint az *in vitro* fertilizációból született halak (43 ± 12,19 %, min-max: 23–55%, hibrid:afrikai harcsa arány 45,8:54,2 %). Messzemenő következtetést ebből nem lehet levonni, de elképzelhető, hogy a spermiumok 10 órás petefészek körülmények közötti tárolása alatt olyan szelekciós folyamatok zajlanak le (például sperma kompatibilitás, spermium verseny), amelynek során életerősebb ivadékokat nyerhetünk. A kérdés pontos megválaszolásához újabb kísérletsorozatokra van szükség. Fontosnak tartom még kiemelni, hogy ivarérett afrikai harcsa szaporítóállományaink jelenleg inszeminációs szaporítási eljárásból származnak, problémamentesen tovább szaporíthatók.

Okomoda et al. (2023) kísérleteikben afrikai harcsa fajban három szaporítási módszert hasonlítottak össze; (i) inszeminációs módszer (a sperma termékenyítőképessége 24 óras

petefészek tárolást követően), (ii) *in vitro* fertilizáció frissen gyűjtött-, valamint (ii) 24 órán 4 C°-on tárolt spermát felhasználva. Eredményeik alapján a három kezelés között nem volt statisztikailag igazolható különbség ($p < 0,05$) termékenyítőképességében (91-93%), kelési arányban (81-83%). Vizsgálták a különféle kezelésből származó halak túlélési arányát – számítás = lárva száma a szikfelszívódási fázisban / kelt lárva száma $\times 100$ – és nem találtak különbséget a megmaradásban (72-74%).

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.

Quyên, 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* \times *Heterobranchus longifilis*). *Aquaculture Reports* 27, 101418.

A helyesírásra, értelmezési pontatlanságokra, esetenként előforduló zavaró megfogalmazásokra adott kritikai megjegyzések jogosak, elkerülhető hibáimért elnézést kérek. Valóban hibás megfogalmazás a „csapvízzel termékenyítés”. A gaméták vízaktivációját és ezen keresztül a termékenyülést ösztönöztük, de önmagában a vízzel termékenyíteni nem lehet. Gyakorlati halszaporítás során alkalmazott néhány szakszerűtlennek ható szó-, és szóösszetétel zavaró egy tudományos dolgozatban (hasonló problémás összetételek: mesterséges szaporítás *versus* indukált szaporítás, oltás *versus* hormonkezelés stb.).

A címmel kapcsolatos megjegyzését elfogadom, habár a kétféle kutatási területet (inszemináció és indukált ivarérelés-, szaporítás mélyhűtött spermával) egy címben összefoglalni nem egyszerű feladat. Úgy gondolom a disszertáció címe pontosítása során szükségszerűen hosszabbá is válik. „*Számomra nehezen értelmezhető az „újszerű” kifejezés*”. A magyar nyelv értelmező szótára szerint az újszerű szó jelentése: „*a megszokottól eltérő, eddig nem ismert, nem tapasztalt, tartalmi vagy formai tekintetben – esetleg mindkét szempontból – valami újat adó, újdonságot tartalmazó.*” Az új szó pedig: „*még eddig nem ismert, nem próbált, nem tapasztalt, nem érzett, az eddig megszokottól eltérő; szokatlan.*”. Értelmezésem szerint az angolna fajban végzett kísérleteinkben, már korábban leírt eljárások fejlesztése révén értünk el – megítélésem szerint jelentős – eredményeket, amit *újszerű módszernek* tekintek. Ezzel szemben a hormon és sperma összekeverése és együttes alkalmazása ovuláció kiváltására és az ikraszemek termékenyítése – tudomásom szerint – előzmény nélküli eljárás, ami *új módszer*. A két szó jelentése között van – elismerve, hogy nem jelentős – különbség, amit itt is érzékeltetni szerettem volna.

Szeretném még egyszer megköszönni Professzor úr bírálatát, bízom benne, hogy kérdéseire adott válaszaimat is eltudja fogadni és támogatja az MTA doktori cím odaítélését!

Gödöllő, 2023.01.18.

Dr. Müller Tamás