

MTA Doktori értekezés

Keltetőházi halszaporítási gyakorlattól eltérő új- és újszerű módszertani eljárások

Dr. Müller Tamás

Gödöllő

2022

Tartalom

| | |
|---|----|
| Rövidítések jegyzéke..... | 3 |
| 1. Előszó..... | 4 |
| 1.1. Az értekezés felépítése | 5 |
| 2. Inszemináció, mint új halszaporítási módszer (mesterséges spermafelhelyezés petefészeklebenybe) | 7 |
| 2.1. Bevezetés | 7 |
| 2.1.1. A halak szaporodási jellegzetességei | 7 |
| 2.1.2. Ivarsejtek biológiája | 9 |
| 2.1.3. Halak szaporodásának szabályozása | 10 |
| 2.1.4. Technikai megoldások a szaporításban (hormon bejuttatási módszerek) | 12 |
| 2.1.5. Mélyhűtött sperma felhasználása (alkalmazása) | 16 |
| 2.2. Anyag és módszer..... | 17 |
| 2.2.1. Általános módszertan | 17 |
| 2.2.2. Ponty modell fajban végzett kísérletek | 17 |
| 2.2.3. Afrikai harcsában végzett kísérletek I. (A sperma szemínális folyadék, mint exogén hormon vivőanyag)..... | 20 |
| 2.2.4. Afrikai harcsában végzett kísérletek II. (a petefészeklebenybe injektált sperma termékenyítőképesség az idő függvényében)..... | 22 |
| 2.2.5. Afrikai harcsában végzett kísérletek III. (sperma ikra arány vizsgálatok)..... | 24 |
| 2.2.6. Afrikai harcsában végzett kísérletek IV. (A petefészeklebenybe jutott spermiumsejtek eloszlásának vizsgálata vízakiváció nélkül)..... | 25 |
| 2.2.7. Afrikai harcsában végzett kísérletek V. (mélyhűtött sperma felhasználása inszeminációhoz)..... | 26 |
| 2.2.8. Zebradánióval végzett kísérletek I. (Genetikai sokszínűség növelésének lehetősége ívatásos szaporítás esetén)..... | 29 |
| 2.2.9. Zebradánióval végzett kísérletek II. (Ívatásos szaporítás tejesek közvetlen jelenléte nélkül) | 31 |
| 2.2.10. Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek..... | 34 |
| 2.3. Eredmények | 36 |
| 2.3.1. Ponty fajban kapott eredmények | 36 |
| 2.3.2. Afrikai harcsában végzett kísérletek I. eredményei (A sperma szemínális folyadéka, mint exogén hormon vivőanyag)..... | 37 |
| 2.3.3. Afrikai harcsában végzett kísérletek II. eredményei (a petefészeklebenybe injektált sperma termékenyítőképessége az idő függvényében) | 38 |
| 2.3.4. Afrikai harcsában végzett kísérletek III. eredményei (sperma-ikra arány vizsgálatok) | 39 |
| 2.3.5. Afrikai harcsában végzett kísérletek IV. eredményei (a petefészeklebenybe jutott spermiumsejtek eloszlásának vizsgálata vízakiváció nélkül) | 40 |
| 2.3.6. Afrikai harcsában végzett kísérletek V. eredményei (mélyhűtött sperma felhasználása inszeminációhoz) | 41 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 2.3.7. | Zegradánióval végzett kísérletek I. (genetikai sokszínűség növelésének lehetősége ivatásos szaporítás esetén)..... | 43 |
| 2.3.8. | Zebra dánióval végzett kísérletek II. (Ívatásos szaporítás tejesek közvetlen jelenléte nélkül)..... | 46 |
| 2.3.9. | Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek eredményei..... | 46 |
| 2.4. | Eredmények értékelése..... | 48 |
| 2.4.1. | Inszemináció, mint új halszaporítási módszer technikai-, és biológiai alapjai .. | 48 |
| 2.4.2. | Sperma szeminalis plazma, mint hormonvivő anyag..... | 49 |
| 2.4.3. | Sperma életképességének/termékenyítőképességének megőrzése a petefészekben az idő és a spermamennyiség függvényében..... | 50 |
| 2.4.4. | Mélyhűtött sperma felhasználása indukált ivatás esetén..... | 51 |
| 2.4.5. | Az utódok genetikai sokszínűségének növelésének lehetősége..... | 52 |
| 2.4.6. | Sikerese utódlétrehozás ívás vagy ivatásos módszer alkalmazása során, tejes jelenléte nélkül..... | 52 |
| 2.5. | A módszer felhasználásának lehetséges területei és előnyei..... | 54 |
| 2.5.1. | Természetvédelmi célú halszaporítás..... | 54 |
| 2.5.2. | Gazdasági célú halszaporítás..... | 57 |
| 3. | Európai angolna tejesek indukált ivarérlelése, spermamélyhűtése és termékenyítési tesztjei..... | 60 |
| 3.1. | Bevezetés..... | 60 |
| 3.1.1. | A kutatás előzményei, hazai angolna indukált ivarérlelési kísérletek..... | 62 |
| 3.1.2. | Angolna tejesek felkészítése, spermamélyhűtés..... | 65 |
| 3.1.3. | Spermamélyhűtési protokollok..... | 65 |
| 3.2. | Anyag és módszer..... | 69 |
| 3.2.1. | Hím ivarú angolnák ivarérlelése..... | 69 |
| 3.2.2. | Japán angolna ikrások ivarérlelése..... | 70 |
| 3.2.3. | Statisztikai analízis..... | 70 |
| 3.2.4. | Genetikai analízis..... | 71 |
| 3.3. | Eredmények..... | 71 |
| 3.3.1. | Termékenyülés és lárvafejlődés..... | 71 |
| 3.3.2. | Genetikai vizsgálatok..... | 73 |
| 3.4. | Eredmények értékelése..... | 74 |
| 3.5. | Az angolna spermamélyhűtés felhasználásának lehetséges területei..... | 75 |
| 4. | Új tudományos eredmények..... | 77 |
| 5. | Összefoglalás..... | 78 |
| 6. | Summary..... | 80 |
| 7. | A dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények jegyzéke..... | 82 |
| 8. | Irodalomjegyzék..... | 83 |
| 9. | Köszönetnyilvánítás..... | 101 |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|--------------------|--|
| ASP | Artificial seminal plasma, mesterséges szemínális plazma |
| ATP | Adenozin-trifoszfát |
| CaCl ₂ | Kalcium-klorid |
| CASA | Számítógépes spermavizsgálat, (computer-assisted sperm analysis) |
| CPE | Carp pituitary extract, acetált pontyhipofízis kivonat |
| DMA | N,N-dimetil-amid |
| DMF | N,N-dimetil-formamid |
| DMSO | Dimetil-szulfoxid (lásd Me ₂ SO) |
| DNS | Dezoxiribonukleinsav |
| FBS | Magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum) |
| FSH | Folliculus-stimuláló hormon, tüszőérlelő hormon |
| LH | Luteinizáló hormon, sárgatestserkentő hormon |
| GnRH | Gonadotrop releasing hormon |
| GnRH _a | Szintetikus gonadotrop releasing hormon analóg |
| GtH | Gonadotrop hormon |
| GtH I | Gonadotrop hormon I., „Follikulus-stimuláló hormon” halakban |
| GtH II. | Gonadotrop hormon II., „Luteinizáló hormon” halakban |
| hCG | Humán chorion gonadotropin |
| hpf | Termékenyülés utáni idő órában (hours post fertilization) |
| HRM | Nagyfelbontású olvadási görbe (high resolution melting) |
| IUCN | Természetvédelmi Világszövetség (International Union for Conservation of Nature) |
| K30ASP | Módosított mesterséges szemínális plazma 30 mM tartalmú KCl-lel |
| KC | Kálium-klorid |
| LN | Folyékony nitrogén |
| Me ₂ SO | Dimetil-szulfoxid (lásd DMSO) |
| MeOH | Metanol |
| MgCl ₂ | Magnézium-klorid |
| NaCl | Nátrium klorid |
| NaHCO ₃ | Nátrium-hidrogén-karbonát |
| NaOH | Nátrium-hidroxid |
| Ø | Átmérő |
| P1 | Angolna spermamélyhűtésre kifejlesztett hígító típus |
| PCR | Polimeráz lánreakció |
| PGSI | Pseudo gonadoszomatikus index |
| w/v | Vegyesszázalékos oldat |

1. Előszó

A XXI. századi, folyamatosan növekvő számú emberiség számára kiemelten fontos a megfelelő, biztonságos ételkészítéshez való hozzájárulás. A Föld lakosságának nagy része számára a hal jelenti az elsődleges fehérjeforrást. A halhús, mint egészséges táplálék, könnyen emészthető, tápanyagokban gazdag ételkészítés, 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 ételkészítés 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 közzismertek, 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 (Müller, 2014), amelynek során emberi beavatkozás következtében az eltűnő tóból kipisztult 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 kitétek. Az új problémák tehát (részben) új megoldásokat igényelnek.

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 spermahelyezés (inszemináció) módszer alapja, hogy a spermiumok biológiai aktivitásukat megtartva hosszabb ideig „tárolhatók” a petefészek 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 ezüstharcsa (*Rhamdia quelen*)), valamint egy laboratóriumi halfajon (zebradánio (*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 ivarérelés folyamatát, az ivarsejt gyűjtését, a spermamélyhűtés módszerét, ezen technikák alkalmazásával történő termékenyítési tesztekét 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. Inszemináció, mint új halszaporítási módszer (mesterséges spermafelhelyezés petefészeklebenybe)

2.1. Bevezetés

2.1.1. A halak szaporodási jellegzetességei

A csontos halak (*Osteichthyes*) mint vízi szervezetek életciklusának minden fázisa, magába foglalva szaporodásukat is, vízhez kötött. Szaporodási sajátosságait tekintve a fajok túlnyomó része váltivarú és azok többsége az ovipar (ikrarakók) csoportba tartozik. Három alcsoport tartozik ide, nevezetesen:

1) Ovulipar (valódi külső megtermékenyítésű) fajok; az ivarsejtek egyesülése a két szülő testüregén kívül, a vízben történik. Gazdaságilag jelentős hazai halak tartoznak ebbe a csoportba. A szakirodalomban (Wallace és Selman, 1981; Tyler és Sumpter 1996; Treasurer, 1981; Sivakumaran et al., 2003; Muchlisin, 2014) kétféle petefészek besorolás típusát különítenek el az alcsoporton belül. Az egyik az ivarnyílással való kapcsolat alapján történő felosztás:

(i) *gimnovárium*: nincs kialakult oviductus; pl. angolnaalakúak (*Anguilliformes*), lazacfélék (*Salmonidae*), csíkfélék (*Cobitidae*);

(ii) *másodlagos gimnovárium*: van petevezető, de nem áll közvetlen kapcsolatban a petefészekkel; pl. tokalakúak (*Acipenseriformes*);

(iii) *cisztovárium*: a petevezető összeköti a petefészket az ivarnyílással; pl. pontyalakúak (*Cypriniformes*).

A másik felosztási típus az oociták fejlődése alapján történő kategória bontás:

(i) *szinkron petefészek/egységes morfológiai képet mutató petefészek*: ahol a gonádban található oociták azonos fejlődési állapotban vannak; pl. sügér (*Perca fluviatilis*);

(ii) *csoport-szinkron petefészek/nem egységes morfológiai képet mutató petefészek*: ahol az ovárium felépítésében legalább két eltérő fejlődési állapotban lévő ivarsejtcsoport vesz részt szaporodási időszakban (vitellogenézis szakaszban, valamint previtellogenikus nyugalmi fázisban); pl. ezüstös tengeripér (*Mugil curema*);

(iii) *aszinkron petefészek/heterogén morfológiai képet mutató petefészek*: ahol az oociták összes fejlődési állapota képviselve van; pl. ponty.

2) A zigopar csoportba olyan belső megtermékenyítésű fajok tartoznak, ahol a megtermékenyített ikra zigóta állapotú embrió formában kerül testüregén kívülre (Fitzpatrick, 2020); pl. skorpióhal-alakúak (*Scorpaeniformes*) rendjébe tartozó *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Sequeira et al., 2012).

3) Az embriopar csoportba azok a halak tartoznak, amelyek belső megtermékenyítést követően különböző fejlődési állapotú embriót tartalmazó ikrákat ürítenek a vízbe (Wourms et al., 1988); pl. egyes nyálkásal-alakúak (*Blenniiformes*) rendjébe tartozó faj, mint *Xenomedeia rhodopyga*, *Starksia fulva* (Fishelson et al., 2013).

A fentiek mellett Munehara et al. (1989) egy új szaporodási stratégiát fedezett fel egy tengervízi különféle fajban (*Alcichthys elongatus*), amelyet „belső ivarsejtegyesülésnek” neveztek el, de mégis az ovulipar, tehát külső megtermékenyítésű csoportba soroltak. Ebben az esetben a hímek urogenitális papillájuk segítségével a spermiumsejteket az ikrások szaporítószervébe juttatják, ahol akár egy hónapig is életképesek maradnak. A spermiumsejtek az ovariális folyadékban úszva az ovulált petesejtekhez jutnak, behatolnak a mikropüle nyíláson és eljutnak az ovoplazmáig. Ebben a fázisban a haploid spermiumsejt és az oocita még nem egyesül. Amikor az oocita és a mikropüle csatornában lévő spermium együttesen kijut a külvilágba (második ívás), akkor vízakiváltás hatására következik be a megtermékenyülés. Ezt a folyamatot azóta számos más halfaj esetében is leírták (Abe és Munehara, 2005; Koya et al., 1993; Munehara et al., 1991; Santos et al., 2013). Az utóbbi szaporodási sajátosságnak részletesebb kifejtésére azért került sor, mert mintaként szolgált az általunk kifejlesztett indukált új szaporítási módszer kidolgozásához.

A csontos halak kisebb része (~2-3%) eleve szülő, vivipar (Fitzpatrick, 2020). A spermiumokat a tejesek változatos kialakulású ivarszerveik segítségével (gonopódium, urogenitális papilla) az ikrások ivarvezetékeibe juttatják, az embriók pedig a megtermékenyítést követően az ikrások testüregén belül fejlődnek ki. A vehemkihordás sajátosságai alapján lehet:

- 1) ovovivipar (fakultatív vivipar): szikkel táplálkozó álelevenszülők (pl. *Gambusia spp.*),
- 2) vivipar (obligát vivipar): szikplacentás eleve szülő (pl. *Anablepidae*) (Wourms et al., 1988).

A legtöbb csontos halban a here páros, hosszúkas szerv, melyet a mesenterium rögzít a hasüreg háti falára. Korábban tubuláris (csöves) és lobuláris (lebenyes) típusú heréket különböztettek meg (Billard et al., 1982), jelenleg a csontos halak heréit morfológiai sajátosságaik alapján 3 csoportba sorolják:

- (i) csöves típusú here, ami a lazacfélék (*Salmonidae*), a pontyfélék (*Cyprinidae*) és a kajmánhalfélék (*Lepisosteidae*) fajaira jellemző;
- (ii) korlátlan spermatogonialis here típus, a kalászhalakúak kládján (*Atherinomorpha*) kívül az újúsósokra (*Neopterygii*) jellemző;
- (iii) korlátozott spermatogonialis here típus, ami egyes kalászhalakúak (*Atheriniformes*), makrahalalakúak (*Beloniformes*) és fogaspontyalakúak (*Cyprinodontiformes*) jellemző herefelépítése (Uribe et al., 2014). A gazdasági szempontból jelentős, hazánkban előforduló halfajokra, így például a ponty, a harcsa (*Silurus glanis*), a busa-fajok *Hypophthalmichthys spp.*, az amur (*Ctenopharyngodon idella*) az új nevezéktan alapján a csöves típusú here a jellemző, míg a hazai sügérfélék, így a süllő (*Sander lucioperca*), a kősüllő (*S. volgensis*) és a sügér lebenyes (korlátlan spermatogonialis) here típussal rendelkeznek.

A halak spermiogenezisének sajátosságai részben eltérnek az hüllők, madarak, emlősök ivarsejtképződési folyamataitól. Egyfelől a Sertoli-sejtek a pubertás korig osztódnak a magasabb rendű gerincesekben, majd számuk tovább már nem növekszik, addig a halak és kételtűek esetében teljes életidejükben osztódóképesek maradnak (Schulz et al., 2005). Másfelől a halakban a Sertoli-sejtek cisztákat képeznek (cisztás spermiogenezis) amelynek során egy ilyen sejt körülöleli a spermatogóniumot, ezáltal a szinkron módon fejlődő csírasejtcsoport egyetlen spermatogóniumból származik (Schulz et al., 2005; Schulz et al., 2010).

2.1.2. *Ivarsejtek biológiája*

A külső megtermékenyítéssel szaporodó halfajok spermiumai a vízben, mint szaporodási közegben aktiválódnak. Önmagában az aktiválódás is több fiziológiai lépéssort követően megy végbe (Kholodnyy et al., 2020):

1. Az inaktív spermiumok a szeminális plazmával együttesen kiszabadulva ozmocomfort környezetből a külvilágra (jelen esetben az édesvízbe) jutnak, emiatt ozmotikus/ionos gradiens jön létre a spermium plazmamembránon.

2. A gradiens lehetővé teszi a spermiumsejtek membráncsatornáinak aktiválódását és a membránpolarizációt, amelyek a környezeti feltételektől – például hőmérséklet, pH stb. – erősen függő folyamatok.

3. A kalciumionok sejten belüli koncentrációja jelentősen megnő (a külső ionok beáramlása a csatornahálózatot keresztül és a belső Ca^{2+} raktárakból történő felszabadulás miatt). A Ca^{2+} -ionok részt vesznek különféle enzimek aktiválásában, valamint az ATP szintézisében és felszabadulásában.

4. A membráncsatorna kaszkád aktivitása a ciklikus adenzin monofoszfátok szintézisét is magába foglalja, amelyek közvetítőként hatnak és befolyásolják a spermium sejt flagellumában lévő dinein karok működését.

5. Az ATP, a ciklikus adenzin monofoszfátok és a kalciumionok szabályozzák a dinein motorok működését a farokrégióban.

6. A membrán két oldala között kialakuló gradiensek befolyásolják az axonéma integritását és konzisztenciáját.

7. Egyensúlyi helyzet jön létre a membránon lévő gradiensek által okozott aktivitás és a sejtszerkezetek sérülése között. Később, a motilitási periódusban, az ATP-tartalom csökken, mert megújulása mitokondriális foszforilációval jóval lassabb arányban megy végbe, mint a felhasználás üteme. Ez a folyamat a belső ion-tartalom további beállításával kombinálva a koncentráció fokozatos csökkenéséhez vezet, és a dinein aktivitás a vízaktivációt követően néhány perccel megszűnik. Az eltelt idő fajtól és külső környezeti tényezőktől erősen függ (Cosson, 2004; Kholodnyy et al., 2020). A legtöbb csontos halfaj esetében kevesebb, mint 2 perc, de ebből többnyire csak 30 másodpercig tart a nagy aktivitású mozgás (Billard et al., 1995; Kime et al., 2001). A spermiumsejtek életképessége, mozgási aktivitása különféle beavatkozások révén meghosszabbítható, például a sügér sperma ivarsejtjeinek aktivitása egy-két perccel a vízaktivációt követően lecseng, azonban közel izotóniás sóoldatban az életidő több, mint két óráig is fenntartható (Lahnsteiner, 2011). A másik fontos megfigyelés, hogy az ovariális folyadék is hat a spermiumsejtek mozgási képességére. Lahnsteiner et al. (1997) vizsgálatai szerint a petefészeküreg caudális régióját, valamint a petevezetékfalat szekréciósan aktív és mikrovillusokat tartalmazó hámszövet borítja, ami fehérjék-, és az ún. glükuronid szteroidok szintézisében vesz részt. Ez alkotja az ovariális folyadékot. A petefészek folyadéknak több funkcionális feladatot tulajdonítanak külső megtermékenyítésű fajokban, mint például:

(i) megakadályozza az ovulált oociták aktiválódását, pontosabban a mikropüle bezáródását a vízfelvétel okozta megduzzadás alatt, valamint az ikrahéj megkeményedését a protein szerkezet megváltozása miatt (Lam et al., 1978; Lahnsteiner et al., 1997);

(ii) fenntartja az ikra termékenyülőképességét, valamint megakadályozza a „túlérést” (Lam et al., 1978);

(iii) íváskor megkönnyíti az ikrák távozását a hasüregből (Yamamoto, 1963).

Vahid et al. (2019) összefoglaló munkájukban leírták, hogy az ikra és az ovariális folyadék, mint mikrokörnyezet milyen hatást gyakorol a spermiumsejtekre a megtermékenyítést megelőzően. A legtöbb fajnál a vízaktivációkor az ovariális folyadék jelenléte fokozza a

spermiumok teljesítőképességét a kizárólagos vízaktivációhoz képest: meghosszabbítja a spermiumok életképességét, nagyobb arányú mozgóképességet indukál, valamint megnöveli a spermiumok sebességét. Magyar szerzők közül Horváth et al. (2010) vizsgálta a ponty ovariális folyadékának hatását a spermiumok mozgóképességére. Kísérletes eredményeik alapján az ovariális folyadék önmagában nem, de hígítva (desztillált víz + ovariális folyadék) a spermiumokat nemcsak aktiválta, hanem a motilitásukat hosszú ideig igen magas értéken tudta tartani. Kiinduló állapotban a szemínális plazma és az ovariális folyadék ozmolalitási tartománya hasonló; a ponty szemínális plazma ozmomalitása 254-346 mOsmol/kg (Alavi és Cosson 2006), 262-270 mOsmol/kg (Shaliutina-Kolešová et al., 2016), míg a ponty ovariális folyadék ozmolalitása 217 mOsmol/kg (Horváth et al., 2010). Afrikai harcsa esetében a szemínális plazma $222 \pm 5,8$ mOsmol/kg (Steyn és Van Vuren, 1986), illetve az ovariális folyadék ozmolalitása 295 ± 21 mOsmol/kg (Kovács et al., 2010). Ezzel szemben Eloffson et al. (2006) kutatási eredményei alapján az eurihalin (tág sófürésű halak csoportjába tartozó) háromtüskés pikóban (*Gasterosteus aculeatus*) élőhelytől függően változik az ovariális folyadék (édesvíz: 208 ± 25 , brakkvíz: 246 ± 26 , tengervíz: 314 ± 47 mOsmol/kg) és a szemínális plazma (édesvíz: 266, brakkvíz: 301, tengervíz: 347 mOsmol/kg) ozmomalitása. A pisztrángfélékben (*Salmonidae*) – ahol a K^+ -ion koncentráció-csökkenés váltja ki a spermiumsejtek aktiválását – az ovariális folyadék szintén aktiválja a spermiumsejteket (Rosengrave et al. 2009) és mozgóképességüket hosszú ideig fenntartja.

Fontos kiemelni, hogy az eddig főképp a sperma-ovariális folyadék interakciót vizsgálták, amely vizsgálatok azonban finomításra szorulnak, mert önmagában a sperma két fő része (spermiumsejt tömeg és szemínális plazma) együttesen lép kapcsolatba az ikrával és az ovariális folyadékkal. Fontos lenne emiatt azt is megtudni, hogy önmagában a spermiumsejtek és az ovariális folyadék között milyen kapcsolat lép fel, feltételezve, hogy a szemínális plazma (és az ovariális folyadék) összetétele külső és belső környezeti tényezőktől is függ. Shaliutina-Kolešová et al. (2016) például kimutatták, hogy a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) szemínális plazma fehérje koncentrációja az ivási időszak alatt változik, a legmagasabb értéket az ivási idő közepén mutatta. A szemínális plazma ion koncentrációja is változhat az ivási időszak alatt (Alavi és Cosson, 2006). Az eurihalin fajok esetében az édesvíz-sósvíz, mint eltérő szalinitású és iontartalmú környezet a vese kiválasztáson keresztül jelentősen befolyásolja az ovariális folyadék összetételét, hogy azt *Onchorhynchus keta keta* (Hirano et al., 1978), valamint háromtüskés pikó (Eloffson et al., 2006) fajokban kimutatták.

2.1.3. Halak szaporodásának szabályozása

Az alábbi fejezet Woynárovich és Horváth (1980); Horváth (1980), Horváth et al. (1984), Horváth et al. (1985); Horváth et al. (2000), Horváth és Urbányi (2000); Horváth et al. (2015) munkáin alapul. A szaporodásra (ívásra) felkészült halban az ivarsejtek “végső érése” neurohormonális kontroll alatt áll. A környezeti ingerek receptorokon keresztül kémiai jelekké alakulnak és a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely mentén szabályozzák a szaporodási folyamatokat (ovuláció, spermatermelés, násztánc, ivadék gondozás stb.). A környezetből érkező jeleknek megfelelő erősségűeknek kell lenniük ahhoz, hogy a gátló mechanizmusokat, elsősorban az agytörzsi dopaminerg rendszer; a GnRH neuronok preszinaptikus gátlása a dopamin D2 receptorok aktivációja révén, kikapcsolják. Ezzel párhuzamosan bekapcsolják a serkentő hormonális szabályozást (hipotalamusz – GnRH szekréció → hipofízis – GtH felszabadulás → ivarszerv – 17α -hidroxi, 20β -dihidro-progeszteron → ovuláció. Ez azonban nem egyirányú folyamat, mert abban feedback mechanizmusok is szerepet játszanak, amelyek mind szükségesek ahhoz, hogy az ívásra érett hal szaporodni tudjon. Az ehhez tartozó

környezeti tényezőket "ívási környezetnek" nevezzük, ami fajtól függően igen változó. 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. Az ívási környezet tehát a halak állandó tartózkodási környezetétől akár lényegesen is eltérhet. Hazai halaink között (a mérsékelt égövön) az ívási környezet rendszerint egy bizonyos szezonhoz kötött időjárási helyzet bekövetkeztékor alakul ki.

A halak ellenőrzött körülmények között történő szaporítását három fő csoportra lehet osztani;

1) *Természetes ívatás*: alapja, hogy az ívási körülmények megfelelő mértékű mesterséges másolatára az ívásra felkészült halak reagálnak. A módszernek napjainkban is van létjogosultsága, főképp azokban az esetekben, amikor egy újonnan megépített vagy rekonstruált, frissen elárasztott tavat tavasszal állítanak üzembe és a természetes szaporodáshoz ideálisak a feltételek. Ilyenkor a tavakban olcsó és nagy mennyiségű ivadék állítható elő. Laboratóriumi körülmények között természetes ívatással szaporítják például a zebraadániót, amely egész évben szaporítható és ugyanazon pár egy héten belül akár több alkalommal is ívhat (Eaton és Farley, 1974; Nasiadka és Clark, 2012), sőt optimális körülmények között rövid ideig akár naponta is ívásra bírható (Spence és Smith, 2005; Nasiadka és Clark, 2012). Ilyen esetben azonban az ikratermelés mennyisége és az ikra minősége is csökken. Optimális ikratermeléshez két ívás között legalább 7 nap pihentetést kell biztosítani (Harper és Lawrence, 2016).

2) *Félmesterséges ívatás*: az ívás időzítésére, a szaporodást kiváltó tényezők részbeni helyettesítésére különféle hormonkezeléseket alkalmaznak, majd az anyahalakat visszahelyezik a természetes ívóhelyeiket modellező környezetbe. Az ívási környezet kiválasztása azon az alapon történik, hogy az adott fajra nézve mely környezet kedvez leginkább az utódok túlélésének, a faj fennmaradásának. Napjainkban is használt szaporítási módszer, amelyet például a fészekre ívatás során alkalmaznak süllő esetében (Tamás és mtsai., 2006; Demska-Zakes és Zakes, 2002), de az angolna (*Anguilla spp.*) szaporításánál is általánosan elterjedt (DiBiase et al., 2015, Okamura et al., 2014, Mordenti et al., 2014). A szaporodás hatékonyságában (a megszülető utódok számában) a feltételek optimális voltától függően igen nagy faji és egyedi különbségek lehetnek (Horváth és Urbányi, 2000).

3) *Indukált keltetőházi/mesterséges szaporítás*: a szaporodásra felkészült halakban hormonkezeléssel helyettesítik a szaporodást kiváltó környezeti tényezőket. Ennek hatására az ikra leválásának folyamata és a spermiumok felhalmozódása mesterséges környezetben, az ívási feltételek hiányában is bekövetkezik. Ezzel fölöslegessé vált az ívási környezet lemásolása, amely egyes halfajok mesterséges tartásakor egyáltalán nem, vagy csak körülményesen valósítható meg (Horváth és Magyary, 2007). A halakból kinyert ivartermékekkel termékenyítenek, majd a megtermékenyített ikrát ellenőrzött körülmények között keltetik. A széles körben alkalmazott és hatékony szaporítási módszer eredményes műveléséhez nemcsak speciális technikai feltételrendszer (keltetőház stb.), hanem pontos előírások szerint működő, szakaszokra tagolt szaporítási technológia is szükséges (Horváth és Urbányi, 2000). Gazdaságilag jelentős halfajainkat (pontyfélék, csuka (*Esox lucius*), süllő, harcsa stb.) jelenleg ezzel a módszerrel szaporítják. A különböző szaporítási módszerek összefoglalásáról részletes magyar és angol nyelvű leírások találhatók Horváth et al. (1984, 1985, 2000, 2015) műveiben. Az egyik sajátos halszaporítási al módszer is ide tartozik:

3a) *Hormonálisan indukált ivarérelés és szaporítás*. A módszer alkalmazása során az ívásra felkészült állapot eléréséhez ellenőrzött körülmények között történő, hosszantartó hormonális kezelés is szükséges (gametogenezis-indukció), elsősorban angolna fajok (*Anguilla spp.*) szaporításakor alkalmazzák (Fontaine et al., 1964, Ohta et al., 1995; Mordenit et al., 2014; lásd még 3. fejezet).

A természetes ivatás során a környezet befolyásolása mellett nincs szükség hormonkezelésre. A félmesterséges és mesterséges szaporítás során a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely mentén különböző szinteken lehet beavatkozni a neuroendokrin szabályozásba az ivásra/szaporodásra felkészült halban, hogy az ivarsejtek végső érését (elsősorban az ovulációt) elérjük:

1) Gonadotrop releasing hormon (GnRH) vagy szintetikus gonadotrop releasing hormon analóg (GnRHa) készítmények használata (Lam, 1982), gyakran dopamin receptor antagonistákkal kombinálva (Peter et al., 1988; Horváth et al., 1997).

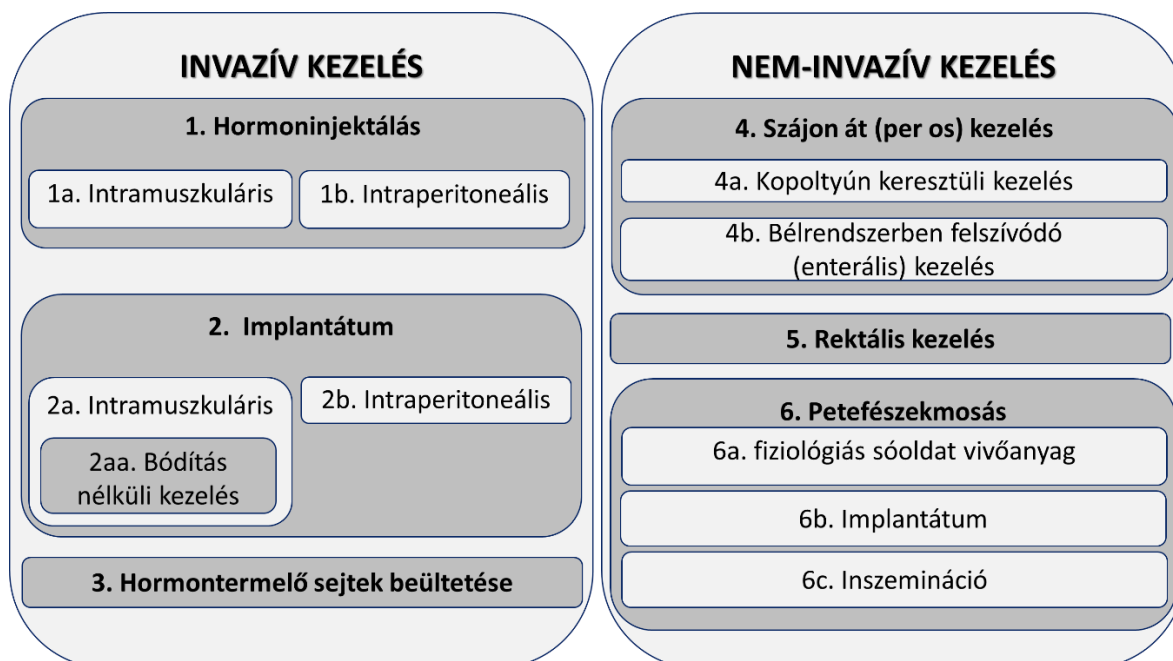
2) Természetes eredetű gonadotrop hormonok alkalmazása különféle halak agyalapi mirigy-, illetve hipofízis-kivonatainak segítségével (Von Ihering, 1937; Janczó, 1953, 1954a, b; 1955; Woynárovich, 1954), vagy humán chorion gonadotropin (hCG) kezeléssel (Sneed et al., 1959).

3) Szintetikus szexuális-szteroid kezelés (pl. 17- α , 20- β -dihidroxi-4-pregnen-3-one) (Nagahama, 1997; lásd még 3.2.2 fejezet).

A halszaporításban alkalmazott különböző hormonok részletesebb jellemzéséről összefoglalók találhatóak Zohar és Mylonas (2001), Yaron et al. (2009) és Mylonas et al. (2010; 2017) munkáiban.

2.1.4. Technikai megoldások a szaporításban (hormon bejuttatási módszerek)

A halfajok szaporítására kiválasztott hormonokat és hormonhatású anyagokat exogén úton, kétféle módon lehet bejuttatni a halakba: *invazív* és *nem-invazív módon*. *Invazív módszereknek* a sebészi módszerekhez képest ugyan kisebb beavatkozással járó, de olyan eljárásokat nevezünk, amelyek során kisebb-nagyobb mértékben, de meg kell megsérteni valamely szövetféleséget (pl. injekció, kapszula-beültetés). A *nem-invazív* módszerek alkalmazása során nem idéznek elő sebzést, ehelyett alternatív hormonbejuttatási eljárásokat, kezeléseket alkalmaznak (Müller et al., 2020a, 1. ábra).



1. ábra. Halak hormonkezelési módszereinek csoportosítása (Müller et al., 2020a nyomán módosítva).

1) *Hormoninjektálás*: A cél az ovulációt kiváltó hormonpreparátumok bejuttatása injekciós tű segítségével. Az injekcióban a vivőanyag mindig folyadék, ami leggyakrabban halfiziológiás- (0,65% w/v NaCl), vagy humán fiziológiás sóoldat (0,9% w/v NaCl). Halszaporítás esetén bejuttatási helytől függően a hormoninjekciónak alapvetően két formája ismert:

1a) *Intraperitoneális*: Az injektálás a hashártyán keresztül a hasüregbe történik, leggyakrabban a hasúszók tövéénél. A kezelés időigénye kevesebb, és kevésbé érzékeny a hormonvivőanyag térfogatra (2-3 ml / testtömeg kg), szemben az intramuszkuláris kezeléssel (Harvey és Carolsfeld, 1993). A hasúri kezelés hátránya, hogy rossz helyen alkalmazva vagy nem megfelelő mélységig bevezetett tűvel a hormonadag a tápanyagcsatornába kerülhet. A kockázatot csökkentve általában a mellúszó vagy a hasúszók pikkelymentes tövébe történik az injektálás.

1b) *Intramuskuláris*: Az injektálás izomba történik, leggyakrabban a faroknyélbe vagy a hátúszók magasságában a hátizomba. A kezelés előnye, hogy a hormonkezelés könnyebben standardizálható: beadási hely, beadási mélység. Ugyanakkor időigényesebb és a hormonadagok csak lényegesen kisebb mennyiségben adhatók be (~0,5 ml / testtömeg kg). Lipscomb et al. (2018) beszámolt arról, hogy GnRHa + domperidon-kezelés esetén hatékonyságban nem volt különbség a hasüregi és izomközi bejuttatási mód között a cápaharcsa (*Balantiocheilos melanopterus*) szaporításakor. Azonban azonos hipofízis-mennyiségű (csatornaharcsa-, (*Ictalurus punctatus*) és pontyhipofízis) kezeléskor intramuszkuláris bejuttatással jelentősen jobb szaporítási eredményeket értek el, mint intraperitoneális injektálás során.

2) *Implantátum*: A fiziológiás sóoldatban feloldott és injektált hormonok néhány perc alatt bejutnak a vérkeringésbe ezt követően metabolizálódnak, lebomlanak és kiürülnek. A GnRHa biológiai felezési ideje például kevesebb, mint 30 perc (Gothilf és Zohar, 1991). Implantátumok esetében a hormonkészítményeket olyan vivőanyagba oldva juttatják a halak testébe, amelyből a hormonok kis dózisban, de hosszú idő (akár több hét) alatt szabadulnak fel és jutnak a vérkeringésbe. Előnye, hogy nagymértékben csökken a halakat érő stressz, mert csökken a kezelések száma, továbbá az egyenletesen a véráramba jutó kis hormonadagokkal jól szimulálható a természetes élettani működés (elkerülhető a „hormoncsúcs” a vérplazmában), ezáltal jobb minőségű ivartermék nyerhető. Hátránya viszont, hogy még nem áll rendelkezésre üzemi szintű gyártásuk, valamint a bejuttatást is egyedileg kell megoldani. A kezelt halaknak emellett egy minimális méretet is el kell érniük ahhoz, hogy a pellet méretéből adódóan a beültetés ne okozzon egészségügyi problémát. Emellett a beavatkozást követően mindenképpen szükség van lokális antibiotikum kezelésre (seb bevarrást követő fertőtlenítés), hogy a fertőzés esélyét csökkentsék. Az implantátumok/pelletek egy részét injekciós tűvel, hormonimplantátum-tűvel vagy trokárral juttatják a hasüregbe vagy az izomszövetbe, másik részét pedig altatásban, sebészeti úton kell beültetni. Az úgynevezett petefészekmosási technika esetén nincs szükség invazív beavatkozásra (ld. 5.b alpont). Az elsőként alkalmazott elnyújtott hatóanyag leadású vivőanyag a koleszterin volt atlanti lazacnál (*Salmo salar* – Weil és Crim, 1983), illetve a koleszterin és cellulóz keveréke atlanti heringnél (*Clupea harengus* – Carolsfeld et al., 1988). A módszer hátránya, hogy a hormonfelszabadulás mértéke pelletenként változó, valamint a koleszterin, mint aktív biomolekula és a szteroid hormonok prekursora, befolyásolta az ivarszervek működését (Mylonas és Zohar, 2000). Azóta tökéletesítették a módszert és ma már többféle vivőanyaggal végeztek sikeres szaporítást/ivarérlelést különféle halfajokban. Ilyenek például a szilikongumi vagy szilasztik (tejhal *Chanos chanos*) – Lee et al., 1986a,b), “water-in-oil-in-water” típusú emulzió, például lipofilizált zselatin és gyapotmag-olaj keverék (*A. japonica* – Sato et al., 1997), karbopol (csuka *Esox lucius* – Szabó, 2008), etilén-vinil-acetát kopolimer (kékúszójú tonhal *Thunnus thunnus* – Mylonas et al., 2007, *Mugil cephalus* – Aizen

et al., 2005), biológiailag lebontható mikroszemcsék (potenciális alkalmazási terület a díszhal-szaporítás – Mylonas és Zohar, 2001). Ilyen, biológiailag lebontható mikrorészecskék például a poli(tejsav) és a poli(tej-ko-glikolsav)) jelenleg terjedőben lévő módszer a humán gyógyászatban, így várható, hogy hamarosan a haltenyésztésben is alkalmazni fogják (Matejkova és Podhorec, 2019). Alkalmazzák még az ozmotikus pumpákat (tejhal – Marte et al., 1987), vagy a nem lebontható implantátumokat, mint például a metakrilát kopolimert (*Plecoglossus altivelis* – Hirose et al., 1990). A vivőanyag típusától és vízhőmérséklettől függően a hormonfelszabadulás időtartama 1-5 hét (Mylonas és Zohar, 2001).

2aa) Bóditás nélküli kezelés: A nyíltvízi életformában élő, ketrecekben nevelt és folyamatosan úszó tonhalfajok (pl. kékuszójú tonhal) különösen érzékenyek bármilyen manipulációra (pl. megfogás, altatás stb.). Esetükben a hormontartalmú implantátumot a ketrecre a halak közé lemerülő búvárok egy speciális szigony segítségével „lövik be” a hátizom mögé. Az implantátum kialakítása nemcsak a hormon bejuttatását hivatott biztosítani, hanem azt is, hogy a hormon az izomszövet meghatározott mélységében szabaduljon fel, valamint a retard vivőanyag ne essen ki idő előtt a halakból (Mylonas et al., 2007).

3) Hormontermelő sejtek beültetése: A xenotranszplantáció vagy heterológ transzplantáció élő sejtek, szövetek vagy szervek egyik fajból egy másikba történő átültetését jelenti (Doodeniya és Warrens, 2003; Perera et al., 2017). A holland Leiden Egyetemen projekt indult abból a célból, hogy az európai angolna hormonálisan indukált ivarérelésére egy olyan módszert dolgozzanak ki, amelyhez nincs szükség heti hormonkezelésre több hónapon keresztül. Az elgondolás alapja az volt, hogy olyan embrionális sejt vonalakat vonjanak ki és ültessenek át zebradánióból angolna ikrásokba, amelyek kimondottan az FSH-LH (GtH I., GtH II.) termeléséért felelősek. Ezáltal egy megemelt és folyamatosan magas vérplazma FSH szint biztosítja a vitellogenezis végbementét, bármilyen egyéb kezelés nélkül. Az átültetett sejtek jelenlétét hetente ellenőrizték, egy hónapos időtartam alatt. Ez idő alatt morfológiai jelek alapján (szem-, és mellúszóindex) sikerült bizonyítani az angolna kezdeti ivarérelését, kimutatták továbbá, hogy a kezelés hatására növekedett a vitellogenin gén és fehérje expressziója (Schnabel et al., 2007).

4) Szájon keresztüli (per os) kezelés: Alapvetően két részre bonthatók, a hormonfelszívódás helye alapján.

4a) Kopoltyúin keresztüli felszívódás: A kopoltyúlemezek az élettani sajátosságoknak köszönhetően (külső légzés – oldott gázok cseréje) alkotják a legkisebb távolságot a külső környezet és a vérkeringés között (1-5 μm). A módszer alapja, hogy hormont oldat formájában a szájüregbe juttatják, majd a szájnyílást és a kopoltyúfedőket befogják/lezárják egy ideig, hogy a bejuttatott hormon felszívódjon. Ezzel a módszerrel Hill et al. (2005) dimetil-szulfidban oldott lazac GnRH α + domperidonnal sikeresen szaporítottak vörös rojtosszájú halat (*Epalzeorhynchus erythrus*). Az eljárás igazolhatóan hatott a spermatermelés mennyiségének növelésére és a spermaminőség javítására ezüst razbórában (*Rasbora argyrotaenia*) is (Adawiyah et al., 2019). Ezt a módszert kimondottan kisméretű halak szaporítására fejlesztették ki. A halak egyedi kezelése viszonylag sok időt vesz igénybe, kis méretük miatt gondosabb előkészítést és kezelést igényelnek.

4b) Bélrendszerben felszívódó (enterális) kezelés. Sok halfaj (például a pontyalakúak) agasztrikus („gyomor nélküli”) emésztőszerv-rendszerrel rendelkezik, így ezekben a fajokban nincs sósavas-pepszines emésztő szakasz. A gyomor helyett béltágulat található, amely csak szövettanilag tér el némiképp a további bélszakaszoktól. A bélnyálkahártya és a hasnyálmirigy enzimeji 6,7-7,7-es pH-érték mellett bontják a fehérjéket (tripszin, erepszin), a zsírokat (lipáz) és a szénhidrátokat (amiláz, maltáz). Tengeri, ún. szénhalak (*Anoplopoma fimbria*) szaporításával foglalkozó kutatóknak akadályt jelentett, hogy

a faj nagyon érzékenyen reagált a hagyományos indukált szaporítás műveleteire, így a kezelési stresszt csökkentő eljárást dolgoztak ki. Solar et al. (1990) egy vékony cső segítségével szájon keresztül (per os) GnRH analóg kezelést végzett, aminek hatására a halak leívtak. Pöttyös tengeri pisztrángban (*Cynoscion nebulosus*) bizonyították a bélen keresztüli GnRHa felszívódást, ami sikeres ívást váltott ki. Az intramuszkuláris kezeléshez képest azonban tízszeres hormonadagra volt szükség (Thomas és Boyd, 1989). Sukumasavin et al. (1992) sikeresen szaporított thai pontyot (*Puntius gonionotus*) különböző mennyiségű GnRHa + domperidon kombinációval szájon át történő kezeléssel. Ezt a módszert máig kevés helyen alkalmazzák állományszinten (Tajvanon van például egy termelő, aki takarmányba kevert hormonnal sikeresen szaporít tejhalat (Harvey és Carolsfeld, 1993)). Kookaram et al. (2021) takarmányba kevert kitozán és GnRHa keverékkel petefészek növekedést és oocita fejlődést indukált aranyhalban (*Carassius auratus*). További kísérlet sorozatokat igényel azonban még halfajonként megtalálni azt a hormondózis-küszöböt, amely ovulációt indukál. Szintén szükséges a hormonfelszívódás hatékonyságát növelő „védett forma” kialakítása is.

5) *Rektális kezelés*: Mikolajczyk et al. (2002) összehasonlította az orális és a rektális hormonbejuttatási módszerek hatékonyságát ponty fajban. Rektális kezeléskor a végbélnyíláson keresztül (~3 cm) vezettek fel egy hajlékony polietilén csövet, amelyen keresztül GnRHa-t és pimozidot juttattak a bélcsatornába. A szájon át történő és rektális bejuttatási módszer ugyanolyan hatékonyan emelte a vérplazma GtH II. szintjét a kezelést követően, tehát a bél elülső és hátulsó szakaszain a felszívódás közel azonos mértékű volt. Mivel kísérleteiket az ívási időszak előtt végezték, így a szaporodásra még nem felkészült pontyokat nem sikerült ovulációra bírni.

6) *Petefészekmosás*: Ezt a kifejezést a hormonkezelés katéteren keresztüli petefészekbe juttatására alkalmazzák (ovarian lavage, Watson et al., 2009a,b). Lényege, hogy katéter, biopszia-mintavevő és etetőszonda segítségével a genitális nyíláson, majd a petevezetőn keresztül közvetlenül a petefészek-üregbe juttatják a hormonoldatot vagy szuszpenziót.

6a) *Fiziológiás sóoldat vivőanyag*: Egyes halfajok túlzott érzékenységet mutatnak az invazív hormonbejuttatási módszerek iránt, vagy kis testméretükből adódóan technikailag nehezebb az injekció alkalmazása. Ezen halak szaporítására dolgoztak ki egy nem-invazív hormonbejuttatási módszert. Watson et al. (2009 a,b) egy katéter segítségével juttattak hCG oldatot zöld-pettyes gömbhal (*Tetraodon nigroviridis*) és vörössávos tűzangolna (*Mastacembelus erythrotaenia*) petefészekleányába a petevezetőn keresztül. A hCG a petefészek falán keresztül felszívódott és a szisztémás keringésbe jutva ovulációt indukált a petefészekben. A halak egy részét sikeresen leszaporították. Hazai halfajok közül ezzel a módszerrel, de pontyhipofízis-szuszpenzióval, sikeresen szaporítottak süllőt (Németh et al., 2012). A legfőbb eredmény, hogy a szaporítás során nyert reprodukciós paramétereket tekintve (fejt ikramennyiség, termékenyülési arány) a kétféle módon kezelt halak (intramuszkuláris és petefészekmosással kezelt csoportok) között nem volt statisztikailag értékelhető különbség.

6b) *Implantátum*: Horváth László professzor munkahipotézise szerint (Horváth, személyes közlés) a katéterrel nem-invazív módon, vagy injektálással invazív módon, petefészekbe bejuttatott natív tojásfehérjét (baromfi) alkotó egyes alkotóelemeknek szerepe lehet az ovulációra kész petesejtek élettani folyamatainak optimalizálásában, arra gyors pozitív hatást fejthet ki, ami az ovulált hal egyedek számának növekedésében, illetve parciális ovuláció esetén az ovulált petesejtek mennyiségének növekedésében realizálódhat. Az exogén tojásfehérje ovulációt segítő szerepe az oocita follikuluszában a tojásfehérje összetétele miatt inkább a granulosa sejtréteg gyors fehérje szintézisének optimalizálását segítheti és nem a lassabb vitellogenezist, illetve szteroidogenezist, ámbar ez a hatás sem zárható ki. Afrikai harcsába nem fiziológiás sóoldatban, hanem tojásfehérje vivőanyaggal, katéter segítségével

juttattunk be GnRHa + metakrop dopamin receptor antagonistá keveréket. A beérési időben, ikraprodukcióban és a termékenyülési értékben statisztikailag igazolhatóan nem volt különbség ($p > 0,05$) más kísérletbe vont hormonbejuttatási módszerektől; intraperitoneális vagy intramuszkuláris injekció, petefészekmosás fiziológiás sóoldat vivőanyaggal (Müller et al., 2020b).

6c) *(Sperma) inszemináció*: A dolgozat tárgya, emiatt a 2.2-2.4 fejezetekben kerül részletes ismertetésre.

2.1.5. Mélyhűtött sperma felhasználása (alkalmazása)

A spermamélyhűtés, mint módszer lehetővé teszi az értékes genetikai állomány rövid és hosszú távú tárolását a szelekciós programokhoz, a biodiverzitás megőrzéséhez, valamint indukált szaporítás esetén szükségtelemmé teszi az együttes ivarszinkronizációt (Yang et al., 2009; Cabrita et al., 2010; Asturiano et al., 2017; Martínez-Páramo et al., 2017). A spermamélyhűtésnek gazdag irodalma van, a halsperma fagyasztás történeti áttekintéséről, fejlődéséről, alkalmazási területeiről számos összefoglaló tanulmány jelent meg (pl. Martínez-Páramo et al., 2017; Asturiano et al., 2017). Jelenleg a valódi külső megtermékenyítésű halfajok esetében csak *in vitro* termékenyítési módszerrel lehet sikeresen alkalmazni. Ez a sajátosság az ivarsejtek mélyhűtésének fiziológiai jellegéből adódik. A spermiumok mélyhűtése során el kell kerülni az intracelluláris kristályképződést, amit fagyásvédő adalékokkal oldanak meg. A leggyakrabban alkalmazott védőanyagok – a metanol (MeOH) és a dimetil-szulfoxid (Me₂SO vagy DMSO) – szobahőmérsékleten citotoxikusak (elősegítik a celluláris dehidratációt, destabilizálják a membránokat és fehérjéket), emiatt a spermát felolvasztást követően rövid időn belül fel kell használni termékenyítésre, valamint a termékenyítést követően célszerű eltávolítani a főlösleget (kihígítás). Külső megtermékenyítésű halfajok (indukált) ívatásos szaporítása esetében saját vizsgálataink előtt még nem publikáltak olyan módszert, amiben mélyhűtött spermát sikerült felhasználni. Ezzel szemben életképes lárvákat sikerült nyerni mélyhűtött sperma felhasználásával belső megtermékenyítésű (vivipara) halfajoknál. Yang et al. (2007; 2009) mexikói kardfarkú hal (*Xiphophorus helleri*) és *X. couchianus* fajok esetében a mélyhűtött majd felolvasztott sperma centrifugálásával elválasztották egymástól a spermiumokat a sejten kívüli védőanyag és szeminális plazma keveréktől. Ezt követően a spermiumokat újra szuszpendálták mesterséges szeminális plazmával (eltérő ionos összetételű, glükóz és/vagy szarvasmarha magzati szérum (FBS) hozzáadásával) és az ikrásokba injektálták, amelyek termékenyültek és életképes utódokat hoztak létre.

2.2. Anyag és módszer

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.

2.2.1. Általános módszertan

2.2.1.1. Mesterséges spermahelyezés/inszemináció afrikai harcsa, ponty és dél-amerikai eüstharcsa fajokban

A sperma bejuttatását (befecskendezését) szilikon katéter (csecsemő etetőszonda) segítségével végeztük. A katéter paraméterei: hossz: 400 mm, külső átmérő: 1,3 mm, belső átmérő: 1mm (GALMED Wytwórnia Sprzętu Medycznego[®], Lengyelország). Az etetőszonda segítségével, kísérleti ciklusonként változó mennyiségben, kevert spermamintát fecskendeztünk közvetlenül az előzőleg bódított ikrások petefészek lebenyébe, a hal méretétől függően 7-15 cm mélyre a genitális nyíláson, valamint a petevezetőn keresztül. Az ivarsejt veszteségek elkerülése érdekében ponty fajban a hormonkezelést és a sperma petefészekbe injektálását követően az ivarnyílást bevarrtuk (Safil[®] green, USP 0 metric 3.5 sebvarró szett) Antalfi és Tölg (1966), valamint Horváth et al. (2015) módszere szerint.

2.2.1.2. Statisztikai elemzés

A különböző kísérletek során felvett paraméterek értékeit statisztikailag az SPSS v22 (IBM Corp, 2013) programcsomag segítségével hasonlítottuk össze. Az alkalmazott statisztikai próbák az eredmények fejezetben kerülnek közlésre.

2.2.2. Ponty modell fajban végzett kísérletek

A két kísérletsorozatban alapvetően 3 kérdésre kerestük a választ:

- 1) Az inszeminációs módszer milyen mértékben hat az ikratermelésre?
- 2) A spermiumsejtek megtartják-e termékenyítőkéességüket a petefészekben az ovulációt megelőző 2 és 12 órás inkubációs idő alatt?
- 3) Amennyiben sikerül termékenyíteni, akkor az milyen arányban tér el a kontroll termékenyülési eredményektől?

2.2.2.1. A kísérleti körülmények

Első kísérlet (helyszín: Ittész István magánvállalkozó, Nagykarácsony): a szaporításra felkészített 3-4 éves japán díszponty/koi (*C. rubrofasciatus* „koi”) ikrásokat véletlenszerűen válogattuk ki a tenyészállományból és három csoportot alakítottunk ki, csoportonként 6-6 hallal (testtömeg = 1059±281 g, n = 18). A három csoportot három, egyenként 3000 literes medencébe helyeztük. A tejeseket (n = 18) szintén véletlenszerűen válogattuk ki és az ikrásoktól külön, egy másik 3000 literes kádba telepítettük. A fogadó víz hőmérséklet 17 °C volt. A megvilágítás természetszerű volt (16/8 óra fény/sötét periódus). A kezeléseket előtt (hormon indukció, ivarsejt gyűjtés stb.) a halakat minden esetben 100 mg / l benzocain (etil 4-126 aminobenzoát, Norcaine) oldattal altattuk a telepi gyakorlatnak megfelelően.

Második kísérlet (helyszín: Attala Fish Farm Kft., Attala): a szaporításra felkészített 10-15 éves ikrások közül válogattunk ki 5 egyedet (testtömeg = 7840 ± 502 g). Az ikrásokat egy 10 ezer literes kádban tartottuk, a betelepítéskori vízhőmérséklet 17 °C volt. A megvilágítás természetszerű volt (16/8 óra fény/sötét periódus). Az ikrásokat és a tejeseket egymástól elkülönítve tartottuk. A kezeléseik előtt (hormon indukció, ivarsejtgyűjtés stb.) a halakat szegfűszegolajos oldatban (*Syzygium aromaticum*: 20 csepp / 10 liter víz) altattuk a telepi gyakorlatnak megfelelően.

2.2.2.2. Tejesek hormonkezelése és a spermafejés

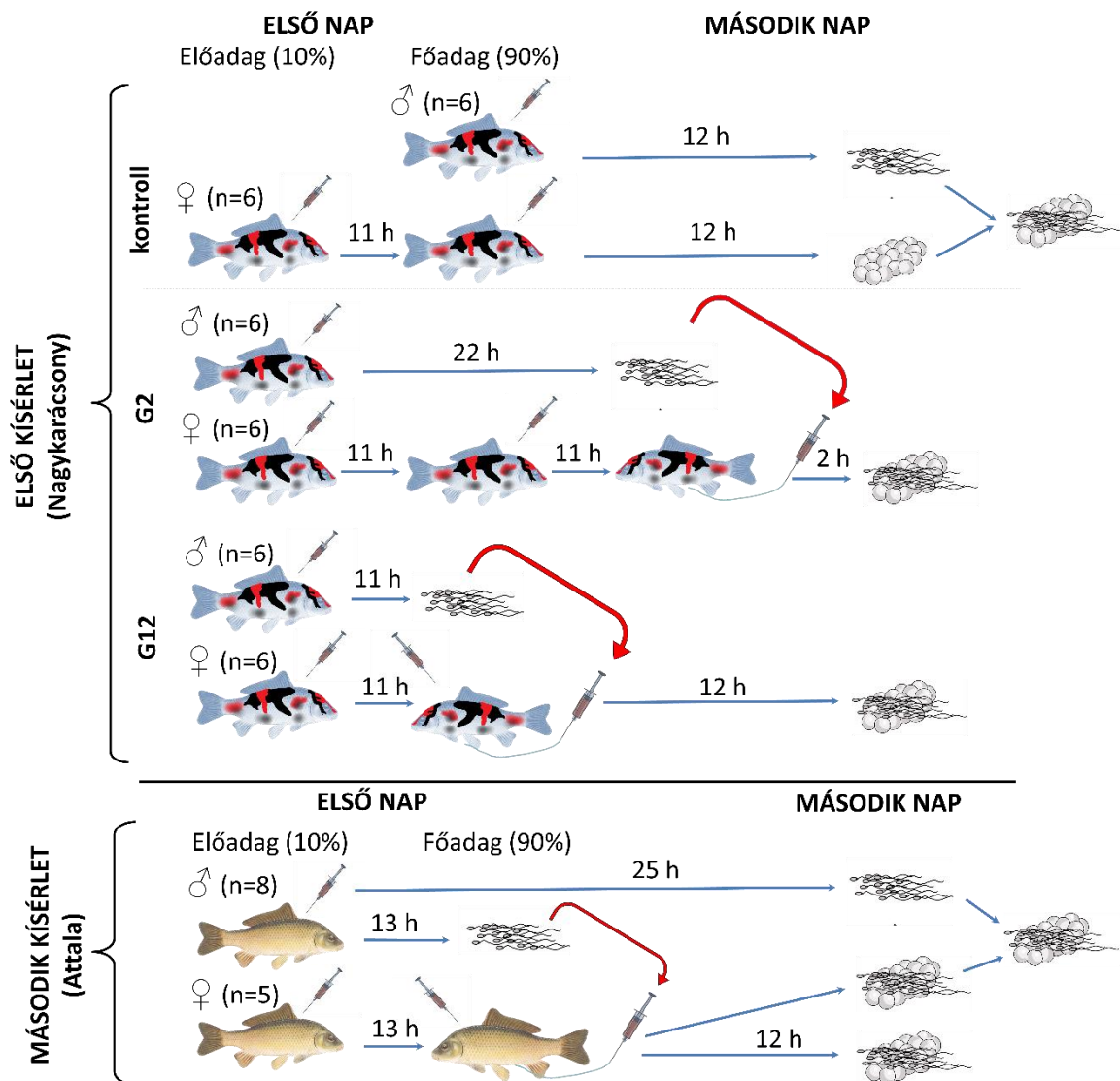
A két kísérlet sorozatban a tejesek kezelése azonos volt. A tejeseket egyszer kezeltük 3 mg acetonnal pontyhipofízis kivonat NaCl szuszpenzióval (CPE) / testtömeg kg dózisban, 12 órával az ikrások kezelése előtt (első kísérlet: kontroll: $n = 6$, testtömeg: $795,3 \pm 156,9$ g, 1 csoport (G2): $n = 6$, testtömeg: $878,8 \pm 252,7$ g, 2. csoport (G12): $n = 6$ testtömeg: $745 \pm 146,2$ g; második kísérlet: $n = 8$, testtömeg: $8275 \pm 1594,4$ g). Spermagyűjtéskor a bódított tejesek genitális tájékát szárazra töröltük, majd a hasfal nyomásával spermát fejtünk egyedenként külön 25 ml-es falconcsövekbe (első kísérlet), vagy 250 ml-es üvegpoharakba (második kísérlet). A lefejt spermamennyiségekből mintát vettünk. A sejtek mozgóképességét mikroszkóp ($200\times$ nagyítás) segítségével becsültük. A kísérletekben csak a legalább 80%-os mozgóképességet elérő spermamintákat használtuk fel (első kísérlet: kontroll $n = 6$, G2 $n = 5$, G12 $n = 6$; második kísérlet $n = 8$). A spermamintákat csoportonként pooloztuk, hogy azonos minőségű (mozgóképességű) spermamintákkal végezzük a termékenyítési teszteket. Mindkét kísérlet esetén a poolozott sperma tételeket megmintáztuk és Bürker kamra segítségével sejtszámot mértünk. Az 1. kísérletben a G2 csoport $51,35 \times 10^9$ sejt/ml, G12: $12,59 \times 10^9$ sejt / ml a 2. kísérletben pedig $70,49 \times 10^9$ volt.

2.2.2.3. Ikrások hormonkezelése

A ponty keltetőházi gyakorlatának megfelelően kezeltük a csoportokat (előadag, döntő adag, lásd 2. ábra), a hormonkezelés menete megegyezett az előző fejezetben leírtakéval. Az előadag $0,3$ mg CPE / testtömeg kg, a döntő adag pedig $1,5$ ml homogenizátum ($2,7$ mg CPE / testtömeg kg) volt.

2.2.2.4. A kísérleti beállítás

Az ikrásoknál három kísérleti csoportot hoztunk létre, melyek két kezelt és egy kontroll csoportból álltak (2. ábra). A kontroll csoportot a keltetőházi szaporítás gyakorlatának megfelelően kezeltük (Horváth et al., 2015). A G2 csoportnál a sperma adagokat a számított fejésidő előtt 2 órával juttattuk fel az egyik petefészekzsákba. A G12 csoport esetén pedig a sperma adagokat a számított fejésidő előtt 12 órával juttattuk fel az egyik petefészeklebenybe. A 2. kísérletben csak egy időpontban juttattunk fel spermát: 12 órával az ikrafejést megelőzően.



2. ábra. Sematikus összefoglaló ábra a kísérletről. A hormonálisan indukált szaporítás és inszemináció elemeinek időzítése a kísérletben szereplő csoportok esetében.

2.2.2.5. Gaméták gyűjtése és termékenyítés

A keltetőházi gyakorlatnak megfelelően az ikrásokat ~260 napfoknál kiemeltük (12 órával a döntő adagú kezelést követően), nedves törölközőbe csavartuk és az ikrát (első kísérlet kontroll) és az ikrát és spermát együtt a spermamintákkal kezelt csoportok esetében (első és második csoport) száraz műanyag edénybe fejtük le. A lefejt tételeket lemértük és belőlük pseudo-gonadoszomatikus indexet (PGSI) számoltunk (lefejt ikramennyiség / testtömeg fejtés előtt $\times 100$ (%)).

Első kísérlet: a kontroll halak ikramennyiségét 6 tejesből származó poolozott spermamintával kevertük össze (1-3 ml sperma / fejt ikratömeg) és ezt követően száraz termékenyítési eljárással termékenyítettünk mindhárom csoportból származó tételeket azonos módon. A termékenyítési folyamat lépései megegyeztek Woynárovich (1961), valamint Horváth et al. (2015) által leírt lépésekkel. A kiduzzadt ikratételeket anyaghalanként mintáztuk (másfél órával a termékenyítést követően) és ikratételeként kétszeri ismétlésben ikramintákat vettünk petricsészékbe (32 – 93

ikra / petricsésze, $\emptyset = 55$ mm). Az ikratételeket $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk és 48 órával a termékenyítést követően meghatároztuk a termékenyülési arányt.

Második kísérlet: a kísérleti halakból fejt gaméta tételeket (ikra és sperma) két részre osztottuk. Egy adagot Woynárovich-oldattal aktiváltunk és termékenyítettünk, míg a másik gamétatételre még egy adag friss spermát helyeztünk (térfogatmennyiség 10%-a), majd ezt követően termékenyítettünk (kontroll). Másfél óra duzzasztást követően egyedenként 2-2 termékenyített ikramintát vettünk és petricsészeben inkubáltuk tovább (32 – 93 ikra / petricsésze).

Termékenyülési százalék = élő embriót tartalmazó ikraszemek száma /össz. ikraszám) $\times 100$ (%).

2.2.3. Afrikai harcsában végzett kísérletek I. (A sperma szeminális folyadék, mint exogén hormon vivőanyag)

A pontyokkal végzett kísérletben megfigyeltük, hogy a sperma alkotóelemeiből a szeminális folyadék a 12 órás petefészek inkubációs idő alatt felszívódott. Ezen megfigyelés alapján három kérdésre kerestük a választ:

- 1) A spermával összekevert porított pontyhipofízis kivált-e ovulációt (a sperma szeminális plazma alkalmas-e hormon vivőanyagként)?
- 2) A porított pontyhipofízis befolyásolja-e a spermiumok életképességét petefészek körülmények között (milyen lesz a termékenyülés)?
- 3) Amennyiben a halak beérnek és lefejhetők, úgy a kinyert ikratételek termékenyítőképességét lehet-e emelni hozzáadott friss natív spermaadagokkal, *in vitro* termékenyítéssel?

2.2.3.1. Anyahalak jellemzése

Az elő-, (A1) és főkísérletet (A2) a MATE (volt SZIE) Halgazdálkodási Tanszékén végeztük. Mindkét kísérletben 14 hónapos afrikai harcsákat használtunk anyaállománynak, amelyeket a tanszék recirkulációs rendszerében neveltek kereskedelmi forgalomban lévő teljes értékű keveréktakarmánnyal (Aller Performa 2-4). Mindkét kísérletben a halakat 30 l-es kádakban tartottuk a hormonkezelést követően (vízcsera nélkül) azonos fényviszonyok között (16/8 óra fény/sötét periódus). A kezeléseket előtt a halakat 100 mg/l benzokain oldattal bódítottuk a könnyebb kezelés érdekében.

2.2.3.2. Tejesek hormonkezelése és a spermakinyerés

A tejesek mindkét kísérlet során azonos hormonkezelésben részesültek és a spermakinyerés is azonos módon történt a tervezett fejés előtt 20 órával. A halak 3 mg CPE / 1ml 0,9% NaCl-oldat / testtömeg kg dózist kaptak intraperitoneálisan injektálva. Az A1-es kísérletben a halak ($n = 2$) testtömege: 1308 és 1856 g volt, az A2-es kísérletben ($n = 4$) testtömeg: $1366 \pm 164,1$ g volt. Mivel az A2 kísérletben frissen kinyert spermát is használtunk, ezért a 2 tejes hormonkezelése és a sperma kinyerése az ikrások kezelésével egy időben zajlott.

A tejeseket túllattuk, majd a gerincoszlop átvágásával elöltük. A páros heréket kioperáltuk a hasüregből, majd vigyázva arra, hogy vízaktiváció ne következzen be, a heréket felvágtuk és planktonhálón átpasszíroztuk. A kinyert spermában a spermiumok mozgóképességét – hasonlóan a pontynál ismertetett módszerrel – mozgóképesség vizsgálatnak vetettük alá. Mivel

minden vizsgálatba vont tejes spermamintája meggyőző minőséget mutatott (80%-nál nagyobb becsült motilitás), így minden mintát pooloztunk és felhasználtunk az inszeminációkor.

2.2.3.3. Ikrások hormonkezelése

Hasonlóan a pontynál leírt módszerrel és eszközökkel (etetőszonda + 2 ml fecskendő), szilikon katéteren keresztül juttattuk fel a sperma + CPE keveréket vagy a CPE + NaCl szuszpenziót a petefészeküregbe.

2.2.3.4. Kísérleti beállítások

Az A1 kísérletben a hormon vivőanyagát teszteltük. Két kezelést alkalmaztunk:

- 1) A jobb petefészekleányba az ovulációt kiváltó pontyhipofízis-NaCl szuszpenziót juttattuk be (1 ml 0,9% NaCl oldat / 5 mg CPE / testtömeg kg), a bal petefészekleányba pedig inszemináltunk (2 ml poolozott sperma / testtömeg kg, n = 2, #1-2, testtömeg: 4. táblázat)
- 2) A halak másik részébe olyan poolozott spermamintát injektáltunk, amibe előzetesen porított pontyhipofízist kevertünk (2 ml sperma + 5 mg CPE / testtömeg kg, egyenlő arányban megosztva a két petefészekleányba, n = 3, #3-5 ikrás, testtömeg: 4. táblázat).

Az A2 kísérletben az ikrások, a sperma mintában szuszpendált pontyhipofízis injektálásban részesültek, hasonlóan, mint az A1-es kísérletben (2 ml sperma + 5 mg CPE / testtömeg kg, egyenlő arányban megosztva a két petefészekleányba). Kontrollként friss spermával is termékenyítettük a lefejt ikratételek felét, ezzel ellenőrizve az injektált és frissen kinyert sperma közötti különbséget (2.2.3.5. fejezet).

2.2.3.5. Gaméták gyűjtése és termékenyítés

Az A1 kísérletben 10 órával a kezelést követően az ikrásokat külön-külön fejőedényekbe fejtük. A lefejt tételeket lemértük és PGSI-t számoltunk.

A fejt ikra+sperma tételeket a vízaktiváció előtt kevertük majd pihentetett csapvízzel (termékenyítés előtt egy nappal 20 liter csapvizet 20 °C-ra temperálva állni hagytuk) termékenyítettünk. A termékenyítést követő ötödik percben minden ikratételekből véletlenszerűen 3-3 mintát vettünk ki petricsészékbe (átlag 113 ikra / petricsésze, Ø = 55 mm) és 20 °C-on inkubáltuk. A petricsészékben minden második órában vízcsere-t hajtottunk végre (~80%-os vízcsere) a termékenyülési arány meghatározásáig. A termékenyülési értékeket 12 órás, gerinchúros embrió fejlettségi állapotban számoltuk, ImageJ (Rasband, 2011) programcsomag segítségével. Termékenyülési arány = élő embriót tartalmazó ikraszemek száma / össz. ikraszám) × 100 (%).

Az A2 kísérletben a kezelést követően 10 órával az ikrásokat külön-külön fejőedényekbe fejtük. A lefejt tételeket lemértük és belőlük PGSI-t számoltunk, majd az ikratételeket két részre bontottuk. Az egyik termékenyítése megegyezett az A1 csoportban leírtakéval, míg a másik ikratételeket ismételt kontroll tejesekből származó spermamintával kevertük össze. A kontroll ikratételekben az ikraminőséget kívántuk megvizsgálni, azaz nemcsak az inszemináció útján sikeresen termékenyült ikramennyiség arányát, hanem az összes termékenyíthető ikraszemet. A második ikratételekhez (~15 g fejt gaméta; ikra és injektált sperma keverék) 0,5 ml frissen gyűjtött natív spermát adtunk. Vízaktivációt követő ötödik percben minden ikratételekből

véletlenszerűen 3-3 mintát vettünk ki petricsészékbe (átlag 56 ikra / petricsésze, $\emptyset = 55$ mm).

2.2.4. Afrikai harcsában végzett kísérletek II. (a petefészeklebenybe injektált sperma termékenyítőképesség az idő függvényében)

A kísérletsorozatban alapvetően arra kerestük a választ, hogy a sperma biológiai aktivitását/termékenyítő képességét mennyi ideig képes megtartani petefészek körülmények között.

2.2.4.1. Anyahalállomány kiválasztása

A kísérleteket a MATE (volt Pannon Egyetem) Georgikon Campus hallaboratóriumában végeztük. A 36 hónapos anyahalak saját szaporítású és nevelésű állományaikból származtak és a kísérlethez felhasznált egyedeket véletlenszerűen válogattuk ki.

2.2.4.2. Tejeselek hormonkezelése, ivarsejt gyűjtés

A tejeseket ($n = 21$, testtömeg = $442,4 \pm 100,1$ g) 5 mg CPE / testtömeg kg adagban kezeltük intraperitoneális injektálással, 24 órával az ivartermék gyűjtés előtt. A spermagyűjtés megegyezett az 2.2.3. fejezetben leírtakkal. A gyűjtött sperma minőségellenőrzését mikroszkóp alatt végeztük ($200\times$ -os nagyítás, Olympus BX43, Olympus Corp., Tokyo, Japán) és becsültük a mozgóképes sejtek arányát.

2.2.4.3. Inszemináció

Minden ikrás petefészeklebenyébe összesen 2 ml sperma / testtömeg kg mennyiséget juttattunk fel egyenlő arányban megosztva a két petefészeklebenybe; 5, 10, 15, 20, 25, 36 és 48 órával ($n = 5$ ikrás csoportonként, 3. ábra) a programozottan kiváltott ovuláció előtt.

2.2.4.4. Ikrások hormonkezelése

Az ikrásokat mindkét kísérleti ciklusban 5 mg CPE / testtömeg kg adagban kezeltük intraperitoneális injekcióval, 10 órával az ikrafejés előtt (3. ábra).

2.2.4.5. Termékenyítés

A gaméta fejest (ikra és sperma együttesen) követően egyedenként a tételeket levegőztetett csapvízzel termékenyítettük, majd 5 perc múlva a termékenyítési tesztekhez ikratételeket vettünk ki 3 ismétlésben petricsészékbe (átlagos ikra 1. kísérlet = $76,3 \pm 21,3$, 2. kísérlet = $188,9 \pm 63,2$ volt, petricsésze $\emptyset = 105$ mm) és 25°C -on inkubáltuk átfolyó vízben (csepegtető berendezés: vízátfolyási sebesség 1700-1900 ml / óra) kelésig. Meghatároztuk a termékenyítőképességet a termékenyítést követő 12. órában (szomitogenezis állapot), valamint a kelési arányt a 36. órában.

2.2.5. Afrikai harcsában végzett kísérletek III. (sperma ikra arány vizsgálatok)

A kísérletsorozatban alapvetően arra kerestük a választ, hogy a 3 eltérő mennyiségben petefészekbe juttatott sperma adag milyen mértékben hat a termékenyülőképességre 10 órás inkubáció mellett.

2.2.5.1. Anyahalállomány kiválasztása

A kísérleteket a MATE (volt Pannon Egyetem) Georgikon Campus hallaboratóriumában végeztük, az anyahalak saját szaporítású és nevelésű állományaikból származtak. A vizsgálatba vont egyedeket 36 hónapos halakból véletlenszerűen válogattuk ki.

2.2.5.2. Tejesek hormonkezelése, ivarsejt gyűjtés

A tejeseket ($n = 10$, testtömeg = $360,9 \pm 78,3$ g) 5 mg CPE / testtömeg kg adagban kezeltük intraperitoneális injekcióval, 24 órával az ivartermék gyűjtés előtt. A spermagyűjtés megegyezett a 2.2.3. fejezetben leírtakkal. A gyűjtött sperma minőségellenőrzése megegyezett a 2.2.4. fejezetben leírtakkal.

2.2.5.3. Inszemináció

A kontroll halakkal együtt 4 kísérleti csoportot állítottunk be (4. ábra). A termékenyítési tesztekhez azonos poolozott spermamintát használtunk fel.

1. csoport: az ikrásokat ($n = 6$) a hormonkezelést követően 0,5 ml sperma adag / testtömeg kg adaggal kezeltük, azonos mennyiségben megosztva a két petefészeklebenybe.

2. csoport: az ikrásokat ($n = 5$) a hormonkezelést követően 1 ml sperma adag / testtömeg kg adaggal kezeltük, azonos mennyiségben megosztva a két petefészeklebenybe.

3. csoport: az ikrásokat ($n = 6$) a hormonkezelést követően 2 ml sperma adag / testtömeg kg adaggal kezeltük, azonos mennyiségben megosztva a két petefészeklebenybe.

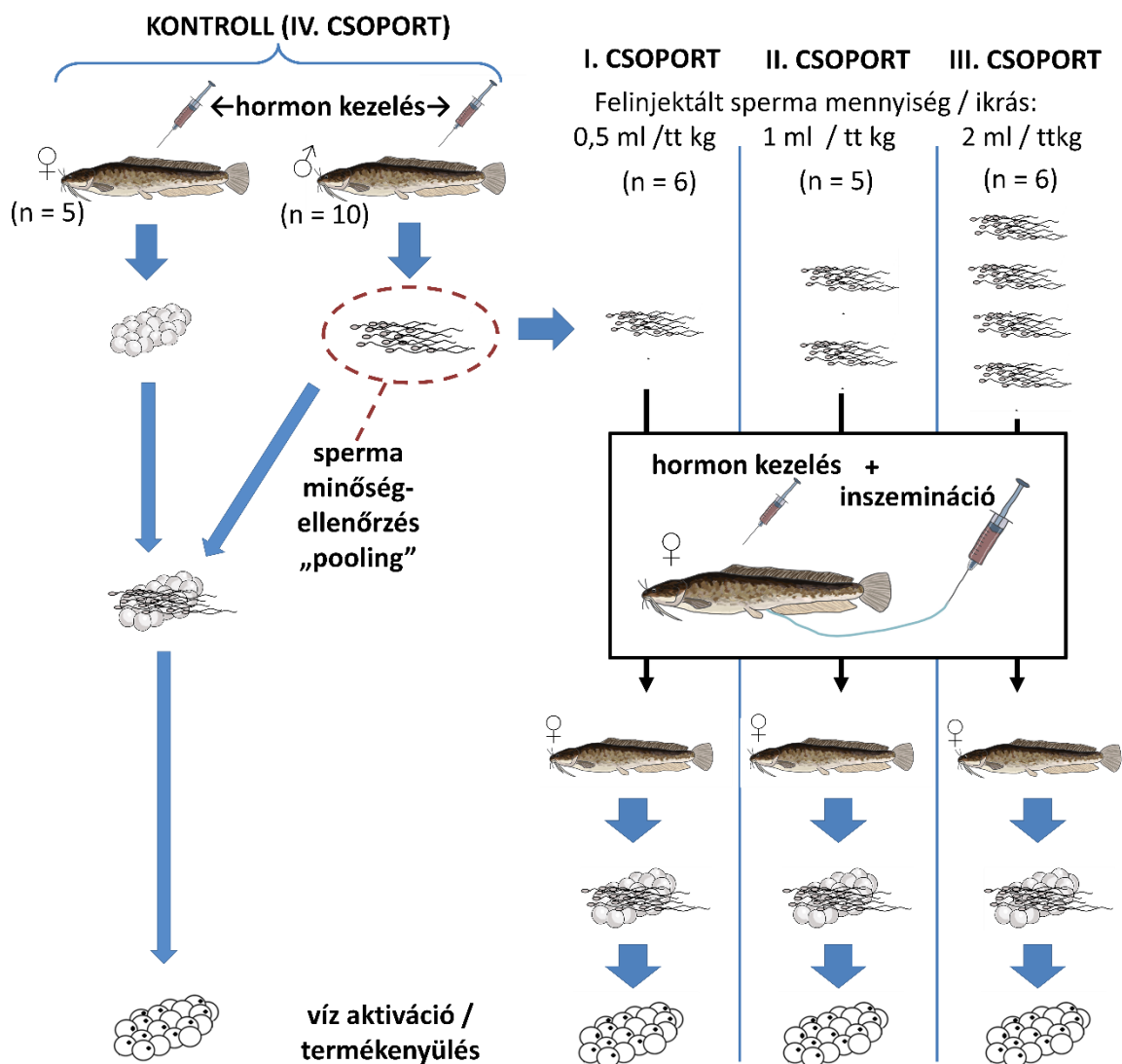
4. csoport (kontroll): az ikrásokat ($n = 5$) azonos spermamintával termékenyítettük 0,1 ml sperma / g ikramennyiség adagban (4. ábra).

2.2.5.4. Ikrások hormonkezelése

Az ikrásokat mindkét kísérleti ciklusban 5 mg CPE / testtömeg kg adaggal kezeltük intraperitoneális injekcióval, 10 órával az ikrafejés előtt.

2.2.5.5. Termékenyítés

A gaméta fejest (ikra és sperma együttesen) követően egyedenként a tételeket levegőztetett csapvízzel termékenyítettük, majd 5 perc múlva 3 ismétlésben ikratételeket vettünk ki a termékenyítési tesztekhez petricsészékbe (átlagos ikra mennyiség = $154,4 \pm 53,8$ / petricsésze, petricsésze $\varnothing = 105$ mm) és 25 °C-on inkubáltuk átfolyó vízen (csepegtető berendezés: vízátfolyási sebesség 1700-1900 ml / óra) keléig. Meghatároztuk a termékenyítőképességet 12. órában a termékenyüléstől számítva (szomitogenezis állapot), valamint a kelési arányt a 36. órában.



4. ábra. Sematikus összefoglaló ábra a kísérletről. A három kísérleti csoport egyedeit ugyanazzal a kevert spermával termékenyítettük

2.2.6. Afrikai harcsában végzett kísérletek IV. (A petefészeklebenybe jutott spermiumsejtek eloszlásának vizsgálata vízaktiváció nélkül)

A vizsgálat célja volt feltárni a petefészek lebenybe injektált spermiumok eloszlását, valamint megvizsgálni, hogy vízaktiváció nélkül létrejöhet-e belső megtermékenyítés vagy belső ivarsejt egyesülés.

A halak kezelése a MATE (volt Szent István Egyetem) Szent István Campus Halgazdálkodási tanszékén, az ivartermékek előkezelése az ELTE mikrobiológiai tanszékén, míg az pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok az MTA Ökológiai Intézetében került sor. Két afrikai harcsa ikrásba (testtömeg: 509-478g) az indukált ovuláció előtt hormonkezelésükkel egy időben spermát injektáltunk. Két ikrást, mint kontroll halakat (testtömeg 512-702 g), inszemináció nélkül hormonkezeltek. Az indukált ovuláció kiváltásának lépései megegyeztek a 2.2.3. fejezetben leírtakkal. Mind a négy ikrásból származó gaméta tételből 1-1 g-ot közvetlenül a

kinyerésüket követően vízaktiváció nélkül glutáraldehid oldatban fixáltuk (5% 0,1 M foszfát pufferben) 3-4 óráig szobahőmérsékleten (20-21 °C). A fixált mintákat kétszer mostuk foszfát-puffer oldattal (pH 7) 85 °C-on, majd fagyasztva szárították (2×10^{-2} mbar, -60 °C, 6-8 órán keresztül). A liofilizálás után a szárított mintákat fémcsonkokra ragasztották és arany porral vonták be. Az ikrák mikropoláris régiójának topográfiai jellemzőit EVO MA 10 Zeiss pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) vizsgálták 5 kV gyorsító feszültséggel, és a mintákról digitális fényképek készültek.

2.2.7. Afrikai harcsában végzett kísérletek V. (mélyhűtött sperma felhasználása inszeminációhoz).

Mélyhűtött sperma használata külső megtermékenyítésű halak esetén eddig csak *in vitro* fertilizációval (felolvasztást követően azonnal) volt lehetséges. A kísérlet sorozatban megvizsgáltuk, hogy a mélyhűtött spermamintákat az új módszerrel is lehet-e sikeresen termékenyítésre használni (a felolvasztást követő 10. órában).

2.2.7.1. Anyahalak kiválasztása

A 16 hónapos afrikai harcsák a V'95 Kft. nagyatádi telephelyéről származtak és azokat a MATE (volt SZIE) Szent István Campus hallaboratóriumába szállítottuk. A 9 tejest és 17 ikrást egy 3 m³-es kádba telepítettük. A ponty tejesek (n = 12) saját nevelésű állományunkból származtak.

2.2.7.2. Tejesek ivarérlelése, sperma kezelés

Az afrikai harcsákat 3 mg CPE / testtömeg kg-al kezeltük 24 órával az ivartermék gyűjtése előtt. 4 afrikai harcsa tejest használtunk az előkísérletben (spermamélyhűtésre n = 2, testtömeg = 1340 és 1466 g és szeminális plazma gyűjtésre n = 2, testtömeg = 1100 és 1298 g, 5. ábra). A főkísérletre 5 afrikai harcsa tejest (sperma mélyhűtésre n = 4, testtömeg = 743,5±202,2 g és egy tejest natív spermamintával való "felültermékenyítésre" testtömeg = 1420 g). Ponty tejeseket (n = 2, testtömeg = 489-506 g az előkísérletben, valamint a főkísérletben n = 10, testtömeg = 578±207 g) 4 mg CPE / testtömeg kg adagban kezeltük 24 órával a spermafejes előtt. A halakat a kezeléseik előtt 2-fenoxietanol (4 ml / l) oldatban bódítottuk. A gyűjtött spermamintákban a szeminális folyadékot a spermiumoktól történő szétválasztásához 1,5 ml-es centrifuga csövekben centrifugáltuk 10 000 / perc fordulatszámom 10 percig 20 °C-on. A szeminális plazmát a felolvasztott és centrifugált mélyhűtött spermaminták előkezeléséhez használtuk fel (lásd. 2.2.7.4. fejezet).

2.2.7.3. Spermamélyhűtés

A sperma kinyerése a 2.2.2. fejezetben leírtak alapján történt. A mélyhűtés megegyezett a Miskolczi et al. (2005), valamint Kovács et al. (2010) által közölt módszerrel. A sperma és hígító (266 mM fruktóz oldat) 1:1 arányú keverékét 20% metanollal egészítettük ki (metanol koncentráció 2,47 M, pH: 7,73). A mintákat 0,5 ml-es műszalmákba szívtuk fel (Minitüb, Germany), melyeket 3 cm-re a folyékony nitrogén felszínétől 3 percig előhűtöttük, majd innen kerültek a folyékony nitrogénbe és felhasználásukig nitrogén tartályban tároltuk (-196 °C, Bio 10, Statebourne, UK). A mintákat 24 óra elteltével 40°C-os vízfürdőben 13 másodpercig felolvasztottuk. Minden minta minőségét Számítógépes Spermavizsgáló Rendszer (Computer-assisted Sperm Analysis, CASA) segítségével ellenőriztük (Sperm Vision™ v. 3.7.4., Minitube of America, Verona, USA, csatlakoztatva egy Olympus BX 41 mikroszkóphoz, 20×

negatív fáziskontraszt-objektív alkalmazásával). Ezt követően a mintákat 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekben centrifugáltuk, elválasztottuk a szeminális plazmát a sejtes elemektől, (500 fordulat / perc, 10 perc, 20 °C), ezzel a szeminális plazmában lévő szobahőmérsékleten toxikus metanolt eltávolítani (5. ábra).

2.2.7.4. Felolvasztott sperma előkezelése

A felolvasztott mintákból a centrifugálást követően a sejtes elemeket nem tartalmazó szeminális plazmát, hígítót és a sejten kívüli metanolt a mintákról eltávolítottuk. Ezt követően a natív gyűjtött- és centrifugált afrikai harcsa és ponty spermából származó szeminális plazmát felhasználva a felolvasztott spermiumokat az eredeti térfogatra hígítottuk vissza (5. ábra). A hozzáadott afrikai harcsa és ponty szeminális plazma gyűjtése a 2.2.7.2. fejezetben leírtak szerint történt. Az összekeverést követően a sperma minőségét azonnal ellenőrítük a CASA-rendszer segítségével, majd a mintákat 20 °C-on 24 óráig tároltuk normal légköri nyomáson. A sperma minőségét 5 és 24 óra múlva szintén ellenőriztük. Bürker karma segítségével meghatároztuk a poolozott minták spermaszámát a főkísérletben ($3,51 \times 10^9$ spermiumsejt / ml).

2.2.7.5. Spermium minőségének ellenőrzése

A spermaminták minőségének ellenőrzését CASA-rendszerrel végeztük. Mért paraméterek: progresszív motilitás (%), a sebesség átlagolt útvonalra számolva (VAP; $\mu\text{m} / \text{s}$), a sebesség a teljes megtett útvonalra számolva (VCL; $\mu\text{m} / \text{s}$), a linearitás (LIN; %) és az átlagolt mozgási útvonal egyenestől számított eltérése (STR; %). A spermaminőség méréséhez használt aktiváló oldat összetétele: 45 mM NaCl, 5 mM KCl és 30 mM Tris (pH = 8) (Saad et al., 1988). Minden mintából kétszer vettünk almintát, kétszer aktiváltuk és a kapott átlagolt eredményeket használtuk az elemzéshez.

2.2.7.6. Ikrások hormonkezelése, inszemináció, termékenyítés

Az ikrások hormonindukciója megegyezett a 2.2.4.4. fejezetben leírtakkal. Minden kezelt ikrás petefészeklebenyébe összesen 2 ml előkészített sperma / testtömeg kg mennyiséget juttattunk fel egyenlő arányban megosztva a két petefészeklebenyébe.

1. csoport (kontroll, NC csoport): 5 ikrást (testtömeg = $630,8 \pm 116,5$ g) hagyományos módon termékenyítettünk, majd 5 perc elteltével minden termékenyített ikratételből 3 ismétlés mellett petricsészébe helyeztünk ikrámintákat ($\varnothing = 100$ mm, átlagos ikraszám / petricsésze = 64,2) és 24 °C-on inkubáltuk.

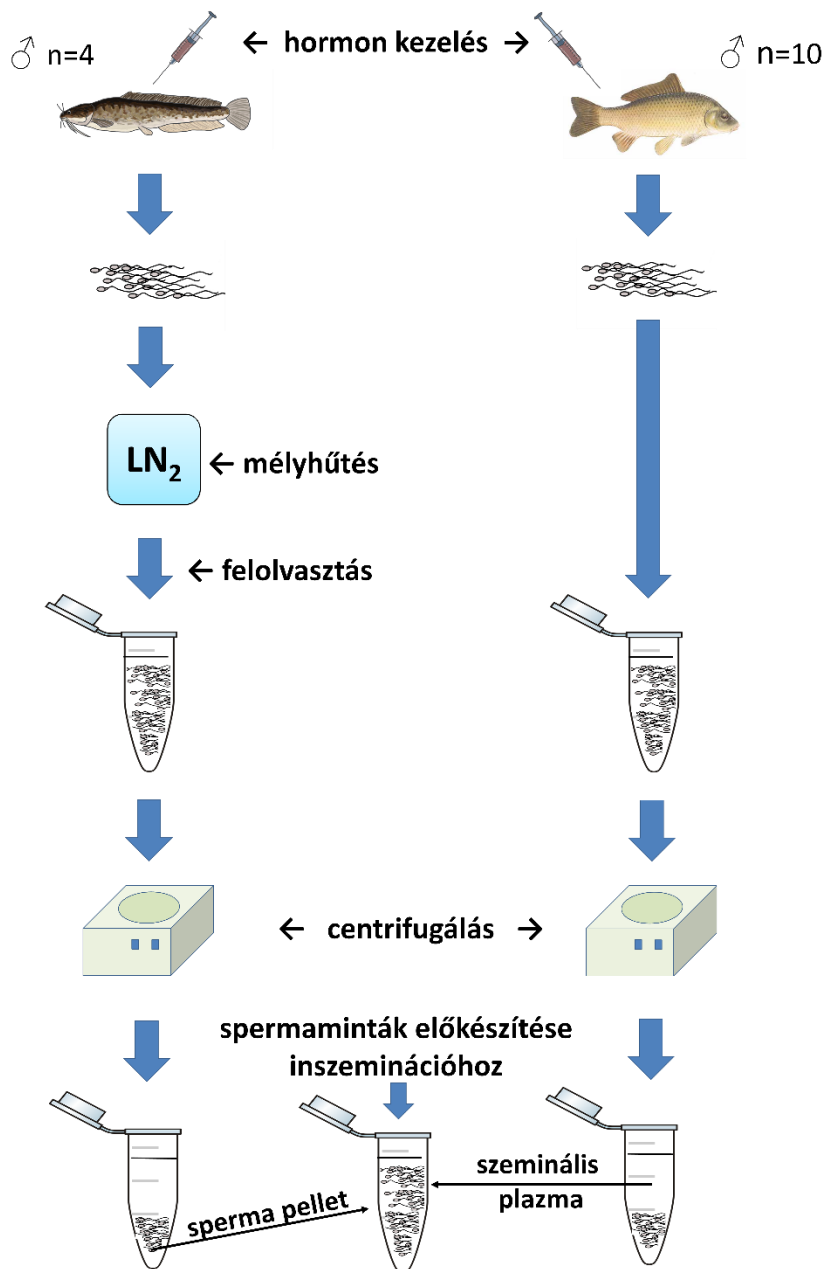
Felolvasztott spermamintával kezelt csoportok (6. ábra): A kezelt ikrásokból ($n = 9$, testtömeg = $596 \pm 148,4$ g) nyert ivartermékből egyedileg, a vízaktivációt megelőzően 2 mintát vettünk.

2. csoport (WA csoport, 6. ábra): az ikrák lehetséges maximális termékenyítőképességének ellenőrzése érdekében ezekhez az ikratételekhez (~15 g ikratétel / anyahal) 0,5 ml frissen gyűjtött spermát adtunk, majd vízaktivációt követően az 5. percben minden termékenyített ikratételből 3 ismétlésben petricsészébe helyeztünk az ikrámintákat ($\varnothing = 100$ mm, átlagos ikraszám / petricsésze = 48,7) és 24 °C-on inkubáltuk.

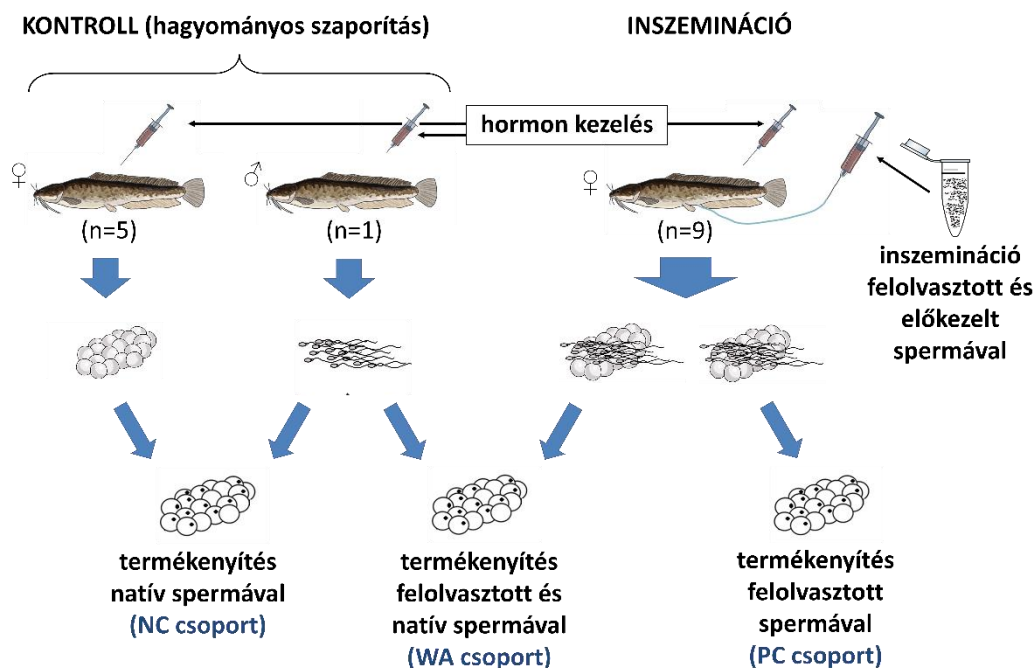
3. csoport (PC csoport): a nyert gaméta tételekhez nem volt hozzáadott natív sperma, a vízaktivációt követő 5. percben (6. ábra) ikratételenként 3-3 ismétlésben petricsészébe

véletlenszerűen ikrákat válogattunk ki (átlagos ikraszám / petricsésze: 55,5) és 24 °C-on inkubáltuk.

Minden második órában részlegesen vizet cseréltünk (~80% vízcsere) az összes ikrátételen, majd termékenyülési arányt (12 órával a termékenyítést követően, szomatogenezis állapotban) és kelési arányt (36 órával a termékenyítést követően) számítottunk.



5. ábra. A felolvasztott spermaminták előkészítése inszeminációs kísérletekhez



6. ábra. A mélyhűtött és felolvasztott spermamintákkal történő főkísérlet lefolyásának sematikus ábrája

2.2.8. Zebradánióval végzett kísérletek I. (Genetikai sokszínűség növelésének lehetősége ivatásos szaporítás esetén)

Alapkérdésünk az volt, hogy amennyiben spermát inszeminálunk ivás előtt álló ikrásokba, úgy a termékenyítésben milyen arányban vesz részt az injektált sperma, valamint az ivásban résztvevő tejes. A kísérletbe vont halak nagyobb száma, az egyedek elkülönítésére szolgáló fenotípusos bélyegek (vad típus vs. transzgenikus vonalak) miatt zebradánió modellhalfajjal dolgoztunk.

2.2.8.1. Zebradánió hímek

Két zebradánió vonallal dolgoztunk. A transzgenikus zebradánió tejesek a *Tg-2.4shh:gfpABC* vonalból származtak, amelyek *sonic hedgehog* szabályzó génbeültetéssel rendelkeztek és Karlsruhe Institute of Technology-tól származtak (Ertzer et al., 2007).

2.2.8.2. Szaporítások (ivatás)

A szülői vonalak ellenőrzése céljából kontroll szaporításokat hajtottunk végre 2×15 AB vad ikrás (SL = $26,1 \pm 1,3$ mm) és 2×30 AB vad hím beállításával (SL = $26,6 \pm 1,3$ mm, 7. ábra). Az első szaporításkor (szaporítás I.) 1 ikrás és 1 tejes alkotott párt, míg a második, harmadik és negyedik szaporításkor (Szaporítás II.-IV.) ugyanazon ikrásokhoz ugyanazon 2 vad tejessel alkottak párokat. A halak felkészítési ideje között eltelt napok számát a 1. táblázat mutatja.

1. táblázat. A szaporítások között eltelt napok száma

| Ikrások csoportja | Szaporítás I. | Szaporítás II. | Szaporítás III. | Szaporítás IV. |
|---------------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| 1. csoport: #1.- #15. | 0 | 14 | 7 | 14 |
| 2. csoport: #16.- #30. | 0 | 7 | 15 | 25 |

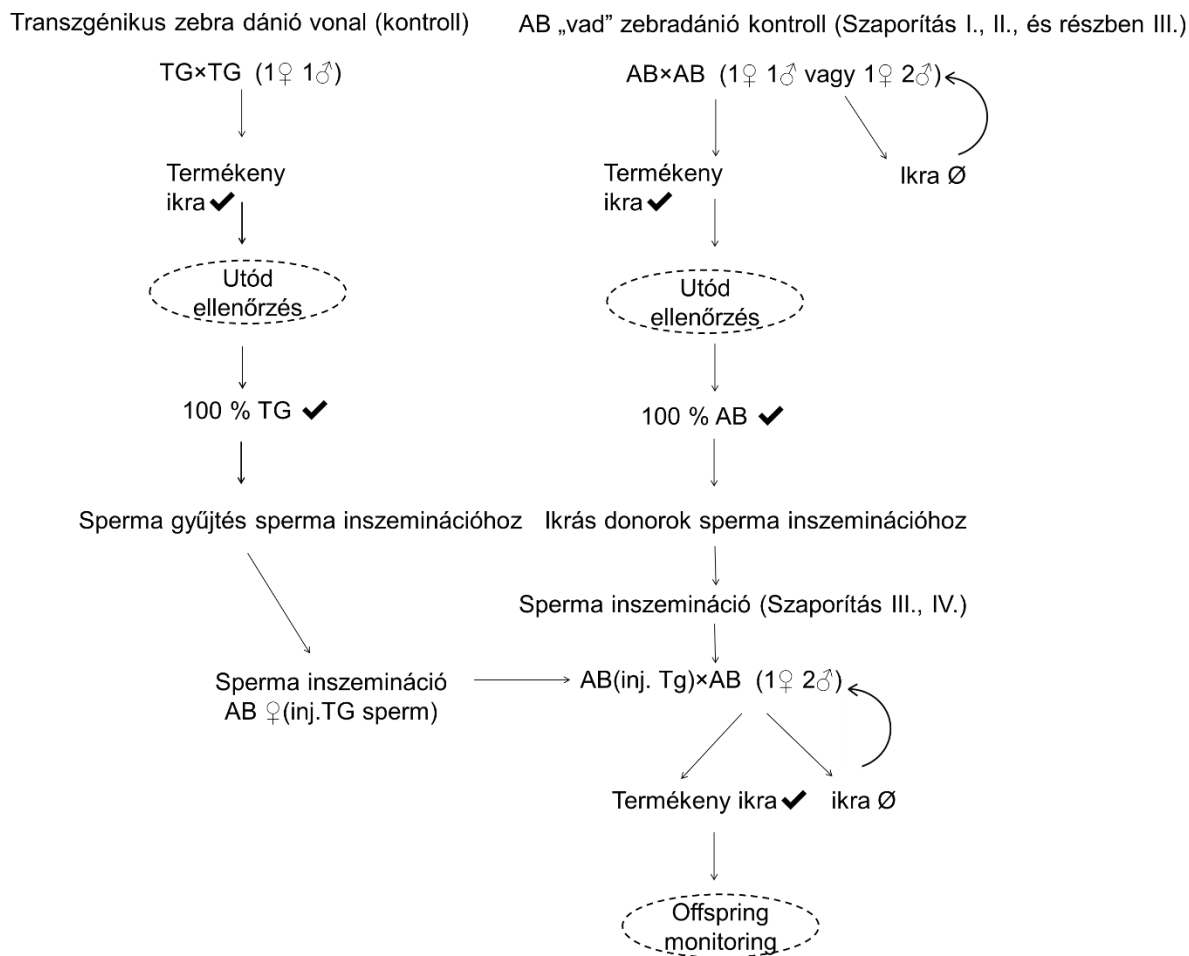
Egy liter térfogatú szaporító edényeket állítottunk be minden szaporításkor (ZebTec, Tecniplast S.p.a., Italy). A vízminőség paraméterek a kísérletek során az alábbiak voltak; víz hőmérséklet: 25 °C; pH: 7.0±0.2; átlagos vezetőképesség 525 µS / cm. Az ikrákat ívási páronként petricsészébe gyűjtöttük (Ø = 100 mm) 2 órával a világos periódus kezdetétől. Az ikrátételeket termosztátban inkubáltuk (vízhőmérséklet: 25,5 °C, 14 / 10 óra fény / sötét periódus) napi vízcserével. Az inkubáció 72. órájában Leica M205 FA mikroszkóp alatt vizsgáltuk a termékenyülést, valamint elvégeztük az utódok származás ellenőrzését.

2.2.8.3. Inszemináció

Tg-2,4shh: a gfpABC homozigóta donor tejesekkel végeztük az inszeminációt, de csak azon ikrások esetén, amelyek az első két vagy esetleg a harmadik szaporítás alkalmával már adtak utóellenőrzésre alkalmas ikrát (7. ábra). MS-222-vel (4,2 ml MS-222 / 100 ml rendszervíz) bódítottuk a tejeseket a beavatkozások előtt. A bódítást követően, ügyelve a vízkontaminációra, a spermát a hasfal gyenge nyomásával, automata pipettára (20-200 µl, Gilson, termo) erőpsített G-1 üvegapillárisal (hossza 90 mm, külső átmérő 1 mm Narishige Scientific Instrument Lab., Japán) gyűjtöttük egy Leica M205 FA mikroszkóp alatt. A spermaadagokat (~1 µl / tejes, min-max: 0,4-1,4 µl) a bódított AB ikrásokba ugyanezzel az automata pipettával juttattuk be körülbelül 3 mm mélyen petevezeték középre. A beinjektált sperma adag eloszlás a petefészeklebenyekbe véletlenszerű volt, majd a beavatkozást követően az ikrásokat visszahelyeztük az ívató tartályokba.

2.2.8.4. Az utódok származás ellenőrzése

Az ívatástól (ikraszórástól) számított 72 óra múlva a frissen kelt lárvák származás ellenőrzését Leica M205 FA mikroszkóp LAS X (Leica Application Suite X) 3.4.2.18368 szoftverrel végeztük (Leica Microsystems CMS GmbH). Amennyiben transzgénikus spermából származott az utód, úgy zöld fluoreszcencia fehérje expresszióját lehet felismerni az EGFP2 szűrőn keresztül (a maximális gerjesztési emissziós értékek 489 nm és 508 nm). Az elemzésbe nem kerültek be azok az ikrások, amelyek nem termeltek ikrát vagy életképes lárvát a harmadik és negyedik kísérleti ciklusban sem (#8, #12, #14, #29), valamint azok, amelyek a kísérlet során elpusztultak (#4, #10, #20, #24).



7. ábra. A zebra dánióval végzett kísérlet lefolytatásának egyszerűsített sematikus ábrája

2.2.9. Zebra dánióval végzett kísérletek II. (Ívatásos szaporítás tejesek közvetlen jelenléte nélkül)

Inszemináció és indukált szaporítás esetén ponty fajban egy alkalommal, míg afrikai harcsa fajban három alkalommal is megfigyeltük, hogy ovulációkor, az elszórt ikratételek egy részét a korábban feljuttatott sperma képes volt termékenyíteni (2.3.1., 2.3.2. fejezetek).

Ebben a kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy:

1) hagyományos szaporítási eljárás során a felkészített ikrások ikrázásra bírhatóak-e tejesek jelenléte nélkül (a tejes jelenléte kulcsingernek tekinthető-e zebra dánió fajnál az ovuláció kiváltására),

2) a tejesek közvetett jelenléte (vizuális és feromonális ingerek biztosítása) kiváltja-e az ikrások ovulációját,

3) sperma inszeminálás módszere befolyásolja-e az első két pont esetében az ovulációt.

2.2.9.1. Szaporító alapállomány

A kísérlethez felhasznált ikrások az 2.2.8. fejezetben is tárgyalt vad AB vonalból származtak (SL = 10-28 mm), a szaporító medencében elkülönítve felhasznált vad tejesek szintén (SL = 9-

30 mm). Inszeminációhoz a gyűjtött sperma adagokat neutrofil-specifikus transzgenikus zebradánió tejesekből gyűjtöttük (Tg (mpx: GFP) i114 vonal, n = 15, SL = 19-25 mm).

2.2.9.2. Inszemináció

A tenyésztartályokból kiválasztott Tg (mpx: GFP) homozigóta tejeseket MS-222-vel (4,2 ml MS-222 / 100 ml rendszervíz) altattuk. A bódítást követő spermagyűjtés módszertana megegyezett a 2.2.8.3. fejezetben leírtakkal. Ezt követően a spermamintákat pooloztuk. A kontroll halakhoz 0,9% izotóniás nátrium-klorid-oldatot (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) használtunk. Az AB ikrásokat 1 órával a világos ciklust megelőzően kezeltük. A spermát, vagy a NaCl oldatot specifikus pipettacsúcsokkal (Finnpipette, F1, Thermo Scientific Finntip™ 20 µL, CE jelöléssel) ~ 2 mm mélyen a petevezetékbe injektáltuk az altatott ikrások genitális papilláján keresztül. Ezt követően az ikrásokat visszahelyeztük a megfelelő ívási tartályokba.

A kísérlet 7 kezelésből állt:

1. csoport (AB♀ × AB♂)

Hagyományos ívási módszereket alkalmaztunk (abszolút kontroll, vad típusú nőstény × vad típusú hím:). A zebradánió szaporítása ~ 1,7 literes ívó tartályokban (Sloping Breeding Tank, ZebTec, Tecniplast Spa, Olaszország) történt, amelyek „elnyújtott S alakú ívató ráccsal” rendelkeznek, amely megkönnyíti és elősegíti a zebradánió ívást. Az ívatórács perforált, hogy az ívás során az ezen áthulló termékenyült ikraszemekhez a felnőtt egyedek már ne férjenek hozzá (8. ábra). Az ívó terület egy átlátszó műanyag fallal ketté osztható. A különböző kezelési csoportok elrendezését, valamint kísérletbe vont csoportonként az egyedszámokat ivaronként a 2. táblázat mutatja. Az ívás minden esetben reggel, néhány órával a megvilágítási szakasz kezdete után történt, mivel a zebradánió végső oocitaérését jelentősen befolyásolja a fotoperiódus.

2. csoport (negatív kontroll, (AB♀))

A következő kezelési sorozatban a zebradánió ívó tartályokban nem voltak hímek (n = 4 tejes / ívató tartály, 2. táblázat, 8. ábra). Az ikrásokat nem kezeltük.

3. csoport (pozitív kontroll; AB♀ (inj.NaCl))

A bódított ikrások genitális nyílásán keresztül 0,4 µl 0,9%-os NaCl oldatot juttatunk be.

4. csoport (AB♀ (inj.TG♂))

A bódított ikrások genitális nyílásán keresztül transzgenikus hímek poolozott spermájából 0,4 µl adagot juttatunk be ikrásonként.

5. csoport (negatív kontroll AB♀ | AB♂)

Az ikrásokat külön tartottuk a vad típusú hímeiktől, minden egyes ívótartályban átlátszó elválasztóval (n = 4 ikrás és 6 tejes / ívótartály). Az ikrásokat nem kezeltük.

6. csoport (pozitív kontroll II; AB♀ (inj. NaCl) | AB♂)

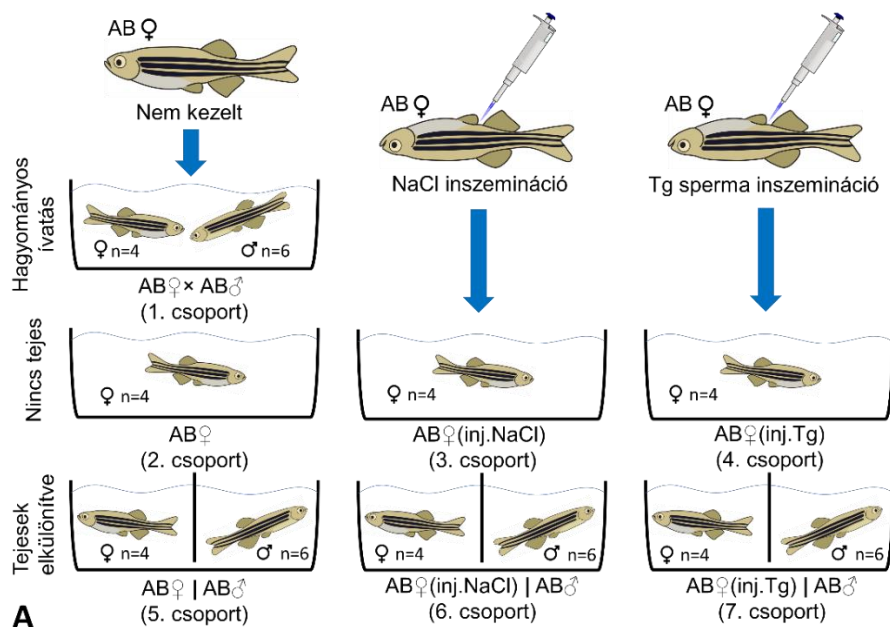
Az ikrások kezelése megegyezett a 3. csoportéval, majd az ívató tartályba visszatelepített ikrások válaszfallal voltak elkülönítve a tejesektől.

7. csoport (AB♀ (inj.TG♂) | AB♂)

Az ikrások kezelése megegyezett a 4. csoportok haláival, majd az ívató tartályba visszatelepített ikrások válaszfallal voltak elkülönítve a tejesektől.

2. táblázat. A beállított kísérleti elrendezések összefoglaló táblázata

| Csop. | Szaporítási módok | Jelölés | Ikrások és tejesek száma / ivató kád | Ismétlések száma | |
|-------|--|--------------------------------------|---|-------------------------------|---|
| 1. | Hagyományos ivatás | $AB_{\text{♀}} \times AB_{\text{♂}}$ | $4_{\text{♀}} \times 6_{\text{♂}}$ | 7 | |
| 2. | Ikrások tejesek nélkül | Nem kezelt | $AB_{\text{♀}}$ | $4_{\text{♀}}$ | 7 |
| 3. | | NaCl inszeminált | $AB_{\text{♀}} (\text{inj. NaCl})$ | $4_{\text{♀}}$ | 7 |
| 4. | | Sperma inszeminált | $AB_{\text{♀}} (\text{inj. TG}_{\text{♂}})$ | $4_{\text{♀}}$ | 7 |
| 5. | Ikrások és tejesek egymástól válaszfalal elválasztva | Nem kezelt | $AB_{\text{♀}} AB_{\text{♂}}$ | $4_{\text{♀}} 6_{\text{♂}}$ | 7 |
| 6. | | NaCl inszeminált | $AB_{\text{♀}} (\text{inj. NaCl}) AB_{\text{♂}}$ | $4_{\text{♀}} 6_{\text{♂}}$ | 7 |
| 7. | | Sperma inszeminált | $AB_{\text{♀}} (\text{inj. TG}_{\text{♂}}) AB_{\text{♂}}$ | $4_{\text{♀}} 6_{\text{♂}}$ | 7 |



8. ábra. A: Összefoglaló ábra a kísérleti elrendezésekről B-C: ivató tartály típusok, B: perforált hajlított ivatórács, térelválasztó fal nélkül C: ivató tartály térelválasztó fallal

2.2.9.3. *Ikrainkubáció, az utódok származás ellenőrzése*

Az ivást követő 5. órában az ivatótartályok aljából az elszórt ikraszemeket összegyűjtöttük. Az ikrainkubálást termosztátban 100 mm átmérőjű petri csészékben végeztük (víz hőmérséklet = 25,5 ° C; pH = 7,0±0,2; és vezetőképesség = 525 µS, 14 / 10 óra fény / sötét periódus, napi vízcserre). A származás ellenőrzést 72 órás ikrá-, és frissen kikelt lárvák esetében hajtottuk végre Leica M205 FA mikroszkóp LAS X (Leica Application Suite X) 3.4.2.18368 szoftver segítségével (Leica Microsystems CMS GmbH). Amennyiben transzgénikus hímről származó spermából származott az utód, úgy a zöld fluoreszcencia fehérje expresszióját fel lehet ismerni EGFP2 szűrőn keresztül (a maximális gerjesztési emissziós értékek 489 nm és 508 nm).

2.2.9.4. *Reprodukciós paraméterek*

Számolt reprodukciós paraméterek a következők voltak:

Ikratermelés: ivató kádban gyűjtött ikraszemek száma / ikrások száma (n = 4)

Termékenyülési % = élő embriókat tartalmazó ikraszemek és a kikelt lárvák száma a 72. órában / gyűjtött ikraszám) × 100.

2.2.10. *Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek*

A dél-amerikai ezüstharcsa vagy jundiá (*Rhamdia quelen*) egy Dél-Amerikában őshonos, harcsaalakúak rendjébe (Siluriformes) tartozó halfaj. Tenyésztése széles körben terjed, különösen Brazília déli területein, jó technológiai türésének köszönhetően, valamint amiatt, mert a fogyasztók kedvelik ízletes, szátkamentes húsát. Termelése jelenleg 2 500 tonna körül mozog (Ittész, 2018). Célul tűztük ki, hogy a dél-amerikai ezüstharcsa indukált szaporítása során összehasonlítsuk a hagyományos eljárásnak és a spermajektálás módszerének hatékonyságát keltetőházi körülmények között.

2.2.10.1. *Szaporító alapállomány, kezelések*

A kísérleteket az Acquaviva Piscicultura in Rio Grande do Sul telepen, Braziliában végeztük. A 6 hónapos anyahalak a telep saját szaporítású és nevelésű állományából származtak. Egy nappal a tervezett kísérlet előtt átfolyó vizes kádakba telepítettük át a véletlenszerűen kiválogatott anyahalakat. Három kísérleti csoportot hoztunk létre (9. ábra), mindhárom csoportban 7-7 ikrást kezeltünk. A hormondózis azonos volt mindhárom csoportban: 5,0 mg CPE/ testtömeg kg.

1. csoport: az ikrásokat hagyományos módon kezeltük (kontroll)
2. csoport: a petefészek lebenybe a hormonkezeléssel egyidejűleg 6 tejestől származó kevert spermát juttattunk katéter segítségével (2 ml sperma / testtömeg kg)
3. csoport: a CPE-t spermával kevertük össze, majd az ikrások petefészkébe injektáltuk (2 ml sperma + 5 mg CPE / testtömeg kg).

A megfelelő mennyiségű spermatermelés biztosítása érdekében a tejeseket egyszer kezeltük 2 mg CPE/ testtömeg kg adaggal, amit hasüregi injektálással juttattunk be. A spermagyűjtést a hormonkezelést követő 9 és fél órában végeztük. Mind a hat tejesből fejt sperma motilitás értéke

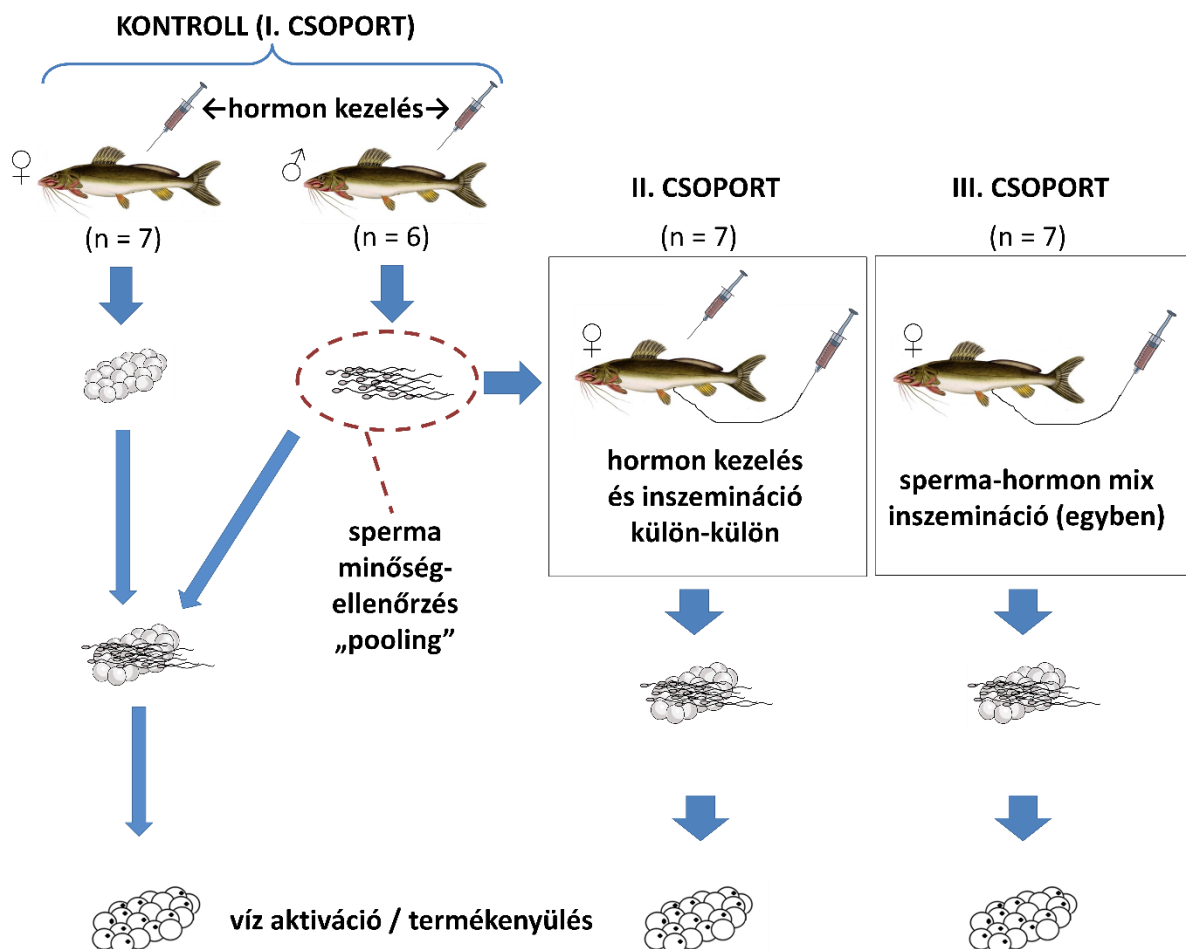
80% feletti volt, így minden tejesből származó mintát felhasználtuk és pooloztuk, hogy egységes minőségű spermával végezzük a kísérletet. A víz hőmérséklete 26 ± 1 °C volt a halak beérési ideje alatt.

2.2.10.2. Termékenyítés, reprodukciós paraméterek

Mindhárom csoport ikráit bódítást követően (szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) olaj oldat: 10 csepp / 10 l víz) lefejtük. Az 1. csoportban levő ikrák ikratételeit a poolozott spermamintával *in vitro* termékenyítési eljárással termékenyítettük, majd mivel a dél-amerikai ezüstharcra ikrák nem tapadnak (Sampaio és Sato, 2006), közvetlenül a Zuger-üvegbe helyeztük. A második és harmadik csoportba tartozó ikrákat előzetes bódítást követően szintén lefejtük – mivel nem volt szükség natív spermaadagok hozzáadására – keltetővíz hozzáadását követően az ikrákat rögtön Zuger-üvegbe helyeztük.

A következő paramétereket vizsgáltuk:

- PGSI: lefejt ikra tömege / hal tömege fejés előtt $\times 100$
- termékenyülési %: megtermékenyült ikrák száma / termékenyített ikrák száma $\times 100$, a termékenyülési arányt 24 órával a vízaktivációt követően határoztuk meg.



9. ábra. A különböző hormonkezelésekkel végzett, dél-amerikai ezüstharcában lefolytatott, szaporítási kísérlet sematikus ábrája

2.3. Eredmények

2.3.1. Ponty fajban kapott eredmények

Minden kezelt ikrást sikerült ovulációra bírni, a gyűjtött ivartermék mennyiségét tekintve a kezelt és kontroll csoportok között nem volt statisztikailag igazolható különbség ($p > 0,05$, 3. táblázat). Az első kísérletben az összes spermajektált és fejt ikratételéből életképes embriót sikerült nyerni. A petefészekben a spermatárolási időt figyelembe véve – 2 vagy 12 órával a programozott ivartermék gyűjtés előtt – nem volt statisztikailag igazolható különbség ($p > 0,05$) a két kezelt csoport embrió-túlélési arányában, ami arra utal, hogy a petefészekben a 12 órás spermatárolás nem csökkentette a spermiumok termékenyítőképességét. Ugyanakkor nagy egyedi különbségek mutatkoztak a kezelt halak között a kísérleti csoportokon belül, amely arra utal, hogy más, még nem azonosított tényezők befolyásolják az alkalmazott injekciós protokoll sikerességét. A kontroll (hagyományos úton szaporított) csoportban érték el a legmagasabb termékenyítési arányt, amely statisztikailag igazolhatóan felülmúlta az új szaporítási módszerrel elért eredményeket ($p < 0,05$).

A második kísérletben a hormonkezelés sikeressége elmaradt az első kísérletsorozatban elért eredményektől (egy halban nem volt ovuláció, két halat parciális-, két halat pedig teljes ovulációra lehetett bírni). Hasonlón az első kísérletsorozathoz, minden ivarterméket adó halból sikerült termékeny ikratételeket nyerni, de nagy egyedi különbségekkel. A frissen nyert ivartermékhez adott újabb spermátételek statisztikailag igazolható módon nem emelték a termékenyítési arányt ($p > 0,05$).

Nem a főkérdés eredményeihez tartozik hozzá, de meg kell említeni, hogy az egyik megelőző előkísérletben egy ponty ikrást másfél órával a várható ovulációt megelőzően sperma inszemináltunk, de a nem megfelelően bevarrt ivaranyag mellett teljes ikrakészletét elszórta. A kád aljára tapadt ikraszemek termékenyülési értéke 52% volt. Ennek alapján levonható volt az a következtetés, hogy tejes közvetlen jelenléte nélkül a felinjektált sperma vízaktivációkor megtermékenyítette az ovulált ikraszemeket.

3. táblázat. Összefoglaló táblázat a pontyban végzett kísérleti eredményekről

| kísérlet I. (koi) | | kontroll G1 (n = 6) | G2 (n = 6) | G3 (n = 6) |
|---|--------------|--------------------------------|--|-----------------------|
| Testtömeg ♀ (g) | átlag±szórás | 950,7±185,5 | 1043,3±307,5 | 1141,7±348,9 |
| PGSI (%) | átlag±szórás | 12,3±2,2 | 10±3,3 | 12,7±2,6 |
| Termékenyülési arány (%) szempontos állapotban | átlag±szórás | 85,8±4,2 ^a | 46,7±15 ^b | 41±15,7 ^b |
| kísérlet II. (tógazdasági nemes ponty) | | Inszeminált (n = 4) | Inszeminált + hozzáadott sperma (n = 4) | |
| Testtömeg ♀ (g) | átlag±szórás | | 7800±571,5 | |
| PGSI (%) | átlag±szórás | | 7,4±9,4 | |
| Termékenyülési arány (%) szempontos állapotban | átlag±szórás | 69,32±18,93 | 54,79±21,59 | |

PGSI = pszedo-gonadoszomatikus index. A különböző betűjelek a kezelések közötti szignifikáns különbséget jelölik (független mintás t próba, $p < 0,05$)

2.3.2. Afrikai harcsában végzett kísérletek I. eredményei (A sperma szemínális folyadék, mint exogén hormon vivőanyag)

Az előkísérletben (4. táblázat) eredményes termékenyülést értünk el mind a kétféle kezelés alkalmazásakor. Amennyiben a hormont és a spermát külön-külön juttattuk fel a petefészeklebegekbe, jobb termékenyülési arányt értünk el, mint a hormon+sperma mix kezeléssel, de az alacsony mintaelemszámok miatt statisztikai elemzésre nem volt lehetőség. Az előkísérlet ugyanakkor bizonyította, hogy a sperma szemínálisfolyadék alkalmas pontyhipofízis vivőanyagként, mert a halak sikeresen ovuláltak, valamint a spermiumsejtek is megtartották életképességüket és sikeresen megtermékenyítették az ovulált ikratöredékeket.

A főkísérletben a hormon+sperma kezelés hatását vizsgáltuk az ikratermelésre, valamint a termékenyítőképességre. Az előkísérlethez hasonlóan minden kezelt hal eredményesen ovulált és a gamétagyűjtés előtt 10 órával bejuttatott spermiumok megtartották termékenyítőképességüket. A gyűjtött ivartermékekhez adott frissen fejt sperma adagok a termékenyülőképességet nem befolyásolták ($p > 0,05$).

Hasonlóan a pontyban elvégzett előkísérlethez, az előkísérletben (A1) egy ikrás, míg a főkísérletben (A2) két ikrás elszorta ikrakészletének egy részét a kád aljába (becsült mennyiség 5-10 g / ikrás). A belőlük vett minták alapján a termékenyülési arány 40-60% közé esett. Afrikai harcsa esetében is bizonyítottuk, hogy a spontán vagy részlegesen ovulált és elszort ikramennyiséget az előtte 10 órával feljuttatott sperma megtermékenyítette.

4. táblázat. Összefoglaló táblázat az afrikai harcában végzett kísérleti eredményekről

| | Halak sor-száma | Kezelés | Test-tömeg (g) | PGSI (%) | Termékenyülési arány (%) | |
|-------------------------|-----------------|---|----------------|-----------|-------------------------------|-----------------------------|
| | | | | | átlag±szórás | |
| | | | | | Közvetlenül a fejest követően | Hozzáadott sperma adagokkal |
| Előkísérlet (A1) | 1 | Pontyhipofízis NaCl szuszpenzió jobb petefészekbe, | 780 | 10,0 | 94,9±0,8 | - |
| | 2 | Sperma inszemináció bal petefészekbe | 1078 | 10,2 | 80,5±4,1 | - |
| | 3 | Inszemináció | 1244 | 11,1 | 73,4±0,6 | - |
| | 4 | pontyhipofízis+sperma keverékkel, mindkét petefészeklebenybe | 890 | 10,8 | 66,9±5,1 | - |
| | 5 | | 1134 | 8,6 | 68,7±6,9 | - |
| Főkísérlet (A2) | 6 | | 1322 | 7,3 | 91,1±2,6 | 90,3±4,1 |
| | 7 | | 518 | 13,0 | 76,7±3,9 | 72,7±6,3 |
| | 8 | | 640 | 9,2 | 93,7±0,8 ^b | 87,8±2,2 ^a |
| | 9 | Inszemináció | 1000 | 11,3 | 78,7±2,0 ^b | 60,6±4,5 ^a |
| | 10 | pontyhipofízis+ sperma keverékkel, mindkét petefészeklebenybe | 464 | 10,1 | 83,7±2,3 ^b | 71,7±2,7 ^a |
| | 11 | | 778 | 9,0 | 57,8±9,7 | 76,7±10 |
| | 12 | | 1598 | 6,1 | 41±4,4 ^a | 65,7±8,8 ^b |
| Főkísérlet átlag±szórás | | | 902,9 ± 427 | 9,4 ± 2,3 | 74,7 ± 18,4 | 75,1 ± 11,5 |

A különböző betűjelek a kezelések közötti szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0,05$, független mintás t próba)

2.3.3. Afrikai harcában végzett kísérletek II. eredményei (a petefészeklebenybe injektált sperma termékenyítőképesége az idő 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 (5. táblázat, $p < 0,05$), 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 második kísérleti ciklusban 48 óra

inkubációs idő alkalmával a termékenyülési-, és kelési értékek már nagymértékben visszaestek, ami tisztán mutatta a sperma biológiai aktivitásának / termékenyülőképességének a határát.

5. táblázat. Összefoglaló táblázat a sperma petefészekben eltöltött ideje és a sperma inszeminált halak mért reprodukciós eredményei között. Az eltérő betűjelek a kezelések közötti szignifikáns különbséget jelölnek azonos paraméter esetében (Kísérlet 1.: $p < 0,05$, ANOVA, Dunn's post hoc teszt. Kísérlet 2.: független mintás t próba $p < 0,05$).

| Kísérleti sorozat | Sperma inkubációs idő petefészekben (óra) | Testtömeg (g) átlag±szórás | PGSI (%) átlag±szórás | Termékenyülési arány (%) átlag±szórás | Kelési arány (%) átlag±szórás |
|-------------------|---|----------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| Kísérlet 1. | 5 | 690,5±259,0 | 10,8±3,9 | 65,7±11,3 ^a | 39,3±12,7 ^a |
| | 10 | 784,1±139,2 | 9,5±2,3 | 57,9±8,8 ^{ab} | 31,6±9,1 ^{ac} |
| | 15 | 648,4±248,7 | 8,6±2,8 | 41,1±29,0 ^{bc} | 21,8±23,1 ^{bc} |
| | 20 | 617,2±168,7 | 9,6±3,3 | 29,8±26,3 ^c | 24,2±20,9 ^{bcd} |
| | 25 | 762,5±145,4 | 8,8±4,1 | 44,6±25,5 ^{bc} | 36,9±24,3 ^{ad} |
| Kísérlet 2. | 36 | 458,6±116,8 | 12,6±3,0 | 26,5±33,7 | 19,8±24,1 ^a |
| | 48 | 483,7±183,7 | 11,7±2,4 | 2,5±4,4 | 0,4±0,7 ^b |

2.3.4. Afrikai harcsában végzett kísérletek III. eredményei (sperma-ikra arány vizsgálatok)

A kísérletek során nem minden ikrás reagált a hormonkezelésre, azonban egy kontroll hal adatait ki kellett venni az elemzésből, mert csak parciálisan ovulált (6. táblázat). A PGSI értékek között csoportszinten statisztikailag igazolható különbség nem volt kimutatható ($p > 0,05$), függetlenül a kontroll és a különböző mennyiségben felinjektált spermamennyiségektől (6. táblázat). Az egyes csoportokon belül ugyanakkor nagy individuális különbségek adódtak. A termékenyülési eredmények alapján a csoportszinten statisztikailag igazolható különbség nem volt kimutatható ($p > 0,05$). A nyert ivartermékek relatív mennyiségéhez hasonlóan a termékenyülési és a kelési arányokban is nagy individuális különbségek voltak az egyes csoportokon belül (6. táblázat).

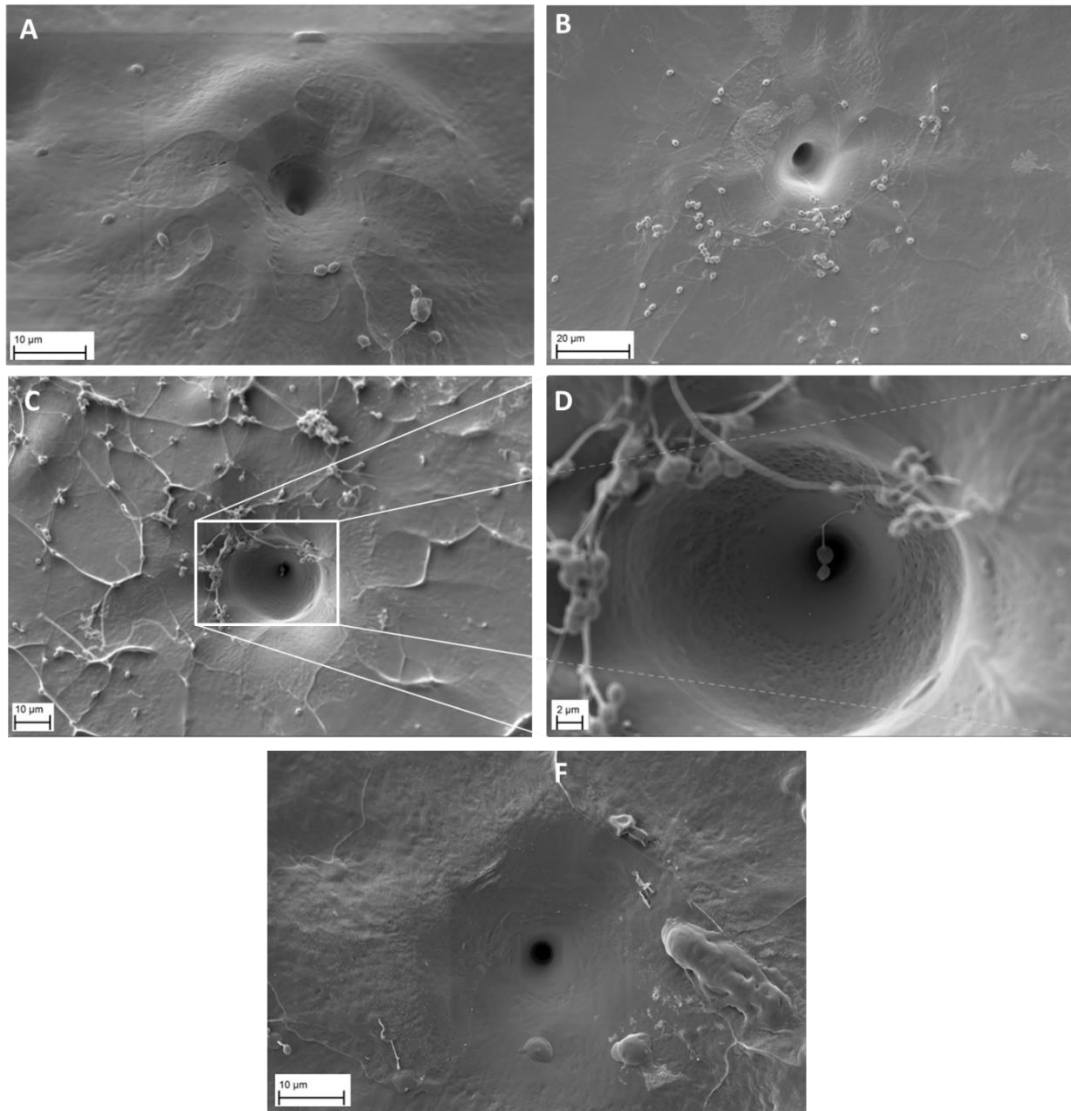
6. táblázat. Összefoglaló táblázat a különböző spermamennyiségű kezelések mért reprodukciós eredményei között.

| Csoportok | Testtömeg | PGSI | Termékenyülés | Kelési arány |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | (g) átlag±szórás (n=4) | (%) átlag±szórás (n=6) | (%) átlag±szórás (n=5) | (%) átlag±szórás (n=6) |
| Kontroll | 437,3±42,6 | 8,8±1,5 | 51,1±14,8 | 21,4±18,7 |
| 0,5 ml sperma / testtömeg kg | 383,3±77,4 | 9,0±4,9 | 75,0±15,1 | 42,5±9,1 |
| 1 ml sperma / testtömeg kg | 364,4±78,1 | 12,2±1,5 | 62,3±26,3 | 29,5±19,5 |
| 2 ml sperma / testtömeg kg | 409,2±104,4 | 8,8±1,5 | 69,1±22,0 | 37,3±21,9 |

A kezelések között nem volt statisztikailag igazolható különbség ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey post hoc teszt)

2.3.5. Afrikai harcsában végzett kísérletek IV. eredményei (a petefészeklebenybe jutott spermiumsejtek eloszlásának vizsgálata vízakiváció nélkül)

Az ovulált ikraszemek felszínén közvetlenül a mikropüle régióban számos spermiumsejtet figyeltünk meg. Elsőként igazoltuk, hogy egy valódi külső megtermékenyítésű halfajban a Munehra 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 ívás 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. A folyamat itt megáll (nincs gaméta összeolvadás), majd, amikor a beágyazott spermiummal az oocyták kiszabadulnak a hasüregből, a vízakiváció hatására fejeződik be a termékenyülés folyamata.



10. ábra. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek vízaktiváció nélküli ikrá fixálási állapotban; A-B: spermiumok eloszlása a mikropüle nyílás környezetében (inszeminált ikrás). C-D: az egyik spermium a mikropüle nyíláson betörve elérte az ooplazma területet (inszeminált ikrás). E: a kontroll afrikai harcsa mikropüle régiója (nem volt inszemináció).

2.3.6. *Afrikai harcsában végzett kísérletek V. eredményei (mélyhűtött sperma felhasználása inszeminációhoz)*

Az előkísérletben a mélyhűtött afrikai harcsa spermamintát felolvasztottuk, majd centrifugálást követően a spermiumsejtek felszínéről eltávolítottuk a szeminális plazma és metanol hígító keveréket. Ezt követően eredeti térfogatra hígítottuk vissza natív afrikai harcsa és ponty centrifugált szeminális plazmával. Ezen előkészített minták spermaminőségét az idő függvényében vizsgáltuk 20 °C-os tárolási hőmérsékleten. A mélyhűtött sperma progresszív mozgóképesség, VCL, VAP és LIN értékei elmaradtak a natív spermaminták értékeitől. Minden vizsgált spermaminőségi paraméter csökkent az idő függvényében, de még így is, 24 órás tárolást követően, 10% körüli mozgóképességet mértünk (13. ábra, tájékoztató adatok). Meglepő megfigyelésünk volt, hogy az afrikai harcsa mélyhűtött, és fajazonos szeminális plazmával hozzáadott spermaminták progresszív motilitási értékei elmaradtak a ponty

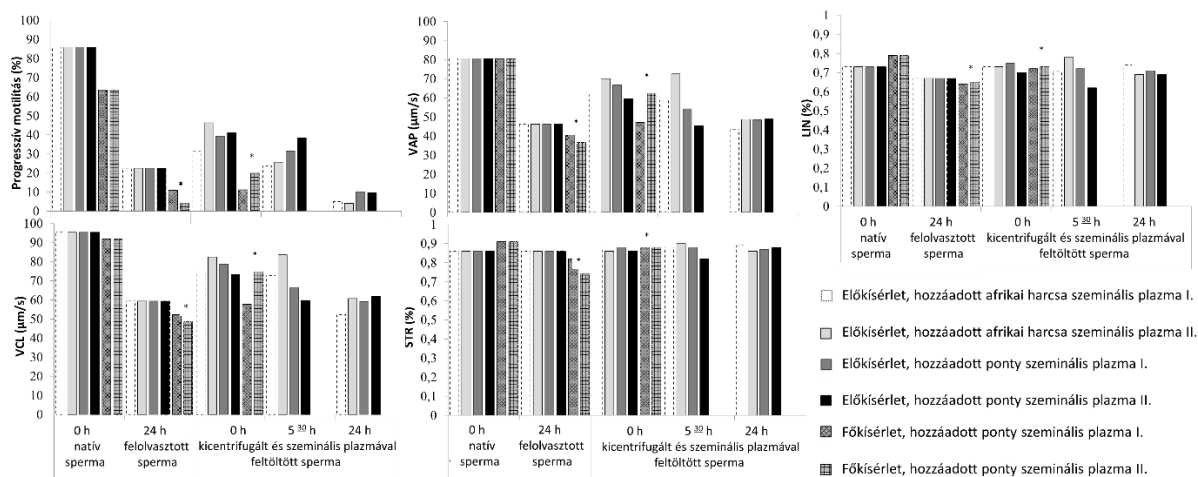
szeminális plazmával kevert mintákéhoz képest (11. ábra, $p < 0,05$). A kapott eredményekből kiindulva a főkísérletben a mélyhűtött, felolvasztott és centrifugált afrikai harcsa spermamintákat ponty szeminális plazma hozzáadásával kezeltük a sperma-inszeminációt megelőzően.

A főkísérletben a ponty szeminális plazmával kezelt afrikai harcsa felolvasztott spermaminták a kontroll csoporthoz képest statisztikailag nem befolyásolták a csoportok beérését (100%), a beérési időt (10-11 óra), valamint az ikratermelést (PGSI kontroll: $10,5 \pm 4,2\%$; sperma inszeminált csoport: $12,4 \pm 3,1\%$; $p > 0,05$, 7. táblázat). Minden sperma injektált egyed ikratételében termékeny ikrákat figyeltünk meg, ezek aránya azonban statisztikailag jelentősen elmaradt ($p < 0,05$) a kontroll egyedek értékeitől. A gyűjtött ivartermékek termékenyülési arányát friss sperma hozzáadásával nem sikerült növelni (7. táblázat). 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.

7. táblázat. A főkísérlet összesített eredményei

| | Kontroll csoport átlag±szórás (min-max.) | Spermainjektált átlag±szórás (min-max.) | |
|-----------------------|---|--|---|
| Testtömeg (g) | 630,8±116,5 | 596±148,4 | |
| PGSI (%) | 10,5±4,2 | 12,4±3,1 | |
| | Kontroll csoport (NC) | Mélyhűtött sperma (WA) | Mélyhűtött sperma + hozzáadott natív sperma (PC) |
| Termékenyülési (%) | Kontroll | 71±14,4 ^a | - |
| | Spermainjektált | - | 23,5±16,1 ^b |
| Kelési (%) | Kontroll, n = 5 | 61±11,5 ^a | - |
| | Spermainjektált | - | 17,7±13,2 ^b |

^{a,b} azonos paraméter esetében az eltérő betűjelek szignifikáns különbséget jelentenek a kontrollhoz képest ($p < 0,05$, független mintás t próba $p < 0,05$)



11. ábra. Az előkísérlet (n = 2 afrikai harcsa, n = 2 ponty) és a fő kísérlet (n = 4 afrikai harcsa, n = 10 ponty) spermiumparamétereinek átlagértékei. Minden oszlop az összesített spermaminták kumulatív átlagértékeit (két ismétlés) mutatják (tájékoztató adatok). *aktiválás csapvízzel

2.3.7. Zebradánióval végezett kísérletek I. (genetikai sokszínűség növelésének lehetősége ivatásos szaporítás esetén)

Kísérleti eredményeink alapján az inszemináció módszer, összevetve a hagyományos ivatási szaporítási technikával, nem volt negatív hatással az ikratermelésre. Az első kontroll szaporítástól a III. spermajektálási módszerig nem volt statisztikailag igazolható különbség az ovulált ikraszemek számát tekintve ($p > 0,05$, 8. táblázat). A IV. szaporítási ciklusban az ovulált ikraszemek száma ugyan magasabb volt, de ezt nem a módszer pozitív hatásának, hanem az ikrások jobb felkészítésének tudjuk be (1. táblázat). A termékenyülési értékekben ugyanakkor nem mutatkozott statisztikailag igazolható különbség ($p < 0,05$, 8. táblázat).

8. táblázat. A vizsgált szaporodásbiológiai paraméterek összesítése a 4 szaporítást követően (átlag \pm szórás)

| Kezelés | Kontroll | | Inszemináció | |
|--------------------------|------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|
| | Szaporítás I. | Szaporítás II. + kontroll Szaporítás III. | Szaporítás III. | Szaporítás IV. |
| Ikrások száma | n = 11 | n = 14 | n = 15 | n = 13 |
| Ivararány | 1♀ × 1♂ | 1♀ × 2♂ | 1♀ × 2♂ | 1♀ × 2♂ |
| Ikraszám | 34,8 \pm 27,3 ^a | 68,6 \pm 36,7 ^{ab} | 62,5 \pm 39,7 ^{ab} | 97 \pm 81,8 ^b |
| Termékenyülési arány (%) | 21,7 \pm 30,7 ^a | 43,3 \pm 29,4 ^b | 39 \pm 28,2 ^{ab} | 37,7 \pm 25,7 ^{ab} |

Az eltérő betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek ($p < 0,05$, egytényezős ANOVA, Tukey post hoc)

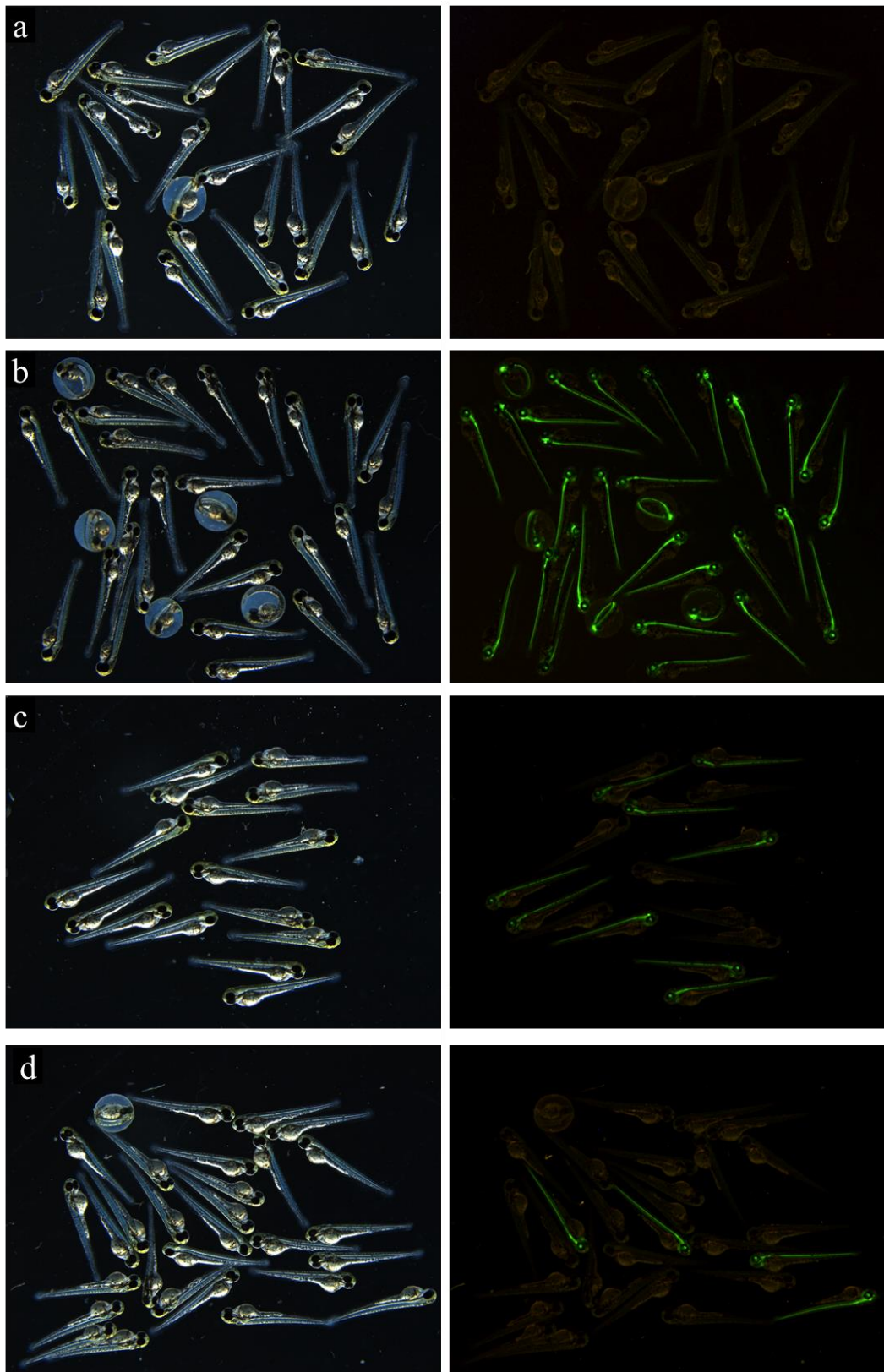
Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az utódgenerációban melyik hím örökítő anyaga vesz részt: a véltelenszerű eloszlásban injektált transzgenikus apától származó sperma és/vagy az ivásban résztvevő AB (vad) vonalú tejes. Fenotípusos jegyek alapján (GFP fluoreszcenciával markerezett szonikus hedgehog szabályozó elemek aktiválják a fluoreszcens riporter gént, ami

színszűrős mikroszkóppal vizuálisan elkülöníthető) mindkét tejes részt vett a termékenyítésben, de változó aránnyal (9. táblázat, 12. ábra). A huszonöt sikeres ívási kísérlethől 20 ikrás vegyes genotípusú utódokat hozott létre, amelyek mind a transzgenikus, mind a vad típusú utódgeneráció létrehozását jelentették, de változó arányban (min-max.: 3,8-84,3%).

1. táblázat. Összesített adatok a spermajektált transzgenikus és ívó tejes hozzájárulása az utódgenerációhoz a vizsgálatba vont és sikeresen szaporított ikrások figyelembevételével

| Ikrások azonosító száma | III. szaporítás | | | IV. szaporítás | | |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| | AB ♀ (Tg sperm. inj.) × 2AB ♂ | | | AB ♀ (Tg sperm. inj.) × 2AB ♂ | | |
| | Ikraszám | Túlélési arány 72hpf (%) | Tg lárva (%) | Ikraszám | Túlélési arány 72hpf (%) | Tg lárva (%) |
| 1 | 157 | 54,1 | 48,2 | 143 | 87,4 | 24,8 |
| 2 | 31 | 83,9 | 3,8 | 71 | 54,9 | 20,5 |
| 3 | - | - | - | 48 | 33,3 | 81,3 |
| 5 | 15 | 60,0 | 0 | - | - | - |
| 6 | - | - | - | 63 | 33,3 | 71,4 |
| 7 | - | - | - | 67 | 62,7 | 28,6 |
| 9 | 30 | 60,0 | 16,7 | - | - | - |
| 11 | 99 | 2,0 | 0 | - | - | - |
| 13 | 27 | 14,8 | 25,0 | - | - | - |
| 15 | 28 | 25,0 | 14,3 | 14 | - | - |
| 16 | 42 | 9,5 | 25,0 | 144 | 36,8 | 9,4 |
| 18 | 93 | 64,5 | 46,7 | 71 | 0 | 0 |
| 19 | 61 | 72,1 | 9,1 | - | - | - |
| 21 | - | - | - | 144 | 11,1 | 56,2 |
| 22 | 121 | 33,9 | 53,7 | 331 | 46,2 | 84,3 |
| 23 | - | - | - | 61 | 42,6 | 77,1 |
| 25 | 60 | 67 | 75,0 | - | - | - |
| 26 | 65 | 66,2 | 0 | 73 | 6,8 | 0 |
| 27 | 61 | 29,5 | 11,1 | 31 | 0 | 0 |
| 30 | 48 | 2,1 | 0 | - | - | - |

Jelölések: Tg sperm. inj.: transzgenikus spermával injektált ikrások; hpf: termékenyülés utáni idő órában; -: sikertelen ívás; Tg lárva: transzgenikus spermával termékenyített ikrából származó lárva



12. ábra. A különböző ívásokból származó utódok fenotípusos megjelenése a transzgenikus és a vad típusú genotípusok markereként. A termékenyítéstől számított 72. órában fényképezett embriókat tartalmazó ikraszemek és kelt lárvák sötét mezőben (bal oszlop) és fluoreszcens mikroszkóppal készített egyidejű képen (jobb oszlop); a: $AB \times AB$ (#7 ikrás, kontroll); b: $Tg \times Tg$ (#1 ikrás, kontroll), c: AB (inj.Tg) \times AB (#21 ikrás); d: AB (inj.Tg) \times AB (#16 ikrás)

2.3.8. Zebra dánióval végzett kísérletek II. (Ívatásos szaporítás tejesek közvetlen jelenléte nélkül)

A különböző kezelések statisztikailag igazolható módon hatással voltak mind az ikratermelésre, mint a termékenyülési arányokra ($p < 0,05$). Ahogy a 10. táblázatban is látható a negatív kontroll csoportba tartozó kezelt ikrások nem ovuláltak, függetlenül a tejesek nélkül (2. csoport = $AB_{\text{♀}}$), vagy jelenlétükben (5. csoport = $AB_{\text{♀}} | AB_{\text{♂}}$). Amennyiben az ikrások NaCl inszemináción estek át, ott már volt "provokált" ovuláció (3. csoport = $AB_{\text{♀}}$ (inj.NaCl), 6. csoport = $AB_{\text{♀}}$ (inj.NaCl) | $AB_{\text{♂}}$), a válaszfalal ellátott tejesek azonban nem tudtak termékenyíteni. A csoportok között és azokon belül is nagy individuális körülmények voltak az ikratermelésben (0-15,5 ikra/ikrás/csoport), statisztikailag igazolható különbség azonban a két csoport között nem volt ($p < 0,05$). Az ikratermelés további növekedése volt megfigyelhető sperma inszeminált halak esetében, (4 csoport = $AB_{\text{♀}}$ (inj.TG♂), 7.csoport = $AB_{\text{♀}}$ (inj.TG♂) | $AB_{\text{♂}}$), az injeztált, transzgénikus tejesekből származó sperma, az ovulált ikratételek egy részét termékenyítette (10. táblázat). Az ikratermelést és a termékenyülési arányt tekintve nem volt különbség a két kezelés között ($p < 0,05$). Hagyományos ívatás során az 1. csoport ($AB_{\text{♀}} \times AB_{\text{♂}}$) termelte a legtöbb ikrát és ez a csoport érte el a legmagasabb termékenyülési arányt.

10. táblázat. A kísérletbe vont 7 csoport ikratermelésének és termékenyülésének összesített eredménye

| Csoport | Jelölés | Ikratermelés (ikra / ikrás) | Termékenyülési (%) |
|---------|--|--------------------------------|------------------------|
| | | átlag±szórás | átlag±szórás |
| 1. | $AB_{\text{♀}} \times AB_{\text{♂}}$ | 81,2±42,3 ^b | 81,3±10,4 ^a |
| 2. | $AB_{\text{♀}}$ | 0 | 0 |
| 3. | $AB_{\text{♀}}$ (inj.NaCl) | 3,4±4,2 ^a | 0 |
| 4. | $AB_{\text{♀}}$ (inj.TG♂) | 16,1±11,6 ^{ad} | 12,6±9,2 ^b |
| 5. | $AB_{\text{♀}} AB_{\text{♂}}$ | 0 | 0 |
| 6. | $AB_{\text{♀}}$ (inj.NaCl) $AB_{\text{♂}}$ | 7,9±4,8 ^c | 0 |
| 7. | $AB_{\text{♀}}$ (inj.TG♂) $AB_{\text{♂}}$ | 27,8±20,6 ^{bcd} | 11,8±16,3 ^b |

AB: vad vonal; TG: transzgénikus vonal. Az eltérő betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek ($p < 0,05$, egytényezős ANOVA, Tukey post hoc teszt)

Az eredmények azt mutatták, hogy a spermainjektált ikrások ovuláltak, majd fejlődő embriót tartalmazó ikraszemeit 100%-ban transzgénikus sperma termékenyítette.

2.3.9. Dél-amerikai ezüstharcában végzett kísérletek eredményei

A beérési arányokban – ikrát adó / ovulált ikrások száma – különbségek mutatkoztak (1. csoport: 100%, 2. csoport: 85,7% és 3. csoport: 71,4%). A vizsgált szaporodásbiológiai paraméterek között (PGSI, termékenyülési arány) nem volt statisztikailag igazolható különbség a három csoport értékei között ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey post hoc test, 11. táblázat).

2. táblázat. Összesített adatok a kísérleti csoportok beállításáról és reprodukciós paramétereiről (átlag±szórás,)

| | Testtömeg (g) | Beérési idő (h) | PGSI (%) | Termékenyülési arány (%) |
|--|----------------------|------------------------|-----------------|---------------------------------|
| 1. csoport (hagyományos szaporítás, n=7) | 605,7±33,7 | 9:30 | 9,8±2,5 | 75,6±9,3 |
| 2. csoport (hormonkezelés és inszemináció külön, n = 6) | 604,3±23 | 10 | 8,2±4,1 | 82,1±9,4 |
| 3. csoport (inszemináció-spermavivőanyag, n = 5) | 594,3±31 | 10 | 10,2±5,4 | 76,5±4,4 |

2.4. Eredmények értékelése

2.4.1. Inszemináció, mint új halszaporítási módszer technikai-, és biológiai alapjai

Kísérleteink során sikerült az ikrások hormonkezelésével egyidőben a petefészeklebenybe juttatott spermával termékenyített ikratételeket létrehozni ponty, afrikai harcsa, dél-amerikai ezüstharcsa fajokban. Amennyiben mindkét petefészeklebenybe 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*, Bodur et al., 2019), amur és európai angolna (nem publikált adatok) fajokban is eredményesen alkalmaztuk a módszert, ívatásukkor életképes utódokat nyertünk. Hormonkezelés nélkül pedig spontán ikraszórást értünk el zebradánió fajban (2.4.6. fejezet).

A sperma petefészeklebenybe juttatásának eszköze nagyobb méretű halakon (ponty, afrikai harcsa, dél-amerikai ezüstharcsa) a katéter volt, amelyet a bódított hal ivarnyílásán, majd petevezetőn keresztül juttattunk a petefészeklebenybe. A katéter használata a kísérleti-, valamint a gyakorlati halszaporítás során napjainkban már általánosnak tekinthető mindkét ivarban. Így például oocita mintavétel során ilyen módszer alapján határozzák meg az ikrások ovulációra való felkészültségét, vagy a különböző hormonális kezelések időzítését (pl. japán angolna: Ohta et al., 1995; 1996; süllő: Zarski et al., 2011). Spermagyűjtéskor pedig katéter segítségével kerülik el a vizelettel való kontaminálódást (Sarosiek et al., 2016), de hormonkezelésre is használják (ponty: Mikolajczyk et al., 2002; *T. nigroviridis*: Watson et al., 2009; süllő: Németh et al., 2012). Zebradánió fajban automata pipetta vagy automata pipettára erősített üvegkapilláris segítségével injektáltuk a sperma mennyiségeket a petevezetőbe. 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.

Habár a petefészeklebenybe jutott sperma és ezen keresztül a spermium és oocita vagy ikra kapcsolatot csak egy esetben vizsgáltuk (afrikai harcsa ikra-spermium elektronmikroszkópos tanulmány 2.3.5. fejezet), a kapott információk alapján azonban kétféle gamétakapcsolatot figyeltünk meg:

1) Egyfelől a szeminális folyadékban mozdulatlan spermiumok (ponty: Horváth et al. 2010) a petefészek ozmocomform környezetében sem fognak aktiválódni, így hosszabb ideig képesek termékenyítőképességüket 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 irkaszemeket.

2) Az afrikai harcsa esetében a külső megtermékenyítésű, de kopulációval szaporodó halakhoz hasonlóan (*Alcichthys alcicornis* Munehara et al., 1989; *Blepsias cirrhosus* Munehara et al., 1991; *Trachelyopterus galeatus* Santos et al., 2013) „belső ivarsejt egyesülés” is létrejöhet a petefészek lebenyén belül. Feltételezhetően az ovariális folyadék képes aktiválni a

spermiumok egy részét. További vizsgálatokra van szükség a jelenség fiziológiai hátterének pontos feltáráshoz.

Külső megtermékenyítésű halfajokban is, igaz nagyon ritkán, de találtak fejlődő embriókat tartalmazó ikratételeket. Hayakawa and Munehara (2001) arról számoltak be, hogy egy tengeri halfaj, a *Hemilepidotus gilberti* petefészkeiben szempontos, tehát fejlődésben megállt, elpusztult embriókat találtak. Amerikai kutatók 1959-ben egy tüskés pikó ikrásban is találtak petefészkekben fejlődő embriókat (cit. Dean et al., 2019). Dean et al. (2019) pedig először sikerült szintén háromtüskés pikó ikrásból kinyert embriókat kikeltetni és ivaréretté nevelni. A belső megtermékenyülés tényét genetikai vizsgálatokkal is igazolták, kizárva a ginogenetikus és önmegtermékenyítés valószínűségét (a vizsgált egyed hermafrodita volt). Arra a kérdésre azonban, hogy ténylegesen hogyan mehetett végbe a belső megtermékenyülés csak feltételezésekre szorítkoztak.

Amennyiben a sperma inszeminált ikrás halak lefejt ivarsejteihez (spermium és ikra együttesen) további frissen fejt spermát is adagoltunk, azzal a termékenyülési értéket nem lehetett növelni (2.3.1., 2.3.2., 2.3.6. fejezetek). Elképzelésem szerint a petefészkeküregbe ovulált ikraszemek mikropüle régiója közelébe vagy a mikropüle csatornába került 10-12 órás kapacitáción átesett spermiumsejtek vízaktivációkor szinte azonnal termékenyítenek és megindítják azokat a fiziológiai reakciókat (koortikális reakció, mikropüle elzáródás, perivitellináris tér kialakulása stb.), amely akadályt állít a később hozzáadott friss spermiumok behatolása elé. Fontos lenne a továbbiakban vizsgálni azokat az új aspektusokat is, amelyeket a sajátos új kapcsolat teremt:

1) eddig a sperma (spermiumsejtek és szeminális plazma együttesen) és az ovariális folyadék kapcsolatát vizsgálták (összefoglaló tanulmány: Zadmajid et al., 2019). Azonban kísérleteink során megfigyeltük, hogy a szeminális plazma felszívódik a petefészekfalán 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 (Fitzpatrick, 2020). Nincsenek ugyanakkor ismereteink arra nézve, hogy a petefészkekben lévő ovariális folyadék, mint közeg szerepet játszik-e a spermiumok közötti szelekcióban. Mindenképpen szükséges lenne ezért azt is megvizsgálni, hogy a sperma inszeminált szaporításból származó utódok életképessége eltér-e "normál" termékenyítésből született társaikéhoz képest.

2.4.2. Spermia szeminális plazma, mint hormonvivő anyag

Watson et al. (2009), valamint Németh et al. (2012) kísérleteikben a petefészkekbe juttatott hormonhatású anyagok (hCG oldat és pontyhipofízis szuszpenzió) ovulációt eredményeztek, tehát a fiziológiás NaCl oldat, mint hormon vivőanyag felszívódott a petefészekfalán keresztül és ezzel együtt az alkalmazott hormonokat is a szisztémás keringésbe juttatta. Felmerül annak lehetősége is, hogy a sperma szeminális folyadék hasonló módon viselkedhet, azaz hatékony hormon vivőanyag lehet. 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 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: 41-94%, 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 petefészeküregben), amelyek a spermiumok termékenyítőképességét (jelentősen) befolyásolták volna.

2.4.3. Sperma életképességének/termékenyítőképességének megőrzése a petefészekben az idő és a spermamennyiség függvényében

Afrikai harcsa fajban végzett kísérleteink eredményei alapján 5-36 órával az ovuláció előtt a petefészekbe 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 petefészek 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%, Bodur és mtsai., 2019). Érdekes, hogy a két faj környezeti igényeiben meglévő jelentős különbségek (Siluriformes – Perciformes, édesvíz – tengervíz, 25-27 °C – 16 °C) ellenére is hasonló eredmények tapasztalhatók. Pontyban és a dél-amerikai ezüstharcában a keltetőházi gyakorlatnak megfelelő döntő hormonkezeléssel egy időben (9,5-12 órával az ovulációt megelőzően) a petefészek 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 petefészeklebenybe 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 petefészeklebenybe. A szakirodalomban fellelhető spermium:ikra arányok alapján azonban ez a mennyiség "sperma pazarlásnak" volt tekinthető. Afrikai harcsában vizsgáltuk a petefészekbe juttatott különböző mennyiségű spermaadagok hatását a termékenyülésre. Eredményeik alapján nem volt különbség az elért termékenyítési-, és kelési eredményekben a kontroll és a petefészek lebenybe juttatott 2 ml, 1 ml vagy 0,5 ml sperma / testtömeg kg mennyiségek között. A keltetőházi, *in vitro* termékenyítési gyakorlat szerint a kívánt sperma:ikratömeg arány termékenyítéskor; 1:100 (Lajkó és Tasnádi, 2001; Tamás et al., 1987). A 0,5 ml sperma / testtömeg kg kezelés esetén, 10% lefejt ikratömeg / testtömeg kg-mal számolva, ez az arány 1:200, ami a termékenyülés valószínűsége szempontjából kedvezőbb, mint az üzemi javaslat. Rurangwa et al. (1998) eredményei alapján az afrikai harcsánál sperma: ikrá arány *in vitro* fertilizáció esetén 15 000:1, míg 3 000:1 arány alatt már csökken a termékenyülési arány. Ezzel szemben a túlzott spermamennyiség (>15 000:1) részben már csökkentette a termékenyülést. Saját vizsgálataink során nem volt teljesen egyértelmű a spermium:ikra arány kiszámítása, mert az ikrás halak előlése nélkül nincs információk a petefészek lebenyében maradt, de esetlegesen még le nem fejt ikrá és a bentmaradt spermiumok mennyiségéről. A lefejt ikrá és a bruttó inszeminált sperma mennyiség alapján a becsült spermium: ikrá arányok: 30 377 \pm 4 262:1 (2 ml / testtömeg kg), illetve 21 620 \pm 14 969:1 (1 ml / testtömeg kg) voltak. A nagy szórásértéket az eredményezte, hogy két ikrás csak kis mennyiségű ovulált ikramennyiséget adott. A 0,5 ml / testtömeg kg esetében pedig az arány 2 418 \pm 635:1 volt. Ennek alapján saját vizsgálatainkban még kisebb spermium:ikra arány mellett is hasonló termékenyülést értünk el mint Rurangwa et al (1998). Elképzelhető, hogy a 10 órás időtartam alatt, amíg a spermiumok a petefészeküregben tárolódtak a hal mozgásának hatására egyenletesen oszolhattak el a petefészeküregben 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 spermainjektált 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 occitaérést 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 csoporteredmény bizonyos fenntartásokkal kezelendők.

2.4.4. Mélyhűtött sperma felhasználása indukált ivatás esetén

A mélyhűtött sperma gyakorlati felhasználását korlátozza, hogy jelenleg a jellegéből adódóan valódi külső megtermékenyítésű halfajok esetében csak *in vitro* termékenyítési módszerrel lehet sikeresen alkalmazni. Ez a sajátosság az ivarsejtek mélyhűtésének fiziológiai jellegéből adódik. A spermiumok mélyhűtése során ugyanis el kell kerülni az intracelluláris kristályképződést, amit fagyásvédő adalékokkal akadályoznak meg. A leggyakrabban alkalmazott védőanyagok, így például a metanol vagy a DMSO szobahőmérsékleten toxikusak (elősegítik a celluláris dehidratációt, destabilizálják a membránokat és fehérjéket), így a spermát a felolvasztást követően rövid időn belül fel kell használni, továbbá a termékenyítést követően el kell távolítani a fölösleget (kihígítás). Ezzel szemben életképes lárvákat sikerült nyerni mélyhűtött sperma felhasználásával belső megtermékenyítésű halfajoknál. Yang et al (2007; 2009) mexikói kardfarkú halfajok (*X. helleri*, *X. couchianus*) felolvasztott spermájánál centrifugálásával választották el a spermiumokat a sejten kívüli védőanyag és a szemminális plazma keveréktől. Ezt követően a spermiumokat mesterséges szemminális plazmával újra szuszpendálták és injektálták az ikrásokba. A kezelt ikrások termékenyültek és életképes utódokat eredményeztek. Ezen módszertan alapján natív szemminális plazmával (centrifugált ponty szemminális plazma) hígítottuk a felolvasztott és centrifugált afrikai harcsa spermiumokat. A spermainjektált halak mindegyikében sikerült ugyan termékenyülést kimutatni, a kelési százalék (18%) azonban elmaradt a kezeletlen kontroll csoport értékeitől (61%). A kísérlet során azért alkalmaztunk ponty szemminális plazmát, mert ez tűnt a legeredményesebbnek az 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.

A modellkísérlet azonban feltétlenül alapul szolgálhat ahhoz, hogy ívatásos módszer esetén is alkalmazni lehessen mélyhűtött spermát.

2.4.5. Az utódok genetikai sokszínűségének növelésének lehetősége

Feltételeztük, hogy a párban és csoportosan ívó halak utódainak genetikai bázisát is jelentősen kiszélesíthetjük, ha a termékenyítésben több tejestől származó spermium vesz részt; a petefészkekbe jutatott „idegen” sperma, valamint az ívásban résztvevő tejesből származó sperma együttesen járul hozzá az utódgeneráció kialakításához. Programozott (fényritmussal szabályozott) ívás előtt transzgenikus tejesekből származó spermaadagokat juttattunk fel automata pipetta és üveg kapilláris segítségével előzőleg bódított vad ikrások petefészkeibe. A sikeresen ívó pároknál az utódellenőrzés 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, eddig még nem azonosított okra vezethető vissza:

1) egyes ikrásoknál az injektlást 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 (Dzyuba et al., 2019);

3) a spermiumok minőségében és a spermiumok alkalmasságában eddig még nem azonosított különbségek vannak, amelyek „spermiumversenyt” eredményeznek (Taborsky, 1998).

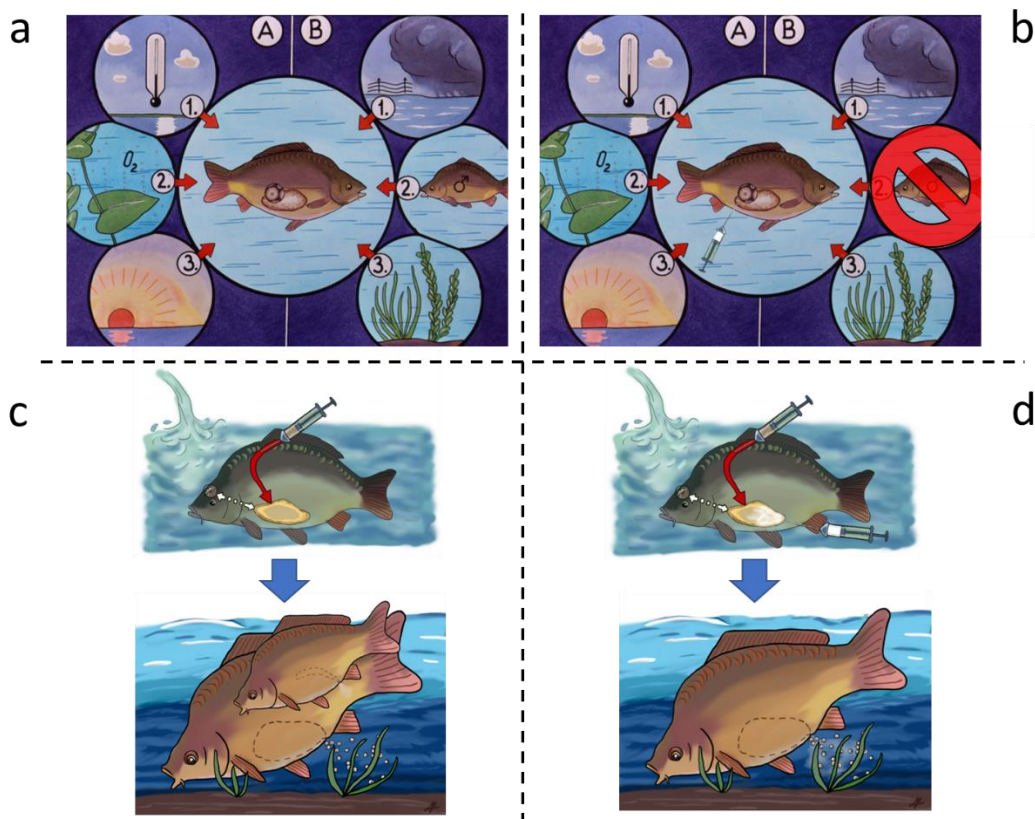
Kísérleteink eredményei alapján a genetikai változatosság valóban növelhető sperma petefészkekbe juttatásával (indukált) ívatásos szaporítás esetében. A módszert azonban optimalizálni szükséges (irányított spermafeljuttatás csak az egyik petefészkek lebenyében, spermium:ikra arány beállítása stb.).

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

Hormonindukált szaporítási eljárás esetében ponty és afrikai harcsa fajokban néhány esetben megfigyeltük, hogy szaporítás előtt az ikrások petefészkek lebenyébe jutatott sperma megtermékenyítette a spontán elszórt ikratételeket. Zebradánió fajban pedig kísérletsorozatot állítottunk be annak vizsgálatára, hogy hormonindukció nélkül, kizárólag csak a környezeti ingerekre támaszkodva, lehetséges-e tejesek közvetlen jelenléte nélkül is ovulációt kiváltani ikrásoknál. A halakat vagy egyáltalán nem kezeltük (negatív kontroll), vagy csak NaCl oldatot (pozitív kontroll), vagy a sóoldattal megegyező mennyiségű spermát juttattunk a petefészkelebensbe. Minden csoportot két módszerrel ívattuk; az ikrásokat egy átlátszó fallal választottuk el a tejesektől (van vizuális inger, illetve feromonhatás), illetve ívatás tejesek jelenléte nélkül. Nem figyeltünk meg spontán ikraszórást a kezeletlen halaknál. Kevés és terméketlen ikrát szórtak el azok a halak, melyek petefészkek 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 válaszfallal 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 szeminális plazma különféle androgéneket tartalmaz, mint például tesztoszteront, 11-ketotesztoszteront, progeszteront és 17α , 20β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-one-t (Hajirezaee et al., 2012, 2013, Jamalzadeh et al., 2014). Ezek a hormonok – feltételezve, hogy a többi csontos hal sperma szeminális plazmájában is megtalálhatóak – a petefészekfalon keresztül felszívódva hatással lehetnek az ikrás halak vérének hormonszintjére, esetleg a hipotalamusz-hipofizis-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, ami részben ellentmond a Horváth et al. (1980; 2015) által felállított természetes ívást kiváltó környezeti tényező-modellnek. A felállított modellel szemben a természetszerű szaporítás esetén az alapvető tényezők biztosítása mellett, a kiváltó tényezők közül a tejes jelenlétére nincs szükség sperma inszeminálás esetén ahhoz, hogy életképes utódokat nyerjünk (13. ábra). Spontán ovulációról a szakirodalomban is található adatok. Stagey et al. (1979) aranyhal (*C. auratus*) szaporítás során figyeltek meg spontán ikraszórást hormonális kezelésben nem részesült ikrásoknál. Hormonkezeléssel provokált ovuláció esetén angolna (*Anguilla sp.*: Soernsen et al., 1984; Lokman és Young, 2000; Butts et al., 2014; DiBiase et al., 2016; Kottmann et al., 2020), süllő és sügér (Žarski et al., 2015), valamint ponty (Horváth et al., 2015) fajokban jellemző a tejesek nélküli ikraszórás. Sőt, éppen az ikraszórás elleni újítás – mint magyar módszer – a pontyok ivaranyilásának bevarrása (Antalfi és Tölg, 1966; Horváth et al., 2015), ami már a süllő szaporításban is általánosan elfogadottá vált (Žarski et al., 2015). Egy nem publikált előkísérletünkben nekünk is sikerült ívató ketrecbe helyezett 3 vadponty ikrást csoportban leívatni hormonális indukciót követően, de úgy, hogy az elszórt ikratételeket az előzőleg injektált sperma megtermékenyítette. A becsült termékenyülés 50% körül alakult, így a gyakorlati kísérletek is megkezdődtek ebben az irányban.



13. ábra. Halak természetes-, és indukált ivásának kiváltásának lehetséges módjai, ponty modellen

a: a ponty természetes szaporodásának környezeti feltételei Horváth et al., 1985; 2015 nyomán módosítva. (A) Alapvető tényezők: (1) hőmérséklet (2) oldott oxigén (3) fény. (B) kiváltó tényezők: (1) kedvezően változó légköri nyomás (2) tejesek jelenléte (3) ivási szubsztrát jelenléte

b: Inszeminációs módszer esetén a parciális ovulációnak köszönhetően nincs szükség ívó tejes jelenlétére (részleges) ikranyerés-, parciális ovuláció kiváltására (módosított ábra: Dr. Lefler Kinga Katalin)

c: indukált ivatás esetén a hormonkezelést követően a párok az előre előkészített ívó környezetben szaporodnak (Horváth et al., 1985; 2015 nyomán módosítva)

d: indukált ivatás esetén a hormonkezelés és spermainszeminációt követően az ikrásoknak nincs szükségük tejes(ek) közvetett jelenlétére, hogy a spontán elszórt ikratételek termékenyüljenek (módosított ábra: Dr. Lefler Kinga Katalin)

2.5. A módszer felhasználásának lehetséges területei és előnyei

2.5.1. Természetvédelmi célú halszaporítás

A módszer előnyeit kitekintésekkel, de elsősorban a Ládi Póc Fajvédelmi Mintaprogramban (2008-2021) szerzett tapasztalatok (Tatár et al., 2010; Müller et al., 2010; Müller, 2014; Müller et al., 2015; Tatár et al., 2017; Müller et al., 2020c) alapján kívánom bemutatni. Az inszemináció a természetvédelmi célzatú állománymentés/*in situ* védelemben betöltött lehetséges előnyeit a 12. táblázatban foglaltam össze. A degradált élőhelyeken szétaprózódott, kis állomány nagyságú populációk megsegítésére alkalmas, jól ismert stratégia új élőhelyek

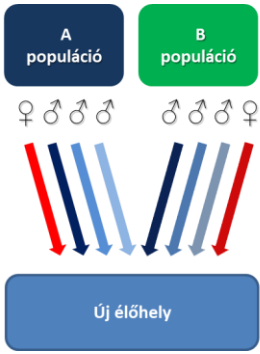
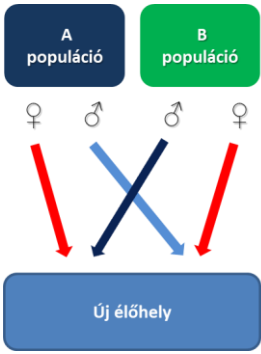
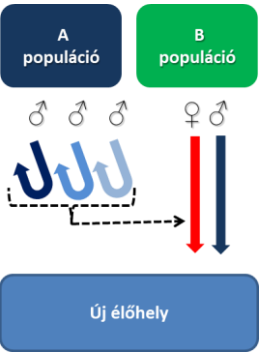
létrehozása és betelepítése (Tatár et al., 2017). A genetikai sokféleség növelése érdekében két vagy több szomszédos-, zárt-, fragmentált beltenyésztett populációt lehet az újonnan létrehozott élőhelyre betelepíteni. Lápi póc esetében a tervezett áttelepítést 80-85 km-es sugarú körnek megfelelő, úgynevezett konzervációs egységen belül célszerű elvégezni, mert így még nem sérül a természetes genetikai struktúra (Takács et al., 2015a,b). A betelepítési stratégia párban ívó halfajok esetén lehet tradicionális állománymentés, amikor a két élőhelyről begyűjtött ikrásokat és tejeseket telepítenek együttesen egy újonnan létrehozott élőhelyre.

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 ívatásos módszer esetén nagyobb számú tejes betelepítése esetén együtt növekszik a párzási esély. Ezért az ikrás:tejes (♀:♂) arány csoportban ívó ponty esetén 1:1,5-3 (Horváth et al., 2015), párban ívó harcsa esetén 1:2 (Horváth et al., 1984), süllő szaporításakor pedig 1:1,2 (Horváth et al., 1984). 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 vagy izolált populációk közötti egyesített géncsere esélye. Egy másik lehetséges probléma is előfordulhat, ha a két populáció ektoparazita faunája különbözik, akkor az újonnan létrehozott állományon belül parazita csere is megvalósulhat az egyedek között. Ez a telepített halak környezetalkalmazkodása mellett jelentős halegészségügyi kockázatot is magába rejthet.

2) Irányított, ellenőrzött szaporítás vagy szaporítási program hajtható végre például ívóketrec alkalmazásával és ellenőrzött szülő kiválasztással (Tóth et al., 2016; Tóth et al., 2020). 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.

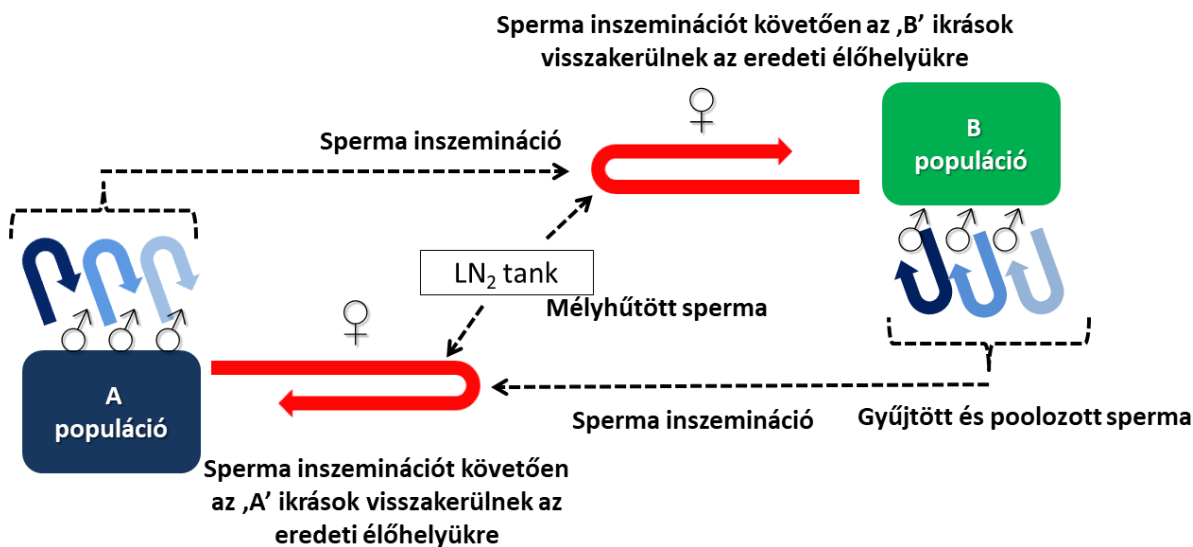
3) Inszeminációs módszer alkalmazása esetén áttelepítéskor csak az egyik populációból van szükség anyahal állományokra. Irányított (ketreces) szaporítás esetén a másik populációból származó tejesekből csak egyszeri alkalommal spermagyűjtésre van szükség, majd a tejesek visszatelepíthetők. Fontos hangsúlyozni, hogy a tejesek rövid idő alatt ismét képesek 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 (Beardmore, 1983; Fernández és Caballero, 2001; Woodworth et al., 2002; Fuller és Doyle, 2018). 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. Így például a *Thelohanellus nikolskii* (Myxosporea) alfaj európai ponty vs. koi ponty (Molnár, 2002), vagy *Anguillicoloides crassus* fertőzés *A. japonica* és *A. anguilla*, *A. rostrata* között (El-Shehabi et al., 2018; Sprengel és Luchtenberg, 1991).

3. táblázat. Mentett állományok szaporításával és kitelepítésével foglalkozó módszerek összevetése

| Paraméterek | Tradicionalis állomány mentés | Irányított szaporítás | Új módszerű szaporítás (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> |
| Szülők száma: | | | |
| A populáció (♂♀) | A♀ 1: A♂ >1 | A♀ 1: A♂ 1 | A♀ Ø: A♂ Ø |
| B populáció (♂♀) | B♀ 1: B♂ >1 | B♀ 1: B♂ 1 | B♀ 1: B♂ 1 |
| Szülői génhozzájárulás az utódgenerációban (♀:♂) | 1:1 | 1:1 | 1:1≤ |
| Mentett élőhely I. generáció genetikai háttere (♀♂) | <p>Példa: 1-1 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> | AB, BA | <p>Példa:</p> <p>B populációból származó 1 ikrás és 1 tejes szaporítás, A populáció 3 különböző tejesből származó sperma részvétele mellett BA+BA+BA+BB</p> |
| Szülői génhozzájárulás az utódgenerációban (♀:♂) | 1:1 | 1:1 | 1:1≤ |
| Parazita átviteli esély | mindkét élőhelyről | mindkét élőhelyről | csak a B populáció élőhelyéről |

4) *Vérfrissítés élőhelyen* (14. ábra): Az inszemináció módszer 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 vagy hungarocell dobozban jégágyon (Pires et al., 2019)). A tejesek a bódításból „felébredtve” visszatelepíthetők eredeti élőhelyükre. Ezt követően a másik populációból kiemelt ikrások egyik petefészkelebe nyébe lehet juttatni a gyűjtött spermamintát vagy spermamintákat. Az ikrások ikraérésének meghatározására alkalmas eszközök (katéteres oocita érettség vizsgálat) segítségével beazonosítható a várható szaporodás ideje. Amennyiben ez nem elegendő, úgy az

ívás provokálható hormontartalmú szerekkel (Horváth et al., 2015). Az ívó ikrás ikratételét így nem csak az ívásban résztvevő tejes fogja termékenyíteni, hanem a feljuttatott sperma is. Ezzel a módszerrel megnövekszik az utódgeneráció genetikai diverzitása. A 2.4.4. fejezetben leírtak alapján lehetséges olyan spermaminták használata is, amelyeket korábban már mélyhűtöttek és felolvasztottak (spermabank használata).



14. ábra. Az inszeminációs szaporítási módszer alkalmazásának lehetősége terepi munka esetében. A befogott tejeseket (kék nyílak) a spermagyűjtést követően vissza lehet engedni eredeti élőhelyükre. A befogott és bódított ikrások (vörös nyílak) egyik petefészeklebenyébe poolozott natív (több tejestől származó spermaminta), vagy mélyhűtött spermát lehet inszeminálni, majd hormonkezelést követően szintén az eredeti élőhelyre visszatelepíthetőek. Az ikrások saját populációjukból fognak tejest választani és leívni, de a bejuttatott sperma is részt vesz az utódgeneráció kialakításában.

2.5.2. Gazdasági célú halszaporítás

Az új módszer alkalmazásának lehetőségét egyes esetekben gazdaságilag jelentős halfajok termelésnövelési-, tenyésztési célú szaporításában is látom (13. táblázat). Hazánkban a gazdaságilag jelentős halfajok keltetőházi szaporításának alapja az *in vitro* termékenyítés (száraz termékenyítési eljárás, Horváth et al., 2015). Az ívatásos módszer (néhány gazdaságban a süllőt ívatják: Tamás és mtsai., 2006; Demska-Zakes és Zakes, 2002) jelentősége kisebb. Az édesvízi akvakultúra össztermelésében az ázsiai pontyfélék termelése igen jelentős, az amur, a pettyes busa, a fehér busa (és hibridjeik), valamint a ponty együttes termelése 17,8 millió tonna, amelyből csak Kína részesedése 80% (Cao és mtsai., 2015). 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 (Horváth és mtsai., 2015). 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 (Bodur et al., 2019). Az általunk kifejlesztett módszerrel azonban ezekben az esetekben az ivararány megfordításával (2 ikrás és egy tejes), 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 spermajektálás esetén nincs szükség tejes állomány fenntartására.

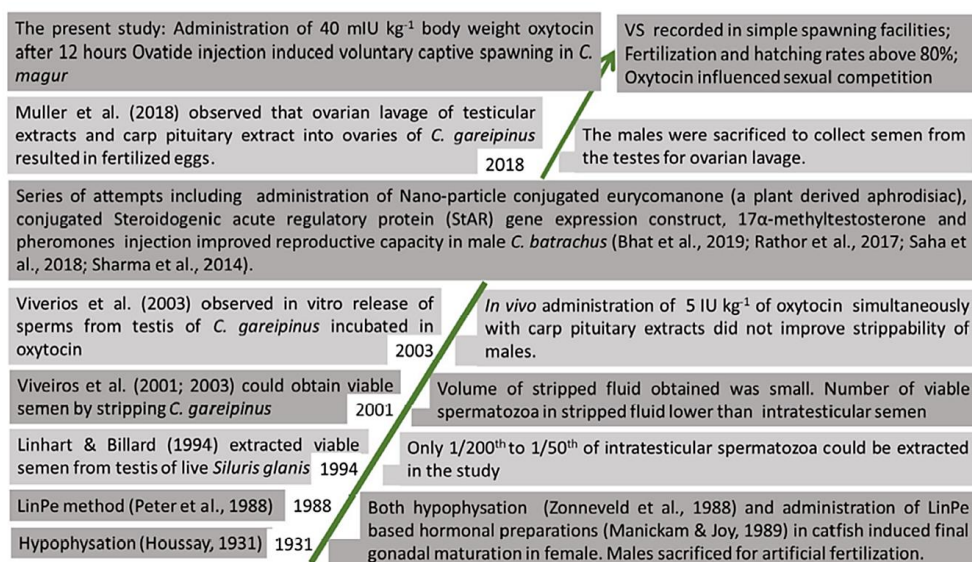
A pettyes farkashal (*Anarhichas minor*) halászata jelentős, évi 10-15 ezer tonna (FAO, 2021), nevelése recirkulációs rendszerben viszonylag könnyű, piaci értéke magas. Széles körű elterjedésének azonban egyik akadálya, hogy jelenleg még nem kidolgozott üzemi szintű szaporítása. Valószínűleg belső megtermékenyítéssel vagy belső ivarsejt egyesüléssel szaporodik. A fajt nem sikerült ívatásos módszerrel (még tejes jelenlétében sem) leívatni zárt rendszerben (Santana et al., 2020). Ráadásul a kis mennyiségű lefejt sperma csak rövid ideig tárolható 4 °C-on (maximum 24 óráig), termékenyítőképességét hamar elveszti, nincs kidolgozva olyan hígító, amivel az inaktív spermiumok hosszabb ideig tárolhatóak lennének (Kime and Tveiten, 2002). Az ikrások az ovulált ikrát elszórják, de az egy kádban tartott tejes vagy tejesek nem fogják azokat megtermékenyíteni. Egyetlen szaporítási eljárásuk az, ha hormonális indukciót követően megpróbálják az ikrát lefejni és *in vitro* termékenyíteni. A hormonális indukciót követően azonban a reagáló halak genitális apparátusának megnyílása lassú (2-10 óra) és nagyon nagy az időintervallumban meglévő különbség, tehát a folyamat nem szinkronizálható. Amennyiben nem sikerül az alkalmas időpontot észrevételezni, úgy az ikrás elszórja ikráit, amelyek a vízaktivációt követő egy percben már nem termékenyíthetők (Beirão személyes közlés). Az általunk kidolgozott módszer azonban megoldást jelenthet a faj szaporítására, mert az ivaranyúlás alakjának megváltozása jezi az inszemináció idejének programozását, hogy az elkövetkezendő 2-10 órás intervallumban bármikor spontán elszóródó ikraszemek biztonságosan termékenyülhessenek.

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 ovarialis folyadék nem aktiválja a spermiumsejteket, akkor íváskor vagy ívatáskor nincs szükség tejes jelenlétére, amennyiben az ikraszórás előtt (például hormonindukcióval egyidőben) spermát juttatunk a petefészekbe.

4. táblázat. A hagyományos ívatás és inszemináció szaporítási módszerek közötti elméleti összevetés külső megtermékenyítésű halfajok esetén

| | Hagyományos ívatás | | Ívatás előtt inszemináció | |
|--|------------------------------------|---|--|--|
| | Ivar arány ♀:♂ | Egységnyi területről megtermelhető elvi ikramennyiség | Ivar arány ♀:♂ | Egységnyi területről lehozható ikramennyiség |
| 3 hal / egységnyi hely (kistörzsés ívatás) | 1:2 | n | 2:1 | 2n |
| 5 hal / egységnyi hely (nagytrzsés ívatás) | 2:3 | 2n | 3:2 vagy 4:1 | 3n, vagy 4n |
| Utódok genetikai sokszínűsége | limitált, véletlenszerű kombináció | | ikrás oldaláról korlátozottan növelhető tejes oldaláról hatványozott mértékben növelhető | |
| Tenyésztési program | korlátozott mértékben irányítható | | irányítható | |
| mélyhűtött sperma használat | ívatás esetén nem megoldható | | felhasználható | |

Bízunk abban, hogy a gyakorlatba hamarosan átültethetővé és széles körben használhatóvá válik ez az újszerű szaporítási módszer. Priyadarshi et al. (2020) külön kiemelték az általunk kifejlesztett szaporítási módot a harcsafélék szaporítása fejlődésének történeti áttekintése során (15. ábra).



15. ábra. Kronológiai táblázat a harcsafélék indukált szaporítása kutatásainak mérföldköveiről (Priyadarshi et al., 2020 nyomán)

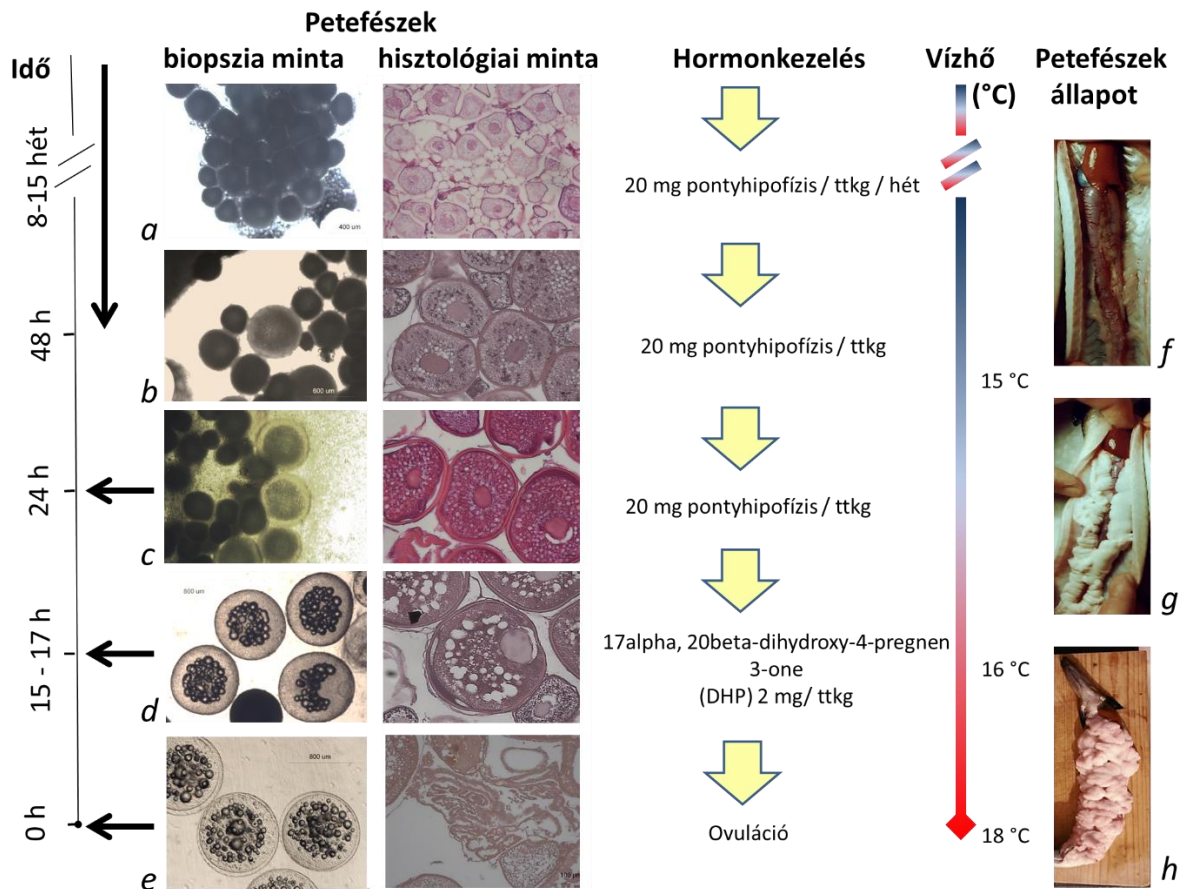
3. Európai angolna tejesek indukált ivarérlelése, spermamélyhűtése és termékenyítési tesztjei

3.1. Bevezetés

Az európai angolna állományok folyamatos csökkenése egyike a legjobban dokumentált folyamatoknak. A folyamatos ivadákszükséglet túlhalászatukhoz vezetett, ami mellett más tényezők (pl. élőhelyvesztés, szennyezések, parazitózisok, mint például a *Anguillicoloides crassus* úszóhólyagparazita kártétele, felmelegedés hatása az óceáni áramlatok erősségére stb.) is veszélyeztetik állományait (Sprengel and Luchtenberg, 1991; Lobón-Cerviá, 1999; Pedersen and Dieperink, 2000; Dekker, 2000; Robinet and Feunteun, 2002; Knights, 2003; Belpaire et al., 2009; ICES, 2017; Correia et al., 2018). Becslések szerint az elmúlt 30 évben egyes természetes előfordulási területeken állományaik 99%-kal csökkentek (Correia et al., 2018), más becslések szerint az északi-tengeri állomány nagysága mindösszesen csak 1,6% az 1960-1979. évi állapothoz képest, míg más területeken ez az érték 8,7% (ICES, 2017). Annak ellenére, hogy többféle megóvási- vagy fajmegőrzési program is indult, állományuk megerősítését nehezíti, hogy nincs kidolgozva a faj indukált szaporítását követő lárvanevelés ellenőrzött körülmények között. Az összes, Európában található angolna természetes ívából származik. Az angolnanevelő telepeken csak a természetből befogott üvegangolnák továbbnevelése folyik/folyt. 2002 októberében az ICES (Nemzetközi Tengerkutatási Tanács) egyértelmű figyelmeztetést tett közzé, miszerint az angolna állomány biológiai értelemben nincs többé biztonságban. A WWF (Természetvédelmi Világalap) a 10 leginkább veszélyeztetett faj között tartja számon, majd 2007-ben a szervezet nyomására felkerült a CITES (Egyezmény a Veszélyeztetett Vadon Élő Állat- és Növényfajok Nemzetközi Kereskedelméről) II. Függelékébe. Az angolnát az IUCN (Természetvédelmi Világszövetség) Vörös Listás fajként tartja számon, 2008 óta "critically endangered" kategóriában.

Az angolna a (fakultatív) katadrom halak csoportjába tartozik, ami azt jelenti, hogy hosszantartó édesvízi életciklust követően (vagy európai partok mentén sós vagy brakvízi életforma) a Sargasso-tengerbe vándorolnak szaporodni (Tsukamoto et al., 1998). A több ezer kilométeres vándorút alatt fejlődnek ki az ivarszervei, így Európában csak ivarilag éretlen halak találhatók. Egy esetben figyeltek meg spontán ivarérést ikrás halban egy finn akváriumban (Palstra et al., 2020). A többi halfajtól eltérően, ahol az ovuláció egy vagy két hormonkezeléssel kiváltható (ívás előtti szaporodási fázis, az ivarszervek preovulációs petesejteket tartalmaznak), az angolna esetében a gametogenezis egészét kell indukálni a trofoplazmatikus szakasztól a preovulációs oocitáig. Ez csak ismételt hormonkezeléssel valósítható meg, ami több hónapos felkészítést igényel, majd ezt követően – szigorú időzítés mellett – lehet az ovulációt kiváltani (a 16. ábrán mutatom be az általunk sikeresen alkalmazott protokollt, Müller et al., 2016). Először francia kutatóknak sikerült angolnából hormonális indukciót követően ikrát nyerni (Fontaine, 1964). Azóta számos európai kutatónak sikerült ovulált és/vagy embriót tartalmazó ikrát nyerni (Amin, 1997; Anonymus, 1983; Boëtius and Boëtius, 1980; Dufour et al., 1988; Fricke and Kaese, 1995; Müller et al., 2003; Palstra et al., 2005), majd sikeres keltetést követően 2-55 napig sikerült életben tartani a lárvát, sőt a lárvák kezdeti táplálására is történtek sikeres kísérletek (Bezdenzhnykh and Prokhorchik, 1984; Prokhorchik, 1986; Prokhorchik et al., 1987; Pedersen, 2004, 2003; Tomkiewicz and Jarlbæk, 2008; Tomkiewicz, 2012; Mordenti et al., 2013; Vilchez et al., 2014a, 2014b; Müller et al., 2016 (16.-17. ábra); Sorensen et al., 2016; Marohn and Hanel, 2016; Sellyei et al., 2017; Jéhannet et al., 2017; Lund et al., 2021). A lárvafázis a természetes vándorlási időt figyelembe véve 180-290 nap lehet (Lecomte-Finiger, 1994), ami jelzi, hogy a fajjal végzett, nagy erőfeszítésekkel teli kutatások még nem fejeződtek

be.



16. ábra. Az európai angolna sikeres lárvanyerést megelőző hormonkezelési protokollja ikrásokban (h – óra, ttkg – testtömeg kg) (MATE Szent István Campus, volt Szent István Egyetem, Gödöllő, 2016, saját ábra).

- a-e: az indukált ivarérelés jellegzetes petefészek biopszia (bal oszlop) és hisztológiai képei (jobb oszlop – sejtméreték; Müller et al. (2003) és Horváth et al. (2011) nyomán).
- a: kortikális alveolus állapot vége, korai vitellogenikus fázis eleje (sejtátmérő biopszia képen (SB) ~ 350-400 μm , hisztológiai képen (SH) ~150-280 μm);
- b: korai és közép vitellogenikus fázis között (SB: 500-600 μm , SH: ~350-440 μm),
- c: késői vitellogenikus fázis (SB: ~700 μm , SH~500-600 μm ,
- d: vándorló nukleusz állapot SB: 750-800 μm , SH~ 560-600 μm , germinális vezikulum breakdown SB: ~800 μm
- e: ovulált ikraszemek, duzzadt ikráátmérő: ~1000 μm ,
- f: indukált ivarérelés előtti angolna felnyitott hasürege, GSI<1%,
- g: ivarilag előrehaladott állapotban lévő angolna felnyitott hasürege, GSI =10%,
- h: ovuláció előtti állapot, GSI>40%.

Az európai angolnával szemben, az angolna genus másik fájának, a japán angolnának (*A. japonica*) mesterséges szaporítása és nevelése sokkal előbbre tart. Yamamoto és Yamauchi (1974) és Yamauchi et al. (1976) voltak az elsők, akiknek sikerült indukált ivarérelést követően szaporítani és angolna lárvákat keltetni. Ezt követően számos publikáció jelent meg az indukált ivarérelés fejlesztéséről (Ijiri et al., 1995; Kagawa et al., 1995; Lin et al., 1991; Satoh et al., 1992; Tanaka et al., 1995), míg végül (Ohta et al., 1996, 1997a) írták le azt a protokollt, amit ma is általánosan használnak indukált ivarérelésükkor és szaporításukkor. Sok évnyi

lárwanevelési kísérletezést követően (például Okamura et al., 2009a, 2009b, 2002; Tanaka et al., 2003, 2001) számoltak be először arról, hogy sikerült indukált szaporításból származó lárvákat üvegangolna korig nevelni. Ijiri et al. (2011) pedig arról számoltak be, hogy bezárták a ciklust, azaz fogságban szaporított halak utódait ivarérett korig nevelték és azokat sikerült ismételt szaporítani. Jelenleg 4-5 generációs állományok vannak Japánban, a lárwanevelés nehézségei miatt azonban az éves termelés csupán 1 000-1 500 egyed (Tsukamoto, szóbeli közlés).

3.1.1. A kutatás előzményei, hazai angolna indukált ivarérelési kísérletek

3.1.1.1. Szaporító anyahalállomány helyzete

Az angolna eredendően a Fekete-tenger felől a Duna-vízrendszerébe ritkán felvándorló és előforduló halfaj (Herman, 1887). Számottevő hazai állományai egyértelműen az 1961-ben megkezdődő, majd évenkénti üvegangolna (angolna juvenilis alak) telepítéseknek köszönhetőek, amelyek jelentős állományokat alakítottak ki nagy folyóink, a Balaton, a Velencei-tó és a Fertő-tó vízrendszerében. Az utolsó Balatoni telepítés 1991-ben történt 700 000 ivadékkal, mely egyúttal az utolsó hazai telepítés volt (Virágh, 1997). Mivel jelenleg a természetes bevándorlás elenyésző mértékű, így az előregedő állományok utánpótlás híján egyre fogynak. A jelenlegi angolna állomány a legöregebb Európa más, a közelmúltban vizsgált, állományaival összevetve (a legfiatalabb egyedek is minimum 30 évesek). Mindez azonban az állományok testhosszában egyáltalán nem tükröződik vissza (Durif et al., 2009; Ács, et al., 2013; Müller, 2011), tehát azonos testnagyságnál sokkal idősebbek a Balatonban található egyedek, mint elterjedési területén belül más vízterületeken.

A magyarországi vizekből származó angolnák erősen fertőzöttek *Anguillicoloides crassus* úszóhólyagféreggel. Ezt a fonálférget japán angolnákkal hurcolták be Európába. Az európai fajban azonban még nem alakultak ki védekező mechanizmusok a parazitával szemben. A fonálféreg tömegesen elszaporodva az úszóhólyagban az egész szerv funkcióját kiiktathatja, igazolhatóan csökkentve az úszóképességet, lerontva ezzel a kondíciót, amely szerepet játszik az angolna populációk csökkenésében (Van Banning 1990; Springer és Luchtenberg, 1991; Csaba et al., 1993; Molnár et al., 1991; Molnár, 1993; Molnár et al., 1993; 1994; Molnár és Moravec 1994; Pastra et al., 2005). Az 1991. és 1995. évi balatoni angolnapusztulásokért is elsősorban ez a nematóda volt a felelős.

A balatoni ikrás angolna állomány populációbiológiai-, ivarérettségi-, és egészségügyi eredményei azt mutatják, hogy a vándorlásában akadályozott, túlkoros balatoni angolna szaporodóképessége lecsökkent, a balatoni angolnaállomány konzervációbiológiai értéke ma már elenyésző (Müller, 2011).

Ebben a fajban az ivar kialakulását genetikai tényezők mellett környezeti faktorok is nagymértékben befolyásolják (Colombo és Grandi; 1995; 1996). A nagy hőingadozások az évszakok között, a bőséges táplálékellátottság, valamint az alacsony egyedsűrűség a nőivar kialakulását segíti elő. A balatoni angolnafelmérések azt mutatják, hogy a hímek aránya 1 százalék alatti (Durif et al., 2009, saját megfigyelés). A nagy egyedsűrűség az intenzív angolnanevelő farmokon viszont 80 százalékot meghaladó arányban hímek kialakulásához vezet (Colombo és Grandi; 1995; 1996). Kézenfekvő lenne szaporító alapanyagot beszerezni halfarmokról, de hazánkban jelenleg nincs működő angolna telep. Az utolsó üvegangolna behozatal termelési céllal 2001-ben történt az azóta már megszűnt körömi Angolna-Farmra

(AQUA-KULTÚRA Első Magyar-Német Halászati Kft). Jelenleg hím ivarú halak beszerzése kizárólag külföldi behozatalt jelent.

3.1.1.2. Indukált ivarérlelési eredmények

Balatonból származó ikrások felhasználásával, heti kétszeri pontyhipofízis és dopamin receptor antagonistá keverékkel 67-83 napos időtartam alatt (19.-25. kezelés) először 2000-ben sikerült beérlelni nőivarú angolnát és ovulált ikrát nyerni (Müller et al., 2001). Tejes hiányában ekkor nem történtek termékenyülési vizsgálatok, de megállapítottuk, hogy az erős *Anguillicoloides crassus* fertőzés, valamint a kereskedelemben kapható sóval beállított „mesterséges tengervíz” minősége nem akadályozta az ikrások beérését. A következő évben édesvízi ivarérleléssel és heti hCG kezeléssel sikerült spermát nyerni tejesekből (Müller et al., 2002). Ezt követte többféle hormon és hormontartalmú anyag tesztelése. A felhasznált hormonok/kombinációk közül a pontyhipofízis, a pontyhipofízis és motilium (dopamin receptor antagonistá), illetve a busahipofízis eredményesnek mutatkozott heti kétszeri, illetve egyszeri adagban is, angolnák ivari érésének kiváltására. A kétszeres mennyiségű pontyhipofízis + GnRHa + dopamin receptor antagonistá keverék ovulációra gyakorolt hatását nem sikerült egyértelműen tisztázni. Egy kísérleti ciklusban sikerült eredményes ikraleadást indukálni annak használatával, két másik kísérleti periódusban azonban a kezelés ovuláció nélkül anyahal elhullást okozott. Egy alkalommal a termékenyítésig is eljutottunk, de az ikrában nem indult meg az embriófejlődés (Müller et al., 2003).

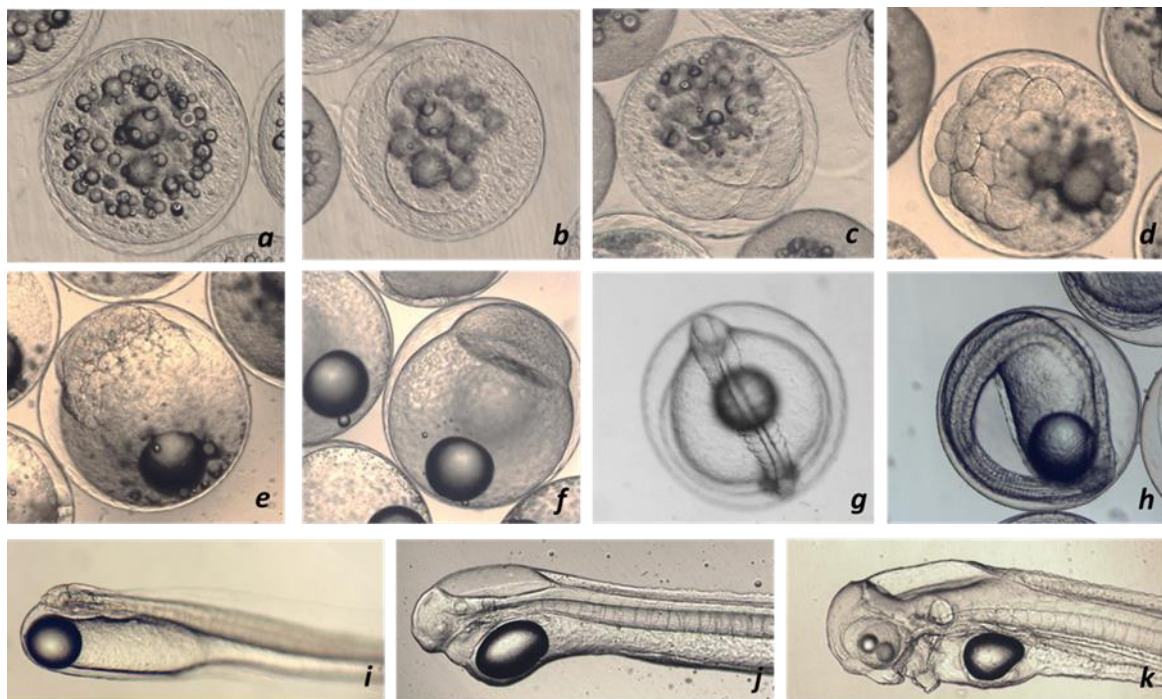
A hímivarral végzett kísérleti eredményeink alapján a mesterséges ivarérleléshez (heti hCG kezelés) nem volt szükség sós vízre. Az édesvízben ivarérlelt hímeket hosszú idejű (15 héten keresztül folyamatos) spermatermelésre lehetett készíteni (Müller et al., 2014a). Az ivarérlelést követően a nyert sperma mennyiségi- (spermamennyiség, spermiumszám), minőségi- (mozgóképesség), és a spermium finomszerkezeti tulajdonságai (elektronmikroszkópos vizsgálat) alapján nem különbözött a sósvízben leírtakhoz képest (Müller et al., 2005). Termékenyítési teszt hiányában azonban nem volt egyértelműen kijelenthető, hogy az édesvízi érlelés felválthatja a sósvíz használatát.

Az angolna fajban elért spermamélyhűtési eredmények az 3.1.2., 3.1.3. fejezetben olvashatóak.

Computer tomograph (CT) segítségével nyomon követtük az ivarérlelés során bekövetkező egyes fiziológiai változásokat, mint például a zsírmobilizációt, vagy a gonádok növekedését (fejlődését) *in vivo*, mindkét ivarban. A CT vizsgálat azt mutatta, hogy az indukált érés során a hasüregi zsír a here szöveti fejlődéséhez szükséges energia fedezésére fordítódott, de a filé zsírdépei az éhezés ellenére növekedtek. Ez utóbbi kapcsolatban lehet a hosszú vándorútra való felkészüléssel, hiszen az oldaltörzs izomzatok 6 hónapon keresztül folyamatos energiaellátásra szorulnak (Müller et al., 2004c, 2012). A CT, mint nem invazív eszköz, jó segítség lehet az anyahal állományok kiválasztásában, hiszen élő állapotban megadja a zsírraktárak volumetrikus nagyságát, illetve az ivarszervek méret szerinti fejlettségét mindkét ivarban (Müller et al., 2004a,b).

Kísérletes eredmények alapján megállapítottuk, hogy az európai angolnák a prepubertás állapot utáni maturáció alatt az ozmoreguláció szempontjából eurihalin (széles sótűrésű) élettani állapotban vannak. Habár ezt tejeseknél már évtizedek óta bizonyították (Bieniarz és Epler, 1977; Khan et al., 1987; Colombo et al., 1987; Müller et al., 2004c, 2005), de a nőivar esetében először írtuk le, hogy az édesvízi környezetben (kútvízzel táplált átfolyó rendszer összes ion tartalma 392 mg / l, vezetőképessége 622 μ S / cm volt, vízhőmérsékletet 12-14 °C) is sikeresen

lehet ivarérlelni ikrás egyedeket: max. GSI = 13,09%, az oociták középvitellogenikus fázisba léptek (Horváth et al., 2011). Azóta teljes ivarérést is sikerült elérni édesvízi környezetben (nem publikált adat). Kísérletes bizonyítékokat gyűjtöttünk arra nézve is, hogy az európai átlagnál (7-8 év) háromszor hosszabb ideje édesvízben élő, előregedő (senescence fázisú) balatoni ikrásokból detoxikáló fürdetésekkel *in vivo* eltávolíthatóak az évek alatt felhalmozódott azon toxikus ágensek, amelyek bizonyítottan az oogenezis utolsó fázisában (vitellogenezis) az oociták fejlődésben vagy érésében atreikus zavarokat okoznak/okozhatnak. Egy gyógykezelési (Mebendazole és Levamisole gyógyszerekkel parazitamentesítés), valamint egy károsanyag-mentesítési eljárást követően (tőzegkivonat, illetve tőzeg-zeolitos vízkezelés) gonadotróp hormon heti adagolásával serkentettük a halak ivarérését. A 8-16 hétig tartó kezelési időszak végén 2013 és 2016 között 14 esetben értünk el spontán, illetve indukált ovulációt. Négy esetben sikerült a termékenyülésig eljutni, egy alkalommal pedig életképes lárvákat is sikerült keltetni, amelyeket 8 napig sikerült nevelni (17. ábra, Müller et al., 2016).



17. ábra. Angolna embrió-, és lárvagenezisének néhány állomása a MATE Szent István Campuson (volt Szent István Egyetem), Gödöllő, 2016, saját képek) szaporított halak esetében, keltetővíz 18 °C;

- a: termékenyített és duzzadt ikra, 0:30h
- b: 2 sejtes állapot, 1:30h,
- c: 4 sejtes állapot, 1:40h,
- d: 16 sejtes állapot, 2:50h,
- e: 128 sejtes állapot, 3:45h,
- f: hólyagsíra speher állapot, 12:00h,
- g: szegmentáció 26 szomitás állapot, 15:00h,
- h: pharyngula stádium, prim 15 állapot, 43:00h
- i: frissen kelt lárva,
- j: 3 napos lárva,
- k: 8 napos lárva.

Mivel a hazai tejes angolnák beszerzése nehézségekbe ütközött, így a meglévő hímvivarú halaktól az indukált ivarérelést követően gyűjtött spermát nem csak a kísérletre használtuk fel (Müller et al., 2004c, Szabó et al., 2005), hanem nagyszámú spermamintát mélyhűtöttünk is, jövőbeni felhasználás céljából. Ugyanakkor nem voltunk biztosak abban, hogy a konzervációbiológiai szempontból kedvezőtlen kondíciójú, Balatonból beszerezhető, ikrások (első lárvanyerés 2015) alkalmasak lennének szaporítási vagy termékenyítési kísérletekre, így kerestük az alkalmat, hogy a mélyhűtött spermamintákat termékenyítési kísérletben is tesztelhesük. 2010 és 2011 között kutatási együttműködést alakítottunk ki japán kutatókkal, hogy japán angolna (*A. japonica*) ikrások felhasználásával termékenyítési (hibridizációs) kísérleteket folytathassunk le mélyhűtött európai angolna sperma felhasználásával (3.2-3.3 fejezetek).

3.1.2. Angolna tejesek felkészítése, spermamélyhűtés

A sikeres spermamélyhűtéshez elengedhetetlen a jó minőségű ivartermék. Az angolna fajokban zárt rendszerű felnevelés során nem mennek végbe az ivaréresi folyamatok, ezért a spermiogenezis és végső soron a spermáció folyamatát különböző ivari hormonokkal történő hosszantartó kezeléssel kell elősegíteni. A gonadotropin kezelés általánosan alkalmazott az indukált ivarérelés kiváltásában tejesekben, ami angolna fajok esetében egy vagy kétszeri (Colombo et al., 1987; Dollerup and Graver, 1985; Khan et al., 1987) vagy hetente ismételt hCG kezelést jelent (Bleniarz and Epler, 1977; Pérez et al., 2000; Müller et al., 2004b, 2005; Tomkiewicz and Jarlbæk, 2008; Tomkiewicz, 2012; Mordenti et al., 2013; Vílchez et al., 2014a, 2014b; Marohn and Hanel, 2016; Sørensen et al., 2016; Jéhannet et al., 2017). Újabban szintetikus homológ rekombináns gonadotropint, FSH és LH hormonkezelést (Kazeto et al., 2014; Ohta et al., 2017; Peñaranda et al., 2018) is alkalmaznak. Hormonhatásra az 5.-6. héten már spermát lehet nyerni a kezelt tejesekből, a spermatermelés pedig hosszú, akár 15 hétig is eltarthat (Müller et al., 2004c). A legjobb minőségű sperma általában a 8.-12. héten nyerhető (Pérez et al., 2000; Müller et al., 2004c). Habár a szakirodalomban közölt vizsgálatokban a tejeseket általában tengervízi körülmények között ivaréreltik, de édesvízben is mozgóképes spermatermelésre lehet bírni az európai angolna tejeseket (Bleniarz and Epler, 1977; Colombo et al., 1987; Khan et al., 1987; Müller et al., 2004c, 2005). Az édesvízi ivarérelés a nyert sperma mennyiségi (sperma térfogat, spermiumszám), minőségi (mozgóképesség) és finomszerkezeti tulajdonságai (elektronmikroszkópos vizsgálat) alapján nem különbözik a sós vízben érlelt hímeknél leírtakhoz képest (Müller et al., 2005). Termékenyítési teszt hiányában azonban ez idáig nem volt egyértelműen alátámasztva, hogy az édesvízi érlelés felválthatja-e a sósvíz használatát.

3.1.3. Spermamélyhűtési protokollok

3.1.3.1. Japán angolna spermamélyhűtés

Az első spermamélyhűtéssel foglalkozó közleményt Tanaka et al. (2002) közzétették, akik japán angolnában érték el sikereket. Kísérleteiket dimetilszulfoxid (DMSO) védőanyaggal végezték, amelyet általánosan alkalmaznak tengervízi halfajok spermamélyhűtésénél, valamint egy hígítóval, amely NaCl, NaHCO₃ és szója lecitin tartalmú volt (14. táblázat). Ezzel a hígító és védőanyag kombinációval sikeres termékenyítési teszteket hajtottak végre, a kelési arány azonban jóval elmaradt a friss spermával termékenyített kontrollhoz képest. Hosszú idő múlva,

a magyar-japán együttműködést követően új hígítóval és védőanyag kombinációjával kísérleteztünk (Müller et al., 2017). A hígító ASP (artificial seminal plasma) volt (Ohta et al., 1997a, 1997b, 1996), metanol védőanyaggal (Müller et al., 2004c; Szabó et al., 2005), amely izopropil-plazma izoionikus, ellentétben a DMSO-val, amely ozmotikusan invert, elkerülve ezzel a DMSO által okozott aktiválási problémát. Habár sikeres termékenyülési értékeket értünk el, de az embriók alacsony túlélési aránya, valamint a rendellenesen fejlődő, torz lárvák viszonylag nagy száma azt jelezte, hogy az alkalmazott módszer még finomításra szorul. Koh et al. (2017) egy kísérletsorozatot végeztek, amelynek központjában a K30ASP hígító alkalmazása állt. Ehhez kapcsolódóan számos egyéb faktort vizsgáltak, mint például különböző védőanyagokat különböző koncentrációkban (metanol, DMSO, N,N-dimetil-formamid (DMF), N,N-dimetil-amid (DMA), metanol és DMA kombinációja), magzati szarvasmarha szérum (FBS) jelenléte vagy hiánya. Ezek mellett különböző hőmérsékleti kezelések hatását is vizsgálták a mélyhűtés előtt, a hígítási arányokat, valamint a hűtési sebességeket. A legjobb eredményeket metanol, valamint metanol és DMSO 10-15% koncentrációjával érték el, a hígító összetételét pedig a 14. táblázat tartalmazza. Érdekes volt, hogy a DMSO és a K30ASP inkompatibilis volt egymással japán angolna spermamélyhűtésekor. Nomura et al. (2018), felhasználva Koh et al. (2017) eredményeit nagyobb műszalmával (5 ml-es) is leírt egy spermamélyhűtési protokollt, amivel termékenyítési kísérleteket is végeztek. A mélyhűtött spermával ugyanolyan termékenyítési értékeket értek el, mint natív spermával. A mélyhűtött spermából kikelő lárvák morfológiai jegyei nem különböztek a normál spermával termékenyített társaikéhoz képest, normális növekedési ütemben érték el az üvegangolna stádiumot, jelezve a módszer hatékonyságát és gyakorlati halszaporítási szintű használhatóságát.

3.1.3.2. Európai angolna spermamélyhűtése

Két kutatócsoport (Universitat Politècnica de València, Szent István Egyetem, ma Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem) egymástól függetlenül kezdte meg kísérleteit és dolgoztak ki saját mélyhűtési módszertant. Emiatt jelentősen eltértek egymástól az alkalmazott hígítók, a védőanyag kombinációk, valamint a technológiai lépéseik (14. táblázat). A spanyolországi csoport írta le az első protokollt (Asturiano et al., 2003), amely részben a korábbi, japán angolna számára kidolgozott, módszertant módosította (14. táblázat). Minden hígító kombinációt 10% DMSO védőanyag hozzáadásával tesztelték különböző sperma hígítási arányokkal. A mélyhűtött spermamintákat 0,25 ml-es műszalmában tárolták 10 perces ekvilibrációs időt követően (5 cm-rel a folyékony nitrogén (LN) fölött), majd helyezték a műszalmákat a LN-be. A felolvasztás során a műszalmákat 45 másodpercig 20 °C-os vízfürdőbe merítették, majd ellenőrizték a minőségét. A kapott eredmények alapján a Tanaka, és az úgynevezett P1 hígító, 10% DMSO-val 1:5 arányban hígított spermaminták mutatták a legnagyobb spermiummotilitást felolvasztást követően (Asturiano et al., 2004, 2003). A spanyol kísérletekkel párhuzamosan (Müller et al., 2004) pontyban használt módosított Kurokura hígítóval és 10% metanollal, mint védőanyaggal kísérleteztünk (14. táblázat). A sperma: hígító: védőanyag arány 1:8:1 volt, a 0,25ml-es műszalmákat 3 perces ekvilibrációs időt követően (4 cm-rel a LN fölött) helyeztük LN-be. A felolvasztás 40 °C-os vízfürdőben 5 másodperc alatt történt. Ezt követően Szabó et al. (2005) kísérleteztek különféle hígítókkal és kétféle védőanyag kombinációjával (DMSO és metanol), és azt találták, hogy a módosított Tanaka hígító (Tanaka et al., 2002 által leírt hígító, de szója lecitin nélkül) és 10% metanol védőanyag kombinációja adta a legmagasabb motilitást a felolvasztást követően.

A spanyol kutatócsoport (Garzón et al., 2008; Marco-Jiménez et al., 2006a, 2006b) különféle kombinációkban vizsgálta a DMSO, a metanol és más védőanyagok, a különféle hígítók és FBS

kombinációk hatását a sperma motilitására, életképességére, és a spermium fej finomszerkezetére. DMSO és metanol védőanyagokkal hasonlóan jó motilitási eredményeket értek el, a spermiumok fejének átmérője azonban metanol védőanyag alkalmazásakor kisebb volt, mint DMSO környezetben. FBS 25%-os kiegészítéssel kedvező hatást értek el, hasonlóképpen L- α -foszfatidil-kolin hozzáadásával. Utóbbi azonban a sperma ozmolalítását és sűrűségét is növelte, emiatt nem javasolták gyakorlati alkalmazásra. Noha a DMSO, mint védőanyag alkalmazásával kedvező eredményeket lehetett elérni a felolvasztott sperma egyes paramétereit tekintve (motilitás, életképesség, spermium sejtek fejmérete), az ozmolalítás megváltozásával azonban az oldat aktiválta a spermiumokat. Ennek elkerülésére Peñaranda et al. (2009) kutatásaikban a pH és a NaHCO₃ koncentrációk különböző kombinációira helyezték a fő hangsúlyt, alapul véve a japán kísérleteket (Tanaka et al., 2002), ahol a NaHCO₃ a spermiumsejteket inaktív állapotban tartotta. Ennek alapján Peñaranda et al. (2009) kifejlesztettek egy módosított P1 tápközeget (tanulmányukban M5-nek nevezték el), amely 100 mM NaHCO₃ -ot (pH 6,5) tartalmaz, és ami részlegesen megakadályozza a DMSO aktivációs hatását. Ezenkívül finomították a protokollt is, 1:2 arányú (sperma: fagyasztó közeg) hígítást alkalmaztak és a 0,25 ml-es szalmát 1,6 cm-rel az LN fölött hűtötték 5 percig mielőtt az LN-be merítették. Ezzel a módszerrel a felolvasztást követően 40% körüli motilitási értéket kaptak. Ezt a protokollt követve, Asturiano et al. (2016) elsőként hajtott végre sikeres termékenyítési kísérletet mélyhűtött európai angolna sperma felhasználásával. A termékenyítést követően azonban, európai angolna ikratételeket felhasználva, csak néhány lárvát sikerült nyerniük (a közleményben nem közöltek pontos kelési arányt). Fontos kiemelni, hogy az először leírt kutatáshoz képest 4 évvel később sikerült felhasználni mélyhűtött európai angolna spermát hibridizációs kísérletekhez, amely a következő fejezetben kerül részletes kifejtésre.

3.1.3.3. Angolna hibridizációs kísérleti eredmények, valamint mélyhűtött európai angolna sperma felhasználásával végzett kísérletek

Számos tanulmány jelent meg az angolna genuson belüli eredményes fajhibridizációs kísérletekről. Így például *A. australis* ikrás és *A. dieffenbachii* hímekkel (Lokman and Young, 2000), *A. australis* ikrás *A. anguilla* tejessel (Burgerhout et al., 2011; Okamura et al., 2004) európai angolna spermával termékenyített japán angolna ikrákat és belőlük kikelt hibrideket 35 napig nevelték tovább. A reciprok-keresztvezést nem tudták végrehajtani az európai angolna ikrások nehéz és még kidolgozatlan ivarérelési technológiája miatt. Matsubara et al. (2010) tovább nevelték a hibrideket, amelyekből néhány elérte a metamorfózis méretet és üvegangolnává alakult (édesvízi életciklus első lépése). A nagy földrajzi távolság nem akadályozta a mesterséges hibridek létrehozását, ami az angolna genus ősi jellegével áll kapcsolatban.

5. táblázat. A japán és európai angolna fajokban végzett spermamélyhűtési kísérletek összehasonlító módszere Herranz-Jusdado et al., (2019b) nyomán módosítva. (*, ** *A dolgozat tárgya, az 3.2.-3.4. fejezetek tárgyalása során kerül ismertetésre*)

| Faj | Hígító neve és alkotóelemei (milimólban) | Védőanyag | pH | szerzők |
|---|---|-------------------------------------|-----------------------------|--|
| Japán angolna | <u>Tanaka</u> 137 NaCl, 76,2 NaHCO ₃ , mM szója lecitin | DMSO (10%) | 8.2 | Tanaka et al. 2002 |
| | <u>ASP</u> 149,3 NaCl, 15,2 KCl, 1,3 CaCl ₂ , 1,6 MgCl ₂ , 20 NaHCO ₃ , 20 TAPS-NaOH | MeOH (10%) | 8.1 | Müller et al. 2017 |
| | <u>K30 ASP</u> 134,3 NaCl, 30 KCl, 1,3 CaCl ₂ , 20 NaHCO ₃ , 1,6 MgCl ₂ , 20 TAPS- NaOH, 22,5% FBS | MeOH (10-15%), MeOH+DMA (10-15%) | 8.1 | Koh et al. 2017 Nomura et al. 2018 |
| Európai angolna | <u>TNK</u> 137 NaCl, 76,2 NaHCO ₃ , 20 TAPS | DMSO (10%) | 8.1 | Asturiano et al. 2003 |
| | <u>P1</u> 125 NaCl, 20 NaHCO ₃ , 30 KCl, 2,5 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 1,4% L- α -phosphatidylcholine | DMSO (10%) | 8.5 | Asturiano et al. 2004 Asturiano et al. 2007 Szabó et al. 2005 |
| | <u>módosított Kurokura</u> 61,6 NaCl, 134,1 KCl, 1,98 CaCl ₂ , 0,84 MgCl ₂ , 2,4 NaHCO ₃ | MeOH (10%) | 8.0 | Müller et al. 2004c |
| | <u>Módosított Tanaka</u> 137 NaCl, 76,2 NaHCO ₃ | MeOH (10%) | 8.2 | Szabó et al., 2005 Müller et al., 2012* Müller et al., 2016** Herranz-Jusdado et al. 2018 |
| | <u>P1+FBS</u> 125 NaCl, 20 NaHCO ₃ , 30 KCl, 2,5 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 25% FBS | DMSO (10%) | 8.5 | Marco-Jiménez et al. 2006 |
| | <u>Módosított P1</u> 125 NaCl, 75 NaHCO ₃ , 30 KCl, 2,5 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 25% FBS | DMSO (10%) | 8.5 | Garzón et al. 2008 |
| | <u>Módosított P1 (M5)</u> 50 NaCl, 100 NaHCO ₃ , 30 KCl, 2,5 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 25% FBS | DMSO (10%) | 6.5 | Peñaranda et al. 2009 Asturiano et al. 2016 |
| <u>P1+tojás sárga</u> 125 NaCl, 20 NaHCO ₃ , 30 KCl, 2,5 MgCl ₂ , 1 CaCl ₂ , 5% tojássárga | MeOH (10%) | 8.5 | Herranz-Jusdado et al. 2019 | |

3.2. Anyag és módszer

Angolna esetében több spermamélyhűtési protokoll is ismert (Herranz-Jusdado et al., 2019a összefoglaló tanulmánya, 15. táblázat), a dolgozatban ismertetett eredmények előtt azonban az európai angolna mélyhűtött spermájával végzett termékenyítési tesztről még nem jelent meg publikáció. A sperma mélyhűtés sikerességét eddig közvetett információk alapján becsülték meg (motilitás, progresszív motilitás, mozgóképesség ideje stb.). 2010 és 2011 között lehetőség nyílt európai angolna mélyhűtött spermamintákat Japánba szállítani és két különböző Intézetben, az ottani programozott japán angolna ivarérelési és szaporítási kísérletekben tevékenyen részt venni, és termékenyítési teszteket is végrehajtani. Három kérdésre kerestük a választ:

1) Az európai angolna „magyar módszer” alapján mélyhűtött spermája képes-e termékenyíteni a japán angolna ikratételeket?

2) Hímivarú angolnák esetében az édesvízi ivarérelés kizáró faktor-e a sikeres termékenyítési tesztek végrehajtásához?

3) A sperma középhosszú idejű tárolása (a minták 2005-ből származtak, a termékenyítési teszteket 2010-ben hajtottuk végre) akadály-e a termékenyülésnek?

3.2.1. Hím ivarú angolnák ivarérelése

Mindkét kísérlet alkalmával azonos eredetű volt a mélyhűtött sperma. A hím ivarú angolnák ivarérelési 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 (szalinitás 0,05%, vízhőmérséklet $20 \pm 1,5$ °C, $n = 6$; testtömeg $134,2 \pm 42$ g). A kísérleti periódus alatt halainkat nem tápláltuk. Indukált ivarérelésükhöz heti ismételt hCG-t használtunk (250 IU hCG / hét / hal). Minden beavatkozás előtt – hormoninjekció, spermafejes – fenoxi-etanollal (40 ml / 100 liter) altattuk a kísérleti halakat. A fejes menete a következő volt: az egyedileg megjelölt tejeseket altatásukat követően előzetesen benedvesített asztallapra fektettük. Papírtörölközővel a genitális területet szárazra töröltük, majd fej irányából a genitális terület felé a hasfal nyomásával készítettük a spermaleadásra. A lefejt tejet automata pipettával fogtuk fel, elkerülve a vizelettel és bélsárral való szennyeződést. Spermamélyhűtésre a 8. heti kezelést követően fejtünk spermát. Azokat a mintákat választottuk ki, melyek átlagos becsült mozgóképessége elérte a 80%-ot. A sperma minőségét – elsősorban a mozgóképes sejtek arányát – mesterséges tengervíz (3,4% NaCl) aktivációt követően mikroszkóp alatt ellenőriztük $200\times$ nagyításon. A mintákat összekevertük, majd Müller et al. (2004c) és Szabó et al. (2005) által leírtak alapján mélyhűtöttük. Hűtés előtt a spermát 1:9 arányban módosított Tanaka hígító oldattal (137 mM NaCl and 76,2 mM NaHCO_3) és 10% metanollal hígítottuk. A 0,5 ml-es műszalma (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) 400 μ l kevert spermát, 400 μ l védőanyagot és 3,2 mL hígító oldatot tartalmazott. A műszalmákat 3 perc elteltével folyékony nitrogénbe helyeztük. A hűtést folyékony nitrogénnel töltött polisztirol dobozban végeztük. Egy előre elkészített 3 cm magas – szintén polisztirolból készített – keretet helyeztünk a felszínre. Az előre elkészített műszalmákat erre a keretre helyeztük, tehát a folyékony nitrogén gőzében (-80 °C) kezdődött meg a mélyhűtés folyamata. 3 perces ekvilibrációs idő után a szalmákat folyékony nitrogénbe helyeztük és felhasználásig 35 l-es kanniszteres kannában (VWR XSS 48/10, VWR International Kft, Debrecen, Hungary) tároltuk. A minták szállítása repülőgépen történt 10 literes folyékony N kannában (BIO10, Statebourne Cryogenics, Washington, Tyne and Wear, UK). A felolvasztás közvetlenül a termékenyítés előtt történt 40 °C-os vízfürdőben, 13 másodpercig.

3.2.2. *Japán angolna ikrások ivarérelése*

Mindkét kísérleti helyszínen (Hokkaido Egyetem és Tokiói Mezőgazdasági Egyetem) Ohta et al. (1997a, 1996), valamint Ohta és Izawa (1996) protokollja alapján történt az ikrások ivarérelése és indukált ovulációja. A Hokkaido Egyetemen végzett kísérletben két ikrás (testtömeg 621 – 667 g), a Tokiói Mezőgazdasági Egyetemen négy ikrás (testtömeg $578 \pm 129,4$ g) tengervízi ivarérelése során intramuszkuláris injekcióban szárított lazac hipofízis homogenizátumot kaptak heti rendszerességgel $40 \mu\text{g} / \text{g}$ testtömeg adagban. A felkészült halakban az ovulációt egyszeri intramuszkuláris $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one-nal váltották ki $1 \mu\text{g} / \text{testtömeg kg-os}$ adagban. A termékenyítést ún. száraz termékenyítési eljárással végeztük. A Hokkaido Egyetemen végzett kísérletben 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 (ASP:sperma = 100:1, Ohta et al., 1997b) termékenyítettük. A mélyhűtött műszalmákat 40°C -os vízfürdőben felolvasztottuk (13 másodperc), majd az 1 g-os ikratételeket azonos módon termékenyítettük, mint a kontroll tételeket. A kontroll japán angolna spermával (angolna Ringer oldatban hígított sperma – kontroll tételek) összekevertük és mesterséges tengervízzel aktiváltuk. 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 Tokiói Mezőgazdasági Egyetemen végrehajtott kísérleti ciklusban a termékenyülési értékek meghatározásához előkezelt tengervízet 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 bovine serum albumin fraction V (Nacalai Tesque, Inc., Kiotó, Japán). 96 véletlenszerűen kiválogatott ikraszem került a 2×48 lyukú plate-be (1 ikrá 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 $\times 100$

Kelési % = kelt lárvák száma / összes ikraszem $\times 100$

Lárva deformáció 1: kikelt deformált lárvák száma / összes ikrá $\times 100$

Lárva defromáció 2: kikelt deformált lárvák száma / kikelt lárvák száma $\times 100$

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

3.2.3. *Statisztikai analízis*

Az eredmények értékeléséhez az SPSS 22v (IBM Corp, 2013) statisztikai szoftvert használtam. Az egyes vizsgálatok értékelésére eltérő statisztikai próbákat alkalmaztam, amelyeket a vizsgálatok leírásánál külön ismertetek.

3.2.4. Genetikai analízis

Az utódok genetikai vizsgálata mindkét kísérleti ciklusban azonos volt. 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. A DNS kivonását Blin and Stafford (1976) módosított módszerével végeztük. 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% agarózgélén (Serva, Németország), és etidium-bromiddal megfestettük.

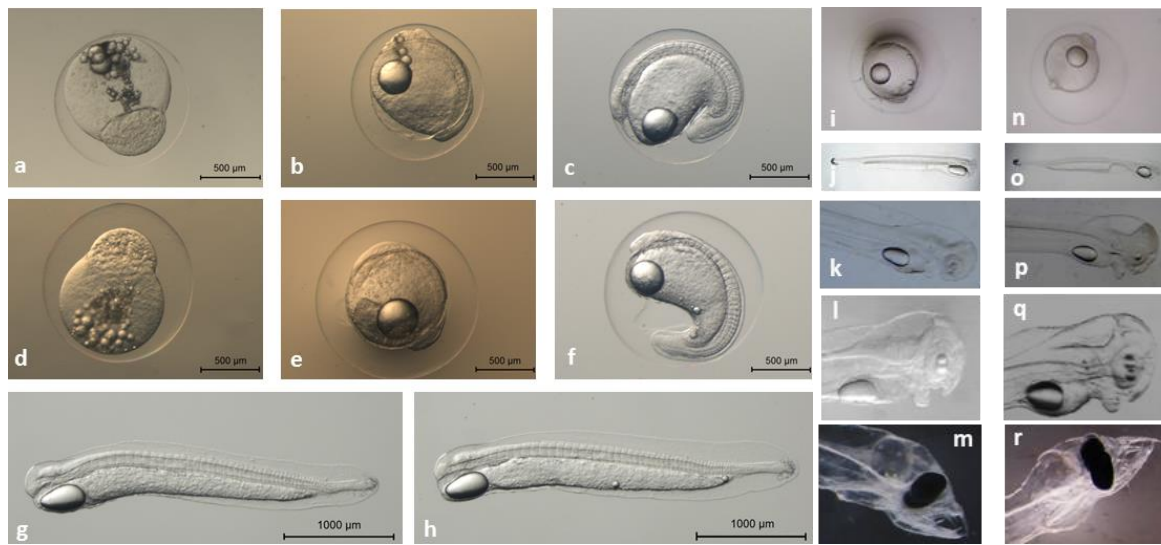
A hatékony genotipizáláshoz SNP kimutatására alkalmas, *HRM* (nagy felbontású olvadáspont elemzés) alapú vizsgálatot optimalizáltunk. Az FSH gén 100 bázispár hosszúságú PCR termékének felszaporítása Rotor-Gene Q 5plex HRM platformon történt, Type-it HRM PCR Kit (QIAGEN, Hilde, Germany) és EvaGreen interkaláló festék segítségével. A PCR reakciókat 17ng 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.

3.3. Eredmények

3.3.1. Termékenyülés és lárvafejlődés

Mindkét kísérleti ciklusban sikeresek voltak a termékenyítési tesztek, 34 órával a termékenyítést követően életképes utódok keltek ki az ikrából. Az első kísérletben (Hokkaido Egyetem) a kelési és termékenyítési arány a kontroll (japán angolna × japán angolna) és a hibrid esetében is alacsony, <1% volt. A hibrid és a japán angolna embriogenezisének hossza és a frissen kelt lárvák alaktani bélyegei alapján nem találtunk különbséget (18. ábra). A második kísérleti ciklusban (Tokiói Mezőgazdasági Egyetem) vizsgált paraméterek között (15. táblázat) a nagy egyedi variancia miatt nem volt statisztikailag igazolható különbség ($p > 0,05$). A rendellenesen fejlődő és kikelt lárvák aránya a kelési arányhoz képest magasabb volt a hibridek

között (min-max.: 42,8-100%), ám a kontroll japán angolna × japán angolna csoportokhoz viszonyítva statisztikai különbségeket ($p > 0,05$ min-max.: 16-49,9%) nem figyeltünk meg.



18. ábra. **a-g** képek *A. japonica*; **d- h** képek *A. japonica* × *A. anguilla* hibrid embriófejlődésének néhány állomása és kelő lárváik. Termékenyítéstől eltelt idő órában – h.

a,d: blasztula állapot (high stage) 1:00h;

b,e: ~10 szomitás állapot, 15.30 h;

c,f: 30 szomitás állapot; 22.30 h;

g,h: frissen kelt lárvák (Müller et al., 2012 nyomán módosítva)

i-m képek: *A. japonica* és **n-r** képek: *A. japonica* × *A. anguilla* hibrid embriófejlődésének néhány állomása és kelő lárváik. Termékenyítéstől eltelt idő órában – h.

i,n: az első szomitás állapot 22:00h,

j,o: frissen kelt lárvák,

k,p: 5 napos lárvák,

l,q: 7 napos lárvák,

m,r: 10 napos lárvák (képek: Dr. Hajime Matsubara)

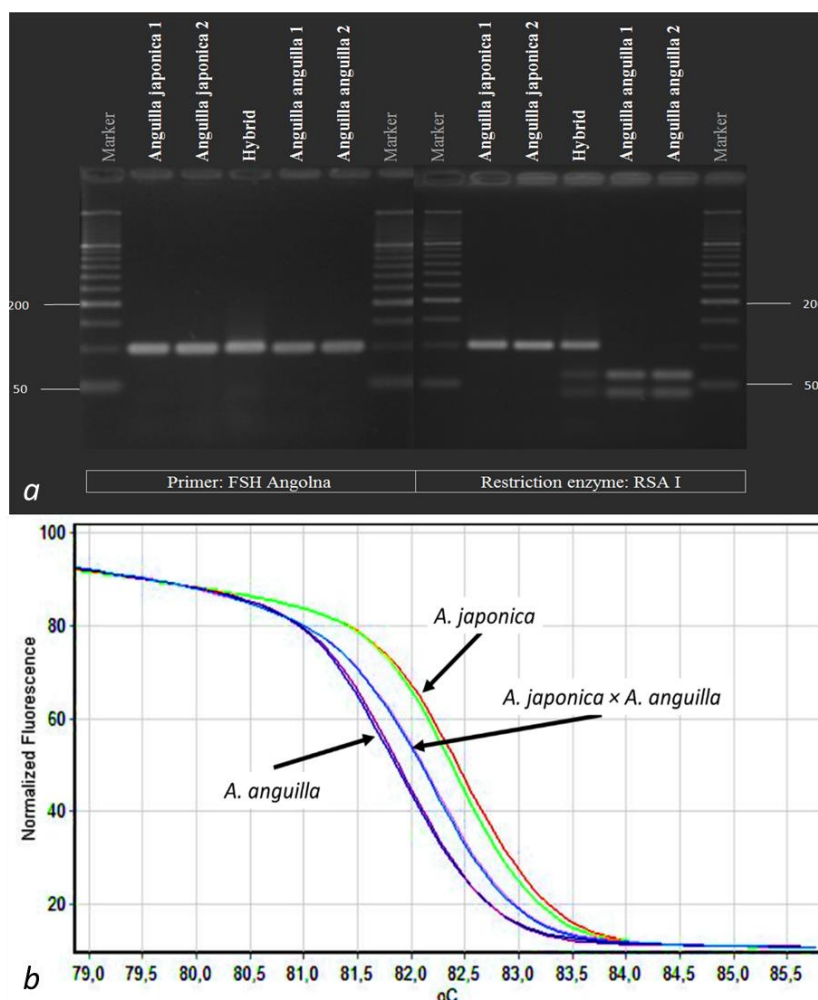
6. táblázat. Különböző spermamintával történő termékenyítési eredmények összefoglaló táblázata

| Termékenyítő tejes | Terméke-nyülés (%) | Kelési arány (%) | 10 napos túlélés (%) | Lárva deformáció 1. | Lárva deformáció 2. |
|--|--------------------|------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | n = 4 ikrás | | | | |
| <i>A. japonica</i> ♀ × <i>A. japonica</i> ♂ (natív) | 57,2±18,2 | 19,8±11,2 | 14,3±10,7 | 5,4±3,3 | 32,5±28 |
| <i>A. japonica</i> ♀ × <i>A. anguilla</i> ♂ (mélyhűtött) | 35,1±21,2 | 7,3±6,3 | 3,9±4,4 | 4,1±2,8 | 70,1±15 |
| <i>A. japonica</i> ♀ × <i>A. japonica</i> ♂ (mélyhűtött, Müller et al., 2017) | 6.2 – 32.6 | 16,9±11,2 | 8,6±4,9 | 7,7±6,2 | 41±18,4 |

Lárva deformáció 1. = kikelt deformált lárvák száma / összes ikrá × 100, lárva deformáció 2. = kikelt deformált lárvák száma / kelt lárvák száma × 100

3.3.2. Genetikai vizsgálatok

A genetikai vizsgálatok eredményei egyértelműen kimutatták, hogy a vizsgált minták mindegyike hibrid volt. A negatív kontrollnak olyan sávja volt, amely megfelel a dimerizált primereknek, templát nélkül és az összes többi PCR komponens jelenlétében. Ráadásul körülbelül ugyanolyan méretű volt, mint a hibrid / európai angolna alsó (40 bázispár) korlátozott sávja. Az átfedő emésztési mintával megjelenítve a hibrid egyértelműen mutatta a két szülői allélt, feltárva, hogy az *A. anguilla* mesterséges keresztezése az *A. japonica*-val sikeres megtermékenyülést eredményezhet (21. ábra). A homozigóta és heterozigóta genotípusokat az újonnan kifejlesztett HRM alapú SNP elemzésekkel igazoltuk. Az eredményeket a Rotor-Gene szoftverrel és szemrevételezéssel értékeltük (19. ábra).



19. ábra. Genetikai összehasonlító vizsgálatok a japán-, európai angolna és hibridjük között. **a**: PCR-RFLP analízis japán angolna, hibrid és európai angolnában. Gél elektroforézis 3% agaróz gél. PCR termék FSH Angolna F és FSH Angolna R primerek (balra) és a töredék fragmentek a restrikciós enzim (RSA I) hatására jobbra. Marker = 50 bázispár molekulásúly marker (Fermentas, EU). A kiválasztott restrikciós enzim az európai angolna szekvenciáját a 40. bázispárnál elvágja, míg a japán angolnából származó fragmentet érintetlenül hagyja, a hibridben viszont mindkét – hasított és nem hasított – fragment megtalálható (Müller et al., 2012 nyomán). **b**: A japán, az európai és a hibrid angolna normalizált HRM profilja. Az FSH Angolna F és FSH Angolna R primerekkel amplifikált PCR termékeket amplifikáció, majd HRM görbék generálása. A genotípusok közötti különbség a 65° C és 90° C közötti fluoreszcencia intervallumban. A nyilak kapcsolódnak a genotípus megfelelő görbéhez (Müller et al., 2018 nyomán).

3.4. Eredmények értékelése

Amikor egy halfaj két ivara ivarérésének szinkronizációja problémákba ütközik, vagy ikraszórásakor nem áll rendelkezésre jó minőségű sperma, akkor a termékenyítés mélyhűtött spermával különösen előnyös lehet. Angolna esetében mindkét eset gyakran előfordul. A leírt kísérletsorozatban a korábban használt spermamélyhűtési technológiai lépéssorozat követésével (Müller et al., 2004c; Szabó et al., 2005) és a módosított Tanaka hígító és metanol védőanyag használatával (Müller et al., 2017; Szabó et al., 2005) először sikerült európai angolna mélyhűtött spermájával sikeres termékenyítési tesztek végrehajtani és élő lárvákat létrehozni. Az első kísérleti ciklusban, a kontroll csoportban is tapasztalt alacsony termékenyülési érték azt mutatta, hogy az ikrások 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 ikra és lárva nyerést. Ugyanakkor először sikerült édesvízben ivarérett tejesek felhasználásával lárvát 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. Az eredmény értékét növeli, hogy a minták 2005-ben mélyhűtött spermákból származtak, 5 évvel felhasználásuk előtt. Azóta Peñaranda et al. (2009) protokollja alapján (14. táblázat) európai angolna fajban is sikerült termékenyíteni mélyhűtött spermával (Asturiano et al., 2016), azonban a kontroll termékenyítési értékekhez képest (69% és 94%) a mélyhűtött spermával csak 0-33%-ot értek el. A kelő lárvák emiatt néhány egyedre korlátozódtak, de a pontos kelési számokról a szerzők nem számoltak be.

A második kísérleti ciklusban európai angolna mélyhűtött spermájával való termékenyítés során magas arányban kaptunk deformált, rendellenesen fejlődő lárvákat, amit már a japán angolna spermamélyhűtése során is tapasztaltunk (Müller et al., 2017). Ez a jelenség nem általános a halsperma fagyasztása során, mert a mélyhűtés általában nem idéz elő lárvafejlődési problémát (Ottesen et al., 2012; Young et al., 2009). A sperma a mélyhűtés folyamán ugyanakkor sok káros tényezőnek van kitéve, ebbe beleértve a membránsérülést, a védőanyagok „szobahőmérsékleten” előidézett genotoxikus hatásait. Asturiano et al. (2007), Cabrita et al. (2005) és Labbé et al. (2001) vizsgálták és igazolták, hogy az angolna mélyhűtött spermájának mozgóképessége a mélyhűtést követően csökken a kiinduló, natív spermamintákhoz viszonyítva, valamint morfológiai változást is tapasztaltak az angolna sperma finomszerkezetében. 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 ($p > 0,05$), de feltételezzük, hogy nagyobb elemszám esetében ezek már kimutathatóak lettek volna. A japán angolna embrió-, és lárwanevelése során rendellenes lárvafejlődést mutattak ki a komfortzónától eltérő sókoncentrációjú és hőmérsékletű körülmények között (Kurokawa et al., 2008; Okamoto et al., 2009), azonban mivel a hibridek és a japán angolna lárvák azonos körülmények között nevelkedtek, így ezt a magyarázatot kizárhatjuk.

A genetikai vizsgálatok bizonyították a hibridek diploid jellegét, így az esetleges nagyszámú haploid, torz lárvák előfordulása is kizárható. Matsubara et al. (2010) mikroszatellit alapú vizsgálatokkal igazolta az *A. japonica* és az *A. anguilla* fajok közötti hibridizációt. A módszer hátránya, hogy a vizsgálatokat megelőzően előzetes információval kell rendelkezni a szülői alléleket illetően. A génbanki adatbázisokból elérhető *A. australis* és *A. marmorata* fajok FSH génre alapozott *in silico* vizsgálatainak alapján e fajok elkülönítése is lehetséges lehet a gén szekvencia polimorfizmusára alapozva (Burgerhout et al., 2011). A leírt PCR-RFLP alapú

módszer, amelyben a használt markerek a 18s rDNS régiót célozzák, nem mutat allépolimorfizmust az *A. anguilla* és az *A. japonica* fajok között, csak az *A. australis*, *A. rostrata* és *A. luzonensis* fajok elkülönítésére használható. Az általunk használt markerek viszont egyértelmű, gyors és olcsó detektálási lehetőséget nyújtanak a japán és az európai angolna fajok, továbbá azok hibridjeinek elkülönítésére is. Ez a módszer azóta a gyakorlati munkában is felhasználásra került. 2014. április 23-án a Nemzeti Adó- és Vámhivatal pénzügyőrei összesen 183 kg súlyú (kb. 610 000 egyed) angolna ivadékokat (*Anguilla* sp.) foglaltak le két kínai utas csomagjaiból a Liszt Ferenc Nemzetközi Repülőtéren. A rendelkezésre álló információk alapján felmerült annak a lehetősége, hogy az angolna ivadékok a japán angolna fajba tartoznak, így szállításuk engedélyeztetése más elbírálás alá esik. Az Egyezmény a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok nemzetközi kereskedelméről (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) II. kategóriába sorolja az európai angolnát (*A. anguilla*): nem fenyegeti a kihalás közvetlen veszélye, de befogásukra és kereskedésükre súlyos korlátozások vonatkoznak. A japán angolna (*A. japonica*) kereskedelmét viszont nem szabályozza a CITES. Hivatalos felkérés érkezett a lefoglalt szállítmány faji meghatározására. A két lárva faj morfológiai vizsgálatok alapján nem volt elkülöníthető egymástól, a genetikai vizsgálatok azonban egyértelműen igazolták, hogy a lefoglalt szállítmányt európai angolna ivadék alkotta (Kolics et al., 2015).

A hibridek embriófejlődése (18. ábra) nem különbözött jelentős mértékben a kontroll japán angolna embrióktól. Így például keléskor 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 (18. ábra). A megtermékenyítés után 34 órával sikeresen kikelttük az embriókat. Ebben a szakaszban normális szívverést figyeltünk meg. A második kísérleti ciklusban nem vizsgáltuk és hasonlítottuk össze részleteiben a lárvák ontogenetikus fejlődését. Matsubara et al. (2010) leírták, hogy azonos körülmények között nevelt hibrid angolnáknak (*A. japonica* × *A. anguilla*) 322 napra van szükségük a metamorfózist követő üvegálgolna fázis eléréséig, míg ez japán angolna lárvák esetében jelentősen rövidebb, 179 nap, időszak alatt végbemegy, ami arra utal, hogy a lárvafejlődés sebessége – valószínűleg már a korai fázisokban is – minden bizonnyal eltér egymástól.

A kísérletek befejezését követően lehetőség nyílt a tárolt minták spermaminősítésére is. A vizsgálatba vont műszalmák eredményei alapján a hosszan tartó mélyhűtés során az azonos pool-ban kezelt spermaminták felolvasztása után azok minőségében nagy egyedi különbségek mutatkoztak ($n = 15$ műszalma, progresszív motilitás $7 \pm 10,9\%$ (min-max.: 0-81,8%). Ennek okait nem kutattuk, de elképzelhető, hogy a folyékony N_2 tartályban a kaniszterekben lévő spermaminták némely esetben nem egyenletesen helyezkedtek el a folyékony N_2 -ben. Elképzelhető az is, hogy az évek során az elpárolgó N_2 némely esetben csak gőzében lepte el a mintákat (-80 °C), ami egyes minták részleges károsodását, gyengébb motilitását okozhatta.

3.5. Az angolna spermamélyhűtés felhasználásának lehetséges területei

Az angolna fajban végzett hazai spermamélyhűtési munkák alapul szolgáltak „üzemi” mennyiségű irkatételek termékenyítésére alkalmas technológia fejlesztéshez is Japánban. Koh et al. (2017) sikeres japán angolna spermamélyhűtési kísérleteket folytattak le 5 ml műszalmát alkalmazva, a hígító ASP volt (Müller et al., 2017), a védőanyag pedig metanol (Müller et al., 2012, 2004). 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 azzal 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 lárva zárt rendszerű nevelése a gazdaságossági szempontokat is figyelembevéve távolinak tűnik. A gazdaságilag jelentős halfajok esetében is megfogalmazódott, hogy termelésük volumene – kivéve a lazac tenyésztést – még nem biztosítja azokat a speciális tenyésztői feladatokat, amelyeket a spermamélyhűtés nagymértékben támogatni tudna (Horváth, 2019). 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 (Nomura et al., 2018), 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 (Stein et al., 2016). 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 (Miyai et al., 2004). Ezentúl az ételmszer eredet ellenőrzésben is szerepet játszhat a genetikai fajazonosítási vizsgálat.

4. Új tudományos eredmények

1. Egy új halszaporítási módszer alapjait fektettem 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 szeminális folyadék alkalmas hormonvívóanyag is lehet. A spermában szuszpendált 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 ikraszórásakor 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 termékenyítést végrehajtani és annak használatával életképes hibridet keltetni.
7. Kísérletes úton bizonyítottam, hogy a tengervízben szaporodó angolnák tejesek esetében nincs szükség tengervízi ivarérlelésre, az édesvízben ivarérlelt halak az eltérő ozmolalítású környezet ellenére is termékenyítőképes spermiumokat termelnek.

5. Összefoglalás

Dolgozatomban a hagyományos-, a hazai tógazdasági-, a keltetőházi-, és az akvarisztikai halszaporításoktól eltérő, alternatív indukált szaporítási kísérleteimet és azok eredményeit mutatom be két fő részre bontva. Az első részben egy általunk kidolgozott új halszaporítási eljárásban (petefészek inszemináció) elért eredményekről adok áttekintést. A módszer alapja, hogy a spermiumok biológiai aktivitásukat megtartva hosszabb ideig „tárolhatóak” petefészek lebenyben indukált szaporítás (vagy szaporodás) előtt valódi külső megtermékenyítésű halfajokban. Íváskor (ovulációkor) a gaméták együtt ürülnek, és vízaktivációkor bekövetkezik az ivarsejt egyesülés, azaz a termékenyülés. Ebben a részben gazdaságilag jelentős fajokban (ponty, afrikai harcsa, dél-amerikai ezüstharcsa) és egy laboratóriumi halfajban (zebradánió) végzett kísérletsorozatokon keresztül ismertetem a módszer technikai-, és biológiai sajátosságait, valamint alkalmazásának előnyeit. A petefészek inszemináció módszere technikailag egyszerű; a programozott íváásra felkészített és bódított ikrások petefészek lebenyébe fecskendőn rögzített szonda vagy katéter segítségével juttatjuk fel az előzőleg gyűjtött és minőségellenőrzésen átesett, egy-vagy több tejestől származó kevert sperma adagot/adagokat. A katéter könnyen irányítható, így lehetőség van a petevezetéseken keresztül célzottan a jobb vagy a bal petefészek lebenyt kezelni. Kisméretű halakban (pl. zebradánió: testméret 2-2,5 cm) a sperma befecskendezést automata pipettával vagy kapillárisal is meg lehet oldani. Afrikai harcsa fajban végzett kísérletek alapján 5-36 órával az ovuláció előtt a petefészekbe jutott spermiumok még megtartják termékenyítőképességüket, de 48 óra elteltével a termékenyülési és kelési értékek már nagymértékben visszaesnek. Pontyban és egy dél-amerikai ezüstharcsa fajban a keltetőházi gyakorlatnak megfelelő döntő hormon kezeléssel egy időben (10-12 órával az ovulációt megelőzően) bejuttatott spermiumok sikeresen termékenyítették az ikratételeket. Afrikai harcsában vizsgáltuk a petefészekbe fecskendezett különböző mennyiségű spermaadagok hatását is a termékenyítésre. A tesztek alapján nem volt különbség az elért termékenyítési-, és kelési eredményekben a petefészek lebenybe juttatott 0,5 ml, 1 ml és 2 ml sperma / testtömeg kg kezelések között. Afrikai harcsa és dél-amerikai ezüstharcsa fajokban porított ponty hipofízist elkevertünk frissen fejt spermával és ezt a keveréket injektáltuk az ikrások petefészek lebenyeibe. Mindkét fajban a szeminalis plazma felszívódásával a GtH hormonok is átjutott a petefészek szisztémás keringésébe és 10-11 óra alatt indukálta az oociták végső beérését. Ezalatt a spermiumok sem károsodtak és a vízaktivációt követően nagy hatékonysággal megtermékenyítették az ovulált ikraszemeket (termékenyülési arány: 41-94%). Ezzel a módszerrel a hormonkezelést és a sperma bejuttatást egy időben és egy kezeléssel meg lehet oldani. Zebradánió fajban hormonkezelés nélkül, kizárólag sperma injektálást követő fényprogram alkalmazásával, sikerült spontán ikraszórásra bírni az ikrásokat (parciális ovuláció következett be, azaz a hagyományos ívatáshoz képest 60-75%-al kevesebb ikra ovulált), de tejesek jelenléte nélkül. Az ikrákból sikerrel lehetett lárvákat keltetni. Kísérleti eredményeink egy alapvető halszaporítási tétel átgondolását teszik szükségessé, nevezetesen azt, hogy a valódi külső megtermékenyítésű halfajok esetében indukált íváskor vagy ívatáskor mindkét nem jelenlétére szükség van utódok létrehozására. Kísérleteink eredményei alapján az ikrások petefészkébe injektált és ott tárolt sperma feltétlenül szükséges, de ezzel egyidejűleg az ívó tejes jelenléte már nem feltétele a sikeres utódlétrehozásnak, amennyiben (akár részleges, vagy teljes) ovulációra lehet bírni az ikrásokat. Egy másik kísérletsorozatban zebradánió modell halfaj két változatával dolgoztunk; egy vad (AB), és egy transzgénikus vonallal (Tg shha:GFP), amelyek utódai mikroszkóp segítségével jól elkülöníthetőek egymástól. A programozott (fényritmussal szabályozott) ívás előtt transzgénikus tejesekből származó spermaadagokat juttattunk fel automata pipetta és üveg kapilláris segítségével az előzőleg bódított vad ikrások genitális nyílásába, a sperma eloszlás így véletlenszerű volt. Ezt követően a transzgénikus spermával kezelt vad ikrásokat vad

tejesekkel ívató kádba helyeztük vissza. A sikeresen ívó pároknál az utódellenőrzés eredménye alapján a termékenyült ikraszemek közül a transzgenikus spermából származó lárvák aránya ikrásonként $0_{(n=5)}$ - $81,3\%_{(n=20)}$ között mozgott, az átlag: 36,1% volt. Kísérleteink alapján a genetikai változatosság növelhető a sperma petefészkekbe való bejuttatásával (indukált) ívatásos szaporítás esetében, az utódok létrehozásában ugyanis bizonyítottan részt vett az ívó tejesen kívül az injektált sperma is. A módszert azonban még optimalizálni szükséges (irányított spermafeljuttatás csak az egyik petefészkek lebenybe, sperma: ikra arány beállítása stb.). Azt is vizsgáltuk, hogy lehetséges-e a mélyhűtött sperma felhasználása sperma injektálásos módszer esetén. Afrikai harcsa spermát fagyasztottunk le egy korábban általunk leírt protokoll alapján, majd a felolvasztást a mintákat centrifugáltuk, hogy a szemínális plazmában lévő hígítót és metanol védőanyagot (ami normál légköri hőmérsékleten toxikus) eltávolítsuk a centrifugált spermiumok felszínéről. A spermiumokat ezt követően natív pontyspermából származó szemínális folyadékkal töltöttük fel. Az így nyert elegyet (afrikai harcsa sperma + ponty szemínális folyadék) injektáltuk afrikai harcsa ikrásokba hormonkezelésükkel egyidejűleg (intramuszkuláris kezelés – ponty hipofízis kivonat). Tízórás beérési időt követően az ikrásokat lefejtük és termékenyítési tesztekkel végeztünk. A spermainjektált halak mindegyikében sikerült termékenyülést kimutatni, a kelési százalék (18%) azonban elmaradt a kontroll csoport értékeitől (61%). Ez a modellkísérlet azonban alapul szolgálhat ahhoz, hogy ívatásos módszer esetén is alkalmazni lehessen a mélyhűtött spermát külső megtermékenyítésű halakban.

A keltetőházi szaporítás során a szaporítás előtt felkészített anyahalak programozott, időzített ovulációját különféle tartási és hormonindukációs eljárásokkal indukálják. Ezzel szemben az angolna szaporítási technika két fiziológiai folyamat mesterséges úton történő ösztönzésén alapul. Egyfelől az ivarilag éretlen halak ivarszerveit készítetik fejlődésre hormon és hormonhatású anyagok hosszan tartó kezelésével (heti ismétléssel 2-5 hónapon keresztül), majd az ívás előtt álló halban hormonprofil váltással ovulációt indukálnak. Európai angolnában azonban eddig még nem számoltak be a szaporítást követő sikeres lárwanevelésről. Ebből a szempontból a génmegőrzés egyik lehetséges módja az ivarérlelt tejes válogatott ivartermékének mélyhűtése. Angolna spermamélyhűtési munkák kísérleteink előtt csak a sperma minőség ellenőrzésére korlátozódtak, mert sikeres termékenyítési kísérleteket nem hajtottak végre. Európai angolna (*A. anguilla*) édesvízben ivarérlelt tejeseiből (250 NE hCG / testtömeg kg / hét) gyűjtött spermamintákat mélyhűtöttünk, majd az 5 évig tárolt mintákat Japánba szállítottuk. Ott a japán angolna (*A. japonica*) ikrások indukált ivarérlelése során nyert ikratételeket termékenyítettük a felolvasztott spermával. Először sikerült európai angolna mélyhűtött spermát felhasználva sikeres termékenyítést végrehajtani és hibridet keltetni. A két faj közötti hibrid és a „kontroll” japán angolna embriógenézisének jellegében és ütemében nem találtunk különbséget. A hibridizáció tényét genetikai analízissel is alátámasztottuk (PCR-RFLP, PCR-HRM).

6. Summary

In my dissertation I present my results on the development of alternative technologies for the induced reproduction of fish species with application opportunities in aquaculture and environmental protection. In the first part, I describe the results of my research group with developing a new fish propagation method by sperm insemination. During natural spawning upon ovulation, gametes are released together into the water, which is critically required for activation and fertilization. Our new propagation method is based on our observation that the ovarian environment of externally fertilized fish species maintains the biological activity of spermatozoa for extended period of time before induction of spawning. In this chapter, I describe the technical and biological characteristics of the method and its advantages in applications through a series of experiments in economically important species including common carp, African catfish, South-American silver catfish and a laboratory model fish species, zebrafish). The protocol of sperm insemination into ovarian lobes is technically simple: the previously collected and quality-controlled mono or mixed sperm samples from several males were injected into ovarian lobes of anaesthetized females, which is prepared for spawning by using catheter or probe. The catheter is easily controlled by the operator, allows administration of sperm directly targeting the right or left ovarian lobes through the fallopian tubes. In small sized fish species such as zebrafish sperm insemination can also be performed with an automatic pipette or capillary.

Based on experiments on the African catfish species, ovary condition maintains the fertilization capability of inseminated spermatozoa 5-36 hours before ovulation. After 48-hour storage of spermatozoa the fertility of fertile eggs that hatch was failed. In Carp and South-American silver catfish species, sperm insemination parallel with resolving hormonal injection according to hatchery practice (10–12 h before ovulation) successfully fertilized the eggs. In African catfish, we examined the effect of different volumes of sperm inseminated into the ovaries on fertilization. Based on the experimental results, there was no difference in the fertilization and hatching between the 2 ml, 1 ml and 0.5 ml inseminated sperm / kg body weight treatments. Powdered Carp pituitary extract was mixed with freshly collected sperm and this mixture was inseminated into the ovaries of African catfish and *R. quelen* species. In both species, the GtH hormones with seminal plasma were absorbed through the ovarian wall and entered into the systemic blood circulation of the ovary and induced the final maturation of oocytes in 10–11 h. The spermatozoa were not damaged in ovarian storage time and after water activation they were able to fertilize the ovulated eggs with high efficiency (fertilization rate: 41-94%). In this way hormone treatment and sperm insemination can be solved at the same time with one treatment. In Zebrafish species, it could be spawned without hormone treatment and existence of male by using insemination. There was some spontaneous egg releasing (partial ovulation) without hormonal treatment and presence of males, furthermore the ovulated egg number was 60-75% less than traditional spawning method. Larvae would be successfully hatched from eggs. Our experimental results necessitate a rethinking of a basic fish breeding dogma, namely that offspring production is need both sexes in same time in the case of (induced) spawning of real externally fertilized fish species. In our experiments, the presence of injected spermatozoa and stored in the ovaries is absolutely necessary, but the simultaneous presence of spawning male is no longer a condition for successful offspring if the eggs can be ovulated (either partially or completely).

In other experimental series two Zebrafish lines were used; one AB line and transgenic one (Tg shha:GFP) because their offspring can be well distinguished from each other by using microscope. Wild type females were injected with reporter transgenic sperm from homozygous transgenic males by using automatic pipette and glass capillary before intended spawning

(controlled by light rhythm) with wild type males in spawning tank. The inseminated sperm distribution was random and not directed.

In 25 successful spawning experiments, 20 females produced mixed genotype offspring comprising both transgenic and wild type larvae in varying ratios ($0_{(n=5)}$ -81,3% $_{(n=20)}$, average 36.1%), indicating that the injected transgenic sperm efficiently competed with sperm released by non-transgenic wild type mating males, and both sperm types contributed to the fertilisation of the released eggs. According to our results the genetical background of offsprings could be increased in case of (induced) spawning method. Offspring originated from insemination and spawned males as well. Further investigations are needed to optimize the method (controlled sperm injection into only one ovarian lobe, sperm:egg ratio settings, etc.). Other aim was to investigate the possibility of using cryopreserved sperm in inseminated method. Collected sperm from African catfish were cryopreserved by using described protocol. After thawing, the samples were centrifugated and seminal plasma, extender and methanol as external cryoprotectant, which is toxic in room temperature, were removed from the concentrated spermatozoa. The pellet was then resuspended in common Carp seminal plasma to reconstitute the lost volume. Sperm samples (African catfish spermatozoa with Carp seminal plasma) were then injected by a catheter into the ovarian cavity through the oviduct of the experimental females in parallel with the intramuscular hormonal administration (Carp pituitary extract). Inseminated females were monitored for 10 hours and ovulated eggs and spermatozoa stored in the ovary were stripped. Stripped gamete samples were divided into two batches: (1) the first batch contained only the previously injected spermatozoa and was activated by aerated tap water (WA) immediately after stripping; (2) in case of the second batch additional, freshly stripped sperm was added as positive control to the stripped eggs before water activation (PC). Furthermore, five females were propagated by using the dry fertilization method (in vitro fertilization) as negative control (NC).

All sperm and hormone injected females produced fertilised eggs with a hatching rate of $17.7\pm 13.2\%$, $12.5\pm 9.3\%$, and $61\pm 11.5\%$ for WA, PC and NC respectively. Thus, we describe a proof of principle for a practical protocol for the induced/wild/tank spawning of an externally fertilizing fish species with economic importance and propose that the protocol could be also applied to endangered marine or fresh fish species.

During large scale hatchery propagation, the ready to spawn broodstock can be induced to ovulation by using by various rearing condition/hormone administration preparation. In contrast to the other fish species, where only the final part of is needed hormonal stimulation in case of eel the whole gametogenesis has to be induced. It can be divided into two parts. In the first part of the whole gametogenesis has to be induced by using long hormonal administration (repeated hormone injection for 2-5 months). After that in ready to spawn phase of females there is a hormone administration changes in order to induce ovulation. There has been no report about successful eel larvae rearing after artificial propagation in Europe yet. In this aspect the usage of cryopreserved sperm is one of the possible ways of gene preservation. Eel sperm cryopreservation work prior to our experiments was limited to sperm quality control only because successful fertilization experiments were not performed. Sperm were collected from artificially matured males (250 IU hCG / bodyweight kg / week) reared and matured in freshwater condition. The samples were stored for 5 years and transported in Japan. Eggs of Japanese eel (*Anguilla anguilla*) were fertilized with these cryopreserved sperm samples. This was the first time to use successfully cryopreserved European eel sperm for fertilization and hatch viable hybrids. Differences between the embryogenesis of the Japanese eel and its hybrid were not found. The novel genetic marker can provide a clear result in hybridization (PCR-RFLP, PCR-HRM).

7. 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, Ivánovics, B., V., 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, 153-158.

8. Irodalomjegyzék

- Abe, T., Munehara, H., 2005. Spawning and maternal-care behaviours of a copulating sculpin, *Radulinopsis taranetzi*. *J. Fish Biol.* 67, 201–212.
- Ács, B., Specziár, A., Boczonádi, Z., Urbányi, B., Müller, T., 2013. Az angolna (*Anguilla anguilla* L.) táplálkozása a Balaton parti övében. *Pisces Hungarici* 7, 65–11.
- Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 212–221.
- Al Adawiyah, L., Sulmartiwi, L., Bodur, T., Budi, D.S., 2019. Induction of spermiation using Ovaprim™ with topical gill method in the silver rasbora (*Rasbora argyrotaenia*). *Theriogenology* 126, 172–176.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes.(II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* 30, 1–14.
- Amin, E., 1997. Observations on reproduction techniques applicable to the European eel (*Anguilla anguilla* L.), in: Bartley, D., Basurco, B. (Eds.), *Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species*. 34 Ciheam-Iamz, Zaragoza, pp. 223–234.
- Anonymus, 1983. Az angolna ivarérelésének mesterséges szabályozása. *Halászat* 76, 61.
- Antalfi, A., Tölg, I., 1966. Pontyszaporítás 1966-ban. *Halászat* 12/59, 112–113.
- Asturiano, J.F., Cabrita, E., Horváth, Á., 2017. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 245, 69–76.
- Asturiano, J.F., Marco-Jiménez, F., Olivares, L., Vicente, J.S., Jover, M., 2003. Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 501–502.
- Asturiano, J.F., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D.S., Garzón, D.L., Pérez, L., Vicente, J.S., Jover, M., 2007. Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 162–166.
- Asturiano, J.F., Pérez, L., Garzón, D.L., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Jover, M., 2004. Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiol. Biochem.* 30, 283–293.
- Asturiano, J.F., Sørensen, S.R., Pérez, L., Lauesen, P., Tomkiewicz, J., 2016. First production of larvae using cryopreserved sperm: Effects of preservation temperature and cryopreservation on european eel sperm fertilization capacity. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 485–491.
- Beardmore, J.A., 1983. Extinction, survival and genetic variation, in: Schonewald-Cox, C.M., Chambers, S.M., MacBryde, B., Thomas, W.L. (Eds.), *Genetic and Conservation. A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, pp. 125–151.
- Belpaire, C.G.J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., De Boer, J., 2009. Decreasing eel stocks: survival of the fattest? *Ecol. Freshw. Fish.* 18, 197–214.
- Bezdenzhnykh, V.A., Prokhorchik, G.A., 1984. Period of oocyte maturation and assessment of egg quality of eel, *Anguilla anguilla* (Anguillidae), under stimulation of maturation with gonadotropic hormones. *Vopr. Ikhtiologii* 5, 814–821.

- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M., 1995. Sperm physiology and quality, in: Bromage, N., Roberts, R. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell, Oxford, pp. 25–52.
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 65–79.
- Bleniarz, K., Epler, P., 1977. Investigations on inducing sexual maturity in the male eel *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Biol.* 10, 555–559. Blin, N., Stafford, D.W., 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3, 2303–2308.
- Bodur, T., Szabó, T., Sevgili, H., Aydın, İ., Kurtoğlu, A., E, İ.B., Kanyılmaz, M., Kocakaya, S., Gökçek, K., Urbányi, B., Müller, T., 2019. Tengeri süllő (*Dicentrarchus labrax*) szaporítási kísérletek Törökországban, in: *Halászati Tudományos Tanácskozás, XLIII.* pp. 56–57.
- Boëtius, I., Boëtius, J., 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1, 1–28.
- Burgerhout, E., Brittijn, S.A., Kurwie, T., Decker, P., Dirks, R.P., Palstra, A.P., Spaink, H.P., Van Den Thillart, G.E., 2011. First artificial hybrid of the eel species *Anguilla australis* and *Anguilla anguilla*. *BMC Dev. Biol.* 11, 16. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-16>
- Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J.C., Sarasquete, C., Herráez, M.P., 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macro tubes. *Cryobiology* 50, 273–284.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M.P., 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 623–635.
- Cao, L., Naylor, R., Henriksson, P., Leadbitter, D., Metian, M., Troell, M., Zhang, W., 2015. China's aquaculture and the world's wild fisheries. *Science* 347, 133–135.
- Carolsfeld, J., Sherwood, N.M., Kreiberg, H., Sower, S.A., 1988. Induced sexual maturation of herring using GnRH “quick-release” cholesterol pellets. *Aquaculture* 70, 169–181.
- Colombo, G., Grandi, G., 1995. Sex differentiation in the European eel: histological analysis of the effects of sex steroids on the gonad. *J. Fish Biol.* 47, 394–413.
- Colombo, G., Grandi, G., Romeo, A., Giovannini, G., Pelizzola, D., Catozzi, L., Piffanelli, A., 1987. Testis cytological structure, plasma sex steroids, and gonad cytosol free steroid receptors of heterologous gonadotropin (hCG)-stimulated silver eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, 167–178.
- Colombo, G., Grandi, G., 1996. Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *J. Fish Biol.* 48, 493–512.
- Correia, M.J., Costa, J.L., Antunes, C., De Leo, G., Domingos, I., 2018. The decline in recruitment of the European eel: new insights from a 40-year-long time-series in the Minho estuary (Portugal). *ICES J. Mar. Sci.* 75, 1975–1983.
- Cosson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac. Int.* 12, 69–85.
- Csaba, G., Láng, M., Sályi, G., Ramotsa, J., Glávits, R., Rátz, F., 1993. Az *Anguillicola crassus* (*Nematoda, Anguillicolidae*) fonálféreg és szerepe az 1991. évi balatoni angolnapusztulásban. *Magy. Állatorv. Lapja* 48, 11–21.

- Dekker, W., 2000. A Procrustean assessment of the European eel stock. *ICES J. Mar. Sci.* 57, 938–947.
- Demska-Zakes, K., Zakes, Z., 2002. Controlled spawning of pikeperch, *Stizostedion lucioperca*, in lake cages. *Czech J. Anim. Sci.* 47, 230–238.
- Di Biase, A., Casalini, A., Emmanuele, P., Mandelli, M., Lokman, P.M., Mordenti, O., 2016. Controlled reproduction in *Anguilla anguilla* (L.): comparison between spontaneous spawning and stripping-insemination approaches. *Aquacult. Res.* 47, 3052–3060.
- Dollerup, J., Graver, C., 1985. Repeated induction of testicular maturation and spermiation, alternating with periods of feeding and growth in silver eels, *Anguilla anguilla* (L.). *Dana* 4, 19–39.
- Dooldeniya, M.D., Warrens, A.N., 2003. Xenotransplantation: where are we today? *J. R. Soc. Med.* 96, 111–117.
- Dufour, S., Lopez, E., Le Menn, F., Le Belle, N., Baloché, S., Fontaine, Y.A., 1988. Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70, 20–30.
- Durif, C.M., Van Ginneken, V.J.T., Dufour, S., Müller, T., Elie, P., 2009. Seasonal evolution and individual differences in silvering eels from different locations, in: Van den Thillart, G., Dufour, S., Rankin, J.C. (Eds.), *Spawning Migration of the European Eel*. Springer, Dordrecht, pp. 13–38.
- Dzyuba, V., Shelton, W.L., Kholodnyy, V., Boryshpolets, S., Cosson, J., Dzyuba, B., 2019. Fish sperm biology in relation to urogenital system structure. *Theriogenology* 132, 153–163.
- Eaton, R.C., Farley, R.D., 1974. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia* 195–204.
- El-Shehabi, F., Marcogliese, D.J., Oliveira, K., 2018. New North American paratenic hosts of *Anguillicola crassus* and molecularly-inferred source of invasion. *Aquat. Invasions* 13, 231–246.
- Elofsson, H., Van Look, K.J., Sundell, K., Sundh, H., Borg, B., 2006. Stickleback sperm saved by salt in ovarian fluid. *J. Exp. Biol.* 209, 4230–4237.
- Ertzer, R., Müller, F., Hadzhiev, Y., Rathnam, S., Fischer, N., Rastegar, S., Strähle, U., 2007. Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression. *Dev. Biol.* 301, 578–589.
- FAO, 2021. Fisheries & Aquaculture - Cultured Aquatic Species Information Programme - *Anarhichas minor* (Olafsen, 1772). FAO, Rome.
- Fernández, J., Caballero, A., 2001. comparison of management strategies for conservation with regard to population fitness. *Conserv. Genet.* 2, 121–131.
- Fishelson, L., Baldwin, C.C., Hastings, P.A., 2013. Gonad morphology, gametogenesis, and reproductive modes in fishes of the tribe Starksini (*Teleostei*, *Blenniiformes*). *J. Morphol.* 274, 496–511.
- Fitzpatrick, J.L., 2020. Sperm competition and fertilization mode in fishes. *Philos. Trans. R. Soc. B* 375, 20200074.
- Fontaine, M., 1964. Sur la maturation des organes genitaux de l'Anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. *C. R. Acad. Sci.* 259, 2907–

2910.

- Freyhof, J., Brooks, E., 2011. European red list of freshwater fishes. HIÁNYOS!!
- Fricke, H., Kaese, R., 1995. Tracking of artificially matured eels (*Anguilla anguilla*) in the Sargasso Sea and the problem of the eel's spawning site. *Naturwissenschaften* 82, 32–36.
- Fuller, M.R., Doyle, M.W., 2018. Gene flow simulations demonstrate resistance of long-lived species to genetic erosion from habitat fragmentation. *Conserv. Genet.* 19, 1439–1448.
- Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Pérez, L., Marco-Jiménez, F., Espert, X., Müller, T., Jover, M., Asturiano, J.F., 2008. Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on the cryopreservation of European eel sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 99–105.
- Gothilf, Y., Zohar, Y., 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. *Reprod. Physiol. fish. Fish Symp.* 91, 35–37.
- Hajirezaee, S., Jafaryan, H., Nazeri, S., Ranjbar, K.S., Khara, H., Golpour, A., 2013. Relationships between sex steroids of the seminal fluid and milt quality parameters of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897. *Comp. Clin. Path.* 22, 101–105.
- Hajirezaee, S., Rastinasab, A., Khara, H., Hosseini, A.R., Golpour, A., 2012. Determination of Sex Hormones Levels in the Seminal Plasma of Persian Sturgeon, *Acipenser Persicus*. *J. Appl. Biol. Sci.* 6, 41–43.
- Harper, C., Lawrence, C., 2016. The laboratory zebrafish. CRC Press, Boca Raton.
- Harvey, B., Carolsfeld, J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. International Development Research Centre, Ottawa, Ontario, Canada.
- Herman, O., 1887. A magyar halászat könyve, in: Királyi Magyar Természettudományi Társulat. Budapest.
- Herranz-Jusdado, J.G., Gallego, V., Morini, M., Rozenfeld, C., Pérez, L., Müller, T., Horváth, A., Ohtac, H., Asturiano, J.F., 2019a. Eel sperm cryopreservation: An overview. *Theriogenology* 133, 210–215.
- Herranz-Jusdado, J.G., Gallego, V., Rozenfeld, C., Morini, M., Pérez, L., Asturiano, J.F., 2019b. European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes. *Aquaculture* 506, 42–50.
- Herranz-Jusdado, J.G., Kása, E., Kollár, T., Gallego, V., Peñaranda, D. S Rozenfeld, C., Pérez, L., Horváth, Á., Asturiano, J.F., 2018. Handling and treatment of male European eels (*Anguilla anguilla*) for hormonal maturation and sperm cryopreservation. *J. Vis. Exp.* 131, e56835.
- Hill, J.E., Baldwin, J.D., Graves, J.S., Leonard, R., Powell, J.F.F., Watson, C.A., 2005. Preliminary Observations of Topical Gill Application of Reproductive Hormones for Induced Spawning of a Tropical Ornamental Fish. *N. Am. J. Aquac.* 67, 7–9. <https://doi.org/10.1577/fa04-015.1>.
- Hirano, T., Morisawa, M., Suzuki, K., 1978. Changes in plasma and coelomic fluid composition of the mature salmon (*Oncorhynchus keta*) during freshwater adaptation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 61, 5–8.
- Hirose, K., Kagawa, H., Yoshida, M., Kumakura, M., Yamanaka, H., 1990. Application of LHRH copolymer pellet for induction of final oocyte maturation and ovulation in ayu

- Plecoglossus altivelis. Bull. Japanese Soc. Sci. Fish 56, 1731–1734.
- Horváth, Á., 2019. The role of sperm cryopreservation in the conservation of genetic reserves of some nature conservation and economically important fish species. Szent István University.
- Horváth, Á., Páramo, S.M., Kovács, Á.I., Urbányi, B., Paz, H. 2010. Effect of ovarian fluid on the motility of fresh and cryopreserved sperm of the common carp (*Cyprinus carpio* 370 Linnaeus). *Állattani Közlemények* 95(1), 25–33 (in Hungarian with English abstract).
- Horváth, L., 1980. A ponty [*Cyprinus carpio* L.] petefejlődésének elemzése és szabályozása. Haltenyésztési Kutató Intézet, Szarvas.
- Horváth, L., Magyary, I., 2007. A haszonhalak szaporítása, in: Hancz, C. (Ed.), Haltenyésztés. egyetemi jegyzet, Kaposvár, pp. 80–113.
- Horváth, L., Szabó, T., Burke, J., 1997. Hatchery testing of GnRH analogue-containing pellets on ovulation in four cyprinid species. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 44, 221–226.
- Horváth, L., Szabó, T., Urbányi, B., 2000. Általános szaporodásbiológia, in: Horváth, László, (Ed.), Halbiológia és Haltenyésztés (Egyetemi Tankönyv). pp. 197–211.
- Horváth, L., Székely, C., Boczonádi, Z., Mészáros, E., Bercsényi, M., Urbányi, B., Müller, T., 2011. Induced oogenesis of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in freshwater condition. *Acta Biol. Hung.* 62, 485–488. <https://doi.org/10.1556/ABiol.62.2011.4.13>
- Horváth, L., Tamás, G., Coche, A.G., 1985. Common carp, part 1: mass production of eggs and early fry, FAO Training Series No. 8.
- Horváth, L., Tamás, G., Coche, A.G., Kovács, E., Moth-Poulsen, T., Woynarovich, A., 2015. Training manual on the advanced fry and fingerling production of carps in ponds. FAO.
- Horváth, L., Tamás, G., Tölg, I., 1984. Special method in pond fish husbandry. Halver Corporation, Budapest, Akadémia Kiadó.
- Horváth, L., Urbányi, B., 2000. A haltenyésztés története, hazai történet, in: Horváth, L. (Ed.), Halbiológia És Haltenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 218–222.
- IBM Corp, 2013. IBM SPSS Statistics for Windows.
- ICES, 2017. Report of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels. ICES CM 2017/ACOM: 15. Kavala, Greece.
- Ijiri, S., Kazeto, Y., Takeda, N., Chiba, H., Adachi, S., Yamauchi, K., 1995. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 135, 3–16. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)81292-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(96)81292-0)
- Ijiri, S., Tsukamoto, K., Chow, S., Kurogi, H., Adachi, S., Tanaka, H., 2011. Controlled reproduction in the Japanese eel (*Anguilla japonica*), past and present. *Aquac. Eur.* 36, 13–17.
- Ittész, I., 2018. Egy a haltenyésztés számára ígéretes halfaj, a jundiá (*Rhamdia quelen*) szaporodásbiológiai jellemzői. Szent István Egyetem.
- 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. *Aquac. Reports* 16, 100275. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100275>

- Jaczó, I., 1955. A pontyok hipofizálása. Halászat 2, 126–127.
- Jaczó, I., 1954a. Hipofizáljuk a halakat? Halászat 1, 7.
- Jaczó, I., 1954b. Miért hipofizáljuk a halakat? Halászat 1, 12.
- Jaczó, I., 1953. Kísérletek a kecsge mesterséges szaporítására a Dunán. Hidrológiai közlöny 3, 149–152.
- Jamalzadeh, H.R., Akhundian, M., Kabir, M., Khara, H., Hajirezaee, S., 2014. Sex steroids in the seminal fluid and milt quality indices in the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*. Aquac. Res. 45, 1090–1095.
- Jéhannet, P., Heinsbroek, L.T., Palstra, A.P., 2017. Ultrasonography to assist with timing of spawning in European eel. Theriogenology 101, 73–80.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K., Hirose, K., 1995. In vitro effects of 17 α -hydroxyprogesterone and 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci. 61, 1012–1015.
- Kazeto, Y., Ozaki, Y., Ito, R., Suzuki, H., Tanaka, T., Imaizumi, H., Nomura, K., Okuzawa, K., Gen, K., 2014. Mass production of recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: their differential actions on gametogenesis in vivo, in: International Conference on Frontiers in Comparative Endocrinology and Neurobiology 2014. IC-FCEN 2014, University of Hyderabad, India, p. 17.
- Khan, I.A., Lopez, E., Leloup-Hâtey, J., 1987. Induction of spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L.). Gen. Comp. Endocrinol. 68, 91–103.
- Kholodnyy, V., Gadêlha, H., Cosson, J., Boryshpolets, S., 2020. How do freshwater fish sperm find the egg? The physicochemical factors guiding the gamete encounters of externally fertilizing freshwater fish. Rev. Aquac. 12, 1165–1192.
- Kime, D.E., Tveiten, H., 2002. Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. J. Fish Biol. 61, 1549–1559.
- Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F., 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 130, 425–433.
- Knights, B., 2003. A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. Sci. Total Environ. 310, 237–244.
- Koh, I.C.C., Hamada, D., Tsuji, Y., Okuda, D., Nomura, K., Tanaka, H., Ohta, H., 2017. Sperm cryopreservation of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 473, 487–492.
- Kolešová, S.A., Kotas, P., Štěrbá, J., Rodina, M., Dzyuba, B., Cosson, J., Linhart, O., 2016. Protein profile of seminal plasma and functionality of spermatozoa during the reproductive season in the common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Reprod. Dev. 83, 968–982.
- Kolics, B., Kovács, B., Taller, J., Várkonyi, L., Horváth, L., Kucharczyk, D., Müller, T., 2015. Európai angolna ivadékanak fajmeghatározása PCR–RFLP-módszerrel. Magyar Állatorvosok Lapja 137, 385–448.
- Kookaram, K., Amiri, B.M., Dorkoosh, F.A., Nematollahi, M.A., Mortazavian, E., Lmdoust,

- A.A., 2021. Effect of oral administration of GnRHa+nanoparticles of chitosan in oogenesis acceleration of goldfish *Carassius auratus*. *Fish Physiol. Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00926-9>
- Kovács, É., Müller, T., Márián, T., Krasznai, Z., Urbányi, B., Horváth, Á., 2010. Quality of cryopreserved African catfish sperm following post-thaw storage. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 737–741.
- Kowalski, R.K., Cejko, B.I., Irnazarow, I., Szczepkowski, M., Dobosz, S., Glogowski, J., 2014. Short-term storage of diluted fish sperm in air versus oxygen. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 14, 831–834.
- Koya, Y., Munehara, H., Takano, K., Takahashi, H., 1993. Effects of extracellular environments on the motility of spermatozoa in several marine sculpins with internal gametic association. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 106, 25–29.
- Kurokawa, T., Okamoto, T., Gen, K., Uji, S., Murashita, K., Unuma, T., Nomura, K., Matsubara, H., Kim, S.-K., Ohta, H., Tanaka, H., 2008. Influence of water temperature on morphological deformities in cultured larvae of Japanese eel, *Anguilla japonica*, at completion of yolk resorption. *J. World Aquac. Soc.* 39, 726–735.
- Labbé, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maise, G., 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev. Inc. Gamete Res.* 60, 397–404.
- Lahnsteiner, F., 2011. Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions. *Aquaculture* 314, 221–224.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1997. Structure and function of the ovarian cavity and oviduct and composition of the ovarian fluid in the bleak, *Alburnus alburnus* (*Teleostei, Cyprinidae*). *Tissue Cell* 29, 305–314.
- Lajkó, I., Tasnádi, R., 2001. A tógazdasági haltenyésztés. Agroiinform Kiadó és nyomda, Budapest.
- Lam, T.J., 1982. Applications of Endocrinology to Fish Culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 111–137.
- Lam, T.J., Pandey, S., Nagahama, Y., Hoar, S., 1978. Endocrine control of oogenesis, ovulation and oviposition in goldfish, in: Gaillard, P.J., Boer, H.H. (Eds.), *Comparative Endocrinology*. Elsevier/North Holland Medical Press, Amsterdam, pp. 55–64.
- Lecomte-Finiger, R., 1994. The early life of the European eel. *Nature* 370, 424–424.
- Lee, C.S., Tamaru, C.S., Banno, J.E., Kelley, C.D., Bocek, A., Wyban, J.A., 1986a. Induced maturation and spawning of milkfish, *Chanos chanos* Forssakal, by hormone implantation. *Aquaculture* 52, 199–205.
- Lee, C.S., Tamaru, C.S., Kelley, C.D., 1986b. Technique for making chronic-release LHRH-a and 17 α -methyltestosterone pellets for intramuscular implantation in fishes. *Aquaculture*.
- Lin, H.R., Zhang, M.L., Zhang, S.M., Van Der Kraak, G., Peter, R.E., 1991. Stimulation of pituitary gonadotropin and ovarian development by chronic administration of testosterone in female Japanese silver eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 96, 87–95.
- 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.

- Lobón-Cervía, J., 1999. The decline of eel *Anguilla anguilla* (L.) in a river catchment of northern Spain 1986-1997. Further evidence for a critical status of eel in Iberian waters. *Arch. fur Hydrobiol.* 144, 245–253.
- Lokman, P.M., Young, G., 2000. Induced spawning and early ontogeny of New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. Australis*). *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 34, 135–145.
- Lund, I., Reis, D.B., Tomkiewicz, J., Benini, E., Pérez, J.A., Kottmann, J.S., Politis, S.N., Rodríguez, C., 2021. Assessment of lipid uptake and fatty acid metabolism of European eel larvae (*Anguilla anguilla*) determined by ¹⁴C in vivo incubation. *Aquaculture* 531, 735858.
- Marco-Jiménez, F., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Pérez, L., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S., Jover, M., Asturiano, J.F., 2006a. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. *Cryobiology* 53, 51–57.
- Marco-Jiménez, F., Pérez, L., De Castro, M. V, Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Jover, M., Asturiano, J.F., 2006b. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology* 65, 1302–1310.
- Marohn, L., Hanel, R., 2016. Untersuchungen zur Aalvermehrung am Thüenen. Institut. Fischer Teichwirt 67, 444–445.
- Marte, C.L., Sherwood, N.M., Crim, L.W., Harvey, B., 1987. Induced Spawning of Maturing Milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) with Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Analogues Administered in Various Ways *. *Aquaculture* 60, 303–310.
- Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R., Cabrita, E., 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture* 472, 156–177.
- Matejkova, J., Podhorec, P., 2019. Sustained drug delivery system in fish and the potential for use of PLGA microparticles: A review. *Vet. Med. (Praha)*. 64, 287–293.
- Matsubara, H., Nomura, K., Murashita, K., Kurokawa, T., Kobayashi, T., Tanaka, H., 2010. Can the hybrid between Japanese eel and European eel grow. *News. Japan Soc. Comp. Endocrinol.* 36, 133–139.
- Mikolajczyk, T., Roelants, I., Epler, P., Ollevier, F., Chyb, J., Breton, B., 2002. Modified absorption of s GnRHa following rectal and oral delivery to common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 203, 375–388.
- Miyai, T., Aoyama, J., Sasai, S., Inoue, J.G., Miller, M.J., Tsukamoto, K., 2004. Ecological aspects of the downstream migration of introduced European eels in the Uono River, Japan. *Environ. Biol. Fishes* 71, 105–114.
- Molnár, K., 2002. Differences between the European carp (*Cyprinus carpio carpio*) and the coloured carp (*Cyprinus carpio haematopterus*) in susceptibility to *Thelohanellus nikolskii* (Myxosporea) infection. *Acta Vet. Hung.* 50, 51–57.
- Molnár, K., 1993. Effect of decreased oxygen content on eels (*Anguilla anguilla*) Infected by *Anguillicola crassus* (Nematoda: *Dracunculoidea*). *Acta. Vet. Hung* 41, 349–360.
- Molnár, K., Baska, F., Csaba, G., Glávits, R., Székely, C., 1993. Pathological and histopathological studies of the swimbladder of eels (*Anguilla anguilla*) infected by

- Anguillicola crassus* (*Nematoda:Dracunculoidea*). Dis. Aquat. Organ. 15, 41–50.
- Molnár, K., Moravec, F., 1994. 3rd-stage larvae of *Danicinema Anguillae* (*Nematoda, Dracunculoidea*) in the subcutaneous tissue of eel *Anguilla anguilla*. Folia Parasitol. (Praha). 41, 215–219.
- Molnár, K., Székely, C., Baska, F., 1991. Mass mortality of eel in Lake Balaton due to *Anguillicola crassus* infection. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 11, 211–212.
- Molnár, K., Székely, C., Perényi, M., 1994. Dynamics of *Anguillicola crassus* (*Nematoda, Dracunculoidea*) infection in eels of Lake Balaton, Hungary. Folia Parasitol. (Praha). 41, 193–202.
- Mordenti, O., Biase, A.D., Bastone, G., Sirri, R., Zaccaroni, A., Parmeggiani, A., 2013. Controlled reproduction in the wild European eel (*Anguilla anguilla*): Two populations compared. Aquacult. Int. 21, 1045–1063.
- Mordenti, O., Casalini, A., Mandelli, M., Di Biase, A., 2014a. A closed recirculating aquaculture system for artificial seed production of the European eel (*Anguilla anguilla*): Technology development for spontaneous spawning and eggs incubation. Aquac. Eng. 58, 88–94.
- Mordenti, O., Casalini, A., Mandelli, M., Di Biase, A., 2014b. A closed recirculating aquaculture system for artificial seed production of the European eel (*Anguilla anguilla*): Technology development for spontaneous spawning and eggs incubation. Aquac. Eng. 58, 88–94.
- Muchlisin, Z.A., 2014. A general overview on some aspects of fish reproduction. Aceh Int. J. Sci. Technol. 3, 43–52.
- Müller, T., 2014a. Kísérlet a váradi maradványcsiga (*Melanopsis parreysi*) és a Racovitza-kele (*Scardinius racovitzai*) megmentésére. Halászat 107, 12–13.
- Müller, T., 2014b. Veszélyeztetett lápi halak megóvása (lápi póc, réticsík, széles kárász). Vármédia Print Kft, Gödöllő.
- Müller, T., Ács, E., Beliczky, G., Makk, J., Földi, A., Kucska, B., Horváth, L., Ittész, A., Hegyi, A., Szabó, T., Urbányi, B., Quyen, N.N., Orbán, L., Havasi, M., 2020a. New observations about the fertilisation capacity and latency time of sperm inseminated into the ovary of African catfish (*Clarias gariepinus*), an oviparous model fish. Aquaculture 522, 735109.
- Müller, T., Balován, B., Tatár, S., Müllerné-Trenovszki, M., Urbányi, B., Demény, F., 2010. A lápi póc (*Umbra krameri*) szaporítása és nevelése a természetesvízi állományok fenntartása és megerősítése érdekében. Pisces Hungarici 5, 15–20.
- Müller, T., Baska, F., Niklesz, F., Horn, P., Váradi, B., Bercsényi, M., 2005a. The testis histology of artificially matured European eel (*Anguilla anguilla* L.) at the end of sexual maturation, and spermatozoa ultrastructure in freshwater rearing. Acta Biol. Hung. 56, 169–172.
- Müller, T., Baska, F., Váradi, B., Horn, P., Bercsényi, M., 2005b. Testis histology in artificially matured European eel (*Anguilla anguilla* L.) at the end of sexual maturation and spermatozoa ultrastructure in freshwater rearing. Acta Biol. Hung. 56, 169–172.
- Müller, T., Bernáth, G., Horváth, Á., Várkonyi, L., Grigoraş, G., Gagi, A., Urbányi, B., Źarski, D., Freyhof, J., Cameron, T., 2018a. Artificial propagation of the endangered Rumanian endemic warm water rudd (*Scardinius racovitzai* Müller 1958, *Cyprinidae, Cypriniformes*) for conservation needs. Egypt. J. Aquat. Res. 44, 245–249.

- Müller, T., Binder, T., Váradi, B., Bercsényi, M., 2001. Az európai angolna (*Anguilla anguilla* L.) hormonálisan indukált ivarérelése és sikeres ikranyerése. *Halászat* 94, 115–118.
- Müller, T., Binder, T., Váradi, B., Horn, P., Bercsényi, M., 2002. Artificial induction of sexual maturation in the European eel males (*Anguilla anguilla* L.) (Preliminary results). *Acta Agrar. Kaposváriensis* 6, 53–57.
- Müller, T., Boltizár, O., Várkonyi, L., Bernáth, G., Ittész, I., Urbányi, B., Horváth, L., 2016. Az európai angolna (*Anguilla anguilla* L.) hormonálisan indukált ivarérelése, szaporítása, lárwanevelésének kezdeti lépései, in: XII, Magyar Haltani Konferencia. p. 5.
- Müller, T., Horváth, Á., Takahashi, E., Kolics, B., Bakos, K., Decsi, K., Kovács, B., Taller, J., Urbányi, B., Bercsényi, M., Horváth, L., Adachi, S., Arai, K., Yamaha, E., 2012a. 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., Horváth, L., Szabó, T., Ittész, I., Bognár, A., Faidt, P., Ittész, A., Urbányi, B., Kucska, B., 2018b. Novel method for induced propagation of fish: Sperm injection in oviducts and ovary/ovarian lavage with sperm. *Aquaculture* 482, 124–129.
- Müller, T., Matsubara, H., Kubara, Y., Horváth, A., Asturiano, J.F., Urbányi, B., 2017. Japanese eel (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, 1846) propagation using cryopreserved sperm samples. *J. Appl. Ichthyol.* 33, 550–552.
- Müller, T., Matsubara, H., Kubara, Y., Horváth, A., Kolics, B., Taller, J., Stéger, V., Kovács, B., Horváth, L., Asturiano, J.F., Peñaranda, D.S., Urbányi, B., 2018c. Testing cryopreserved European eel sperm for hybridization (*A. japonica* × *A. anguilla*). *Theriogenology* 113, 153–158.
- Müller, T., Molnár, T., Szabó, A., Romvári, R., Hancz, C., Bercsényi, M., Horn, P., 2004a. Tracking the hormonally-induced female eel maturation by means of computer tomography. *Acta Vet. Hung.* 52, 235–243.
- Müller, T., Romvári, R., Bercsényi, M., Hancz, C., Molnár, T., Szabó, A., Horn, P., 2004b. Following the artificially induced eel maturation process by means of in vivo CT scanning. *J. World Aquac. Soc.* 35, 217–224.
- Müller, T., Urbányi, B., Váradi, B., Binder, T., Horn, P., Bercsényi, M., Horváth, Á., 2004c. Cryopreservation of sperm of farmed European eel *Anguilla anguilla*. *J. World Aquac. Soc.* 35, 225–231.
- Müller, T., Molnár, T., Szabó, A., Yamaha, E., Járasi, É., Bercsényi, M., Specziár, A., Urbányi, B., Romvári, R., 2012b. In vivo tracking of maturation in male European eel, *Anguilla anguilla* (L.), by computed tomography. *Acta Biol. Hung.* 63, 180–188.
- 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., Urbányi, B., Horváth, L., 2020a. Áttekintés az indukált halszaporításban alkalmazott hormonbejuttatási módszerekről. *Halászat* 113, 69–76.
- Müller, T., Nguyen, Q., Getachew, W.A., Bógó, B., Horváth, L., Csorbai, B., Szabó, T., Gebremichael, A., Urbányi, B., Kucska, B., 2020b. Különböző hormonbejuttatási módszerek hatása afrikai harcsa indukált szaporítása során. In (Nagyné Bíró, J. (szerk). *Halászatfejlesztés 37 – Fisheries & Aquaculture Development Vol. 37* NAIK HAKI Szarvas, pp. 51-52.

- Müller, T., Urbányi, B., Staszny, Á., 2020c. Veszélyeztetett lápi halak megóvása (lápi póc, réticsík, széles kárász, Második javított kiadás). Vármédia Print Kft.
- Müller, T., Váradi, B., Horn, P., Bercsényi, M., 2003. Effects of various hormones on the sexual maturity of European eel (*Anguilla anguilla* L.) females from farm and lakes. *Acta Biol. Hung.* 54, 313–322.
- Müller, T., Wilhelm, S., Imecs, I., 2015. Conservarea și reproducerea artificială a speciilor de pești de mlaștină periclitate: țigănuș, caracudă și țipar. Editura Green Steps, Brașov.
- Munehara, H., Takano, K., Koya, Y., 1991. The little dragon sculpin, *Blepsias cirrhosus*: another case of internal gametic association and external fertilization. *Jap. J. Ichthyol.* 37, 391–394.
- Munehara, H., Takano, K., Koya, Y., 1989. Internal Gametic Association and External Fertilization in the Elkhorn Sculpin, *Alcichthys alcicornis*. *Copeia* 1989, 673.
- Mylonas, C.C., Bridges, C., Gordin, H., Ríos, A.B., García, A., De La Gándara, F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina, A., Papadaki, M., G. Heinisch, G. De Metrio, A. Gorriero, R. Vassallo-Agius, J.M. Guzman, E. Mananos, Y. Zohar., 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Rev. Fish Sci.* 15, 183–210.
- Mylonas, C.C., Duncan, N.J., Asturiano, J.F., 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture* 472, 21–44. Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516–534.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish, in: *The Fish Oocyte*. Springer, Dordrecht., pp. 437–474.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 463–491.
- Nagahama, Y., 1997. 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action, in: *Steroids*. pp. 190–196. Nasiadka, A., Clark, M.D., 2012. Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR J.* 53, 161–168.
- Németh, Á., Orbán, K., Faidt, P., Horváth, Á., Müller, T., Szathmári, L., Urbányi, B., Horváth, L., 2012. Induction of ovulation in the Pikeperch (*Sander lucioperca* L.) by ovarian lavage. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 914–915.
- Nomura, K., Koh, I.C.C., Iio, R., Okuda, D., Kazeto, Y., Tanaka, H., Ohta, H., 2018. Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio. *Aquaculture* 496, 203–210.
- Ohta, H., Izawa, T., 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* 142, 107–118.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K., 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 139, 291–301.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Inuma, N., Hirose, K., 1997a. Artificial

- induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 163–169. Ohta, H., Sato, Y., Imaizumi, H., Kazeto, Y., 2017. Changes in milt volume and sperm quality with time after an injection of recombinant Japanese eel luteinizing hormone in male Japanese eels. *Aquaculture* 479, 150–154.
- Ohta, H., Shimma, H., Hirose, K., 1995. Relationship between fertility and motility of cryopreserved spermatozoa of the amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fish. Sci.* 61, 886–887.
- Ohta, H., Tanaka, H., Kagawa, H., Okuzawa, K., Iinuma, N., 1997b. Artificial Fertilization Using Testicular Spermatozoa in the Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 63, 393–396.
- Okamoto, T., Kurokawa, T., Gen, K., Murashita, K., Nomura, K., Kim, S.-K., Ohta, H., Matsubara, H., Tanaka, H., 2009. Influence of salinity on morphological deformities in cultured larvae of Japanese eel, *Anguilla japonica*, at completion of yolk resorption. *Aquaculture* 293, 113–118.
- Okamura, A., Horie, N., Mikawa, N., Yamada, Y., Tsukamoto, K., 2014. Recent advances in artificial production of glass eels for conservation of anguillid eel populations. *Ecol. Freshw. Fish* 23, 95–110.
- Okamura, A., Oka, H.P., Yamada, Y., Utoh, T., Mikawa, N., Horie, N., Tanaka, S., 2002. Development of lateral line organs in leptocephali of the freshwater eel *Anguilla japonica* (*Teleostei, Anguilliformes*). *J. Morphol.* 254, 81–91.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horita, T., Horie, N., Mikawa, N., Utoh, T., Tanaka, S., Tsukamoto, K., 2009a. Rearing eel leptocephali (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel) in a planktonkreisel. *Aquacult. Res.* 40, 509–512.
- Okamura, A., Yamada, Y., Mikawa, N., Horie, N., Utoh, T., Kaneko, T., Tanaka, S., Tsukamoto, K., 2009b. Growth and survival of eel leptocephali (*Anguilla japonica*) in low-salinity water. *Aquaculture* 296, 367–372.
- Okamura, A., Zhang, H., Utoh, T., Akazawa, A., Yamada, Y., Horie, N., Mikawa, N., Tanaka, S., Oka, H.P., 2004. Artificial hybrid between *Anguilla anguilla* and *A. japonica*. *J. Fish Biol.* 64, 1450–1454.
- Ottesen, O.H., Marschhäuser, V., Babiak, I., 2012. Effects of Cryopreservation on Morphology and Viability of Sperm and Larvae of Atlantic Cod, *Gadus morhua* L. *J. World Aquac. Soc.* 43, 375–386.
- Palstra, A.P., Heppener, D.F.M., Van Ginneken, V.J.T., Székely, C., Van den Thillart, G.E.E.J.M., 2007. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 352, 244–256.
- Palstra, A.P., Jéhannet, P., Swinkels, W., Heinsbroek, L.T., Lokman, P.M., Vesala, S., Tulonen, J., Lakka, T., Saukkonen, S., 2020. First Observation of a Spontaneously Matured Female European Eel (*Anguilla anguilla*). *Sci. Rep.* 10, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59331-6>
- Palstra, A.P., Niemantsverdriet, C.P.R., Van Ginneken, V.J.T., Van den Thillart, G.E.E.J.M., 2005. Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249, 533–547.
- Pedersen, B.H., 2004. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 237, 461–473.

- Pedersen, B.H., 2003. Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224, 323–338.
- Pedersen, M.I., Dieperink, C., 2000. Fishing mortality on silver eels, *Anguilla anguilla* (L.), in Denmark. *Dana* 12, 77–82.
- Peñaranda, D.S., Gallego, V., Rozenfeld, C., Herranz-Jusdado, J.G., Pérez, L., Gómez, A., Giménez, I., Asturiano, J.F., 2018. Using specific recombinant gonadotropins to induce spermatogenesis and spermiation in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Theriogenology* 107, 6–20.
- Peñaranda, D.S., Pérez, L., Gallego, V., Jover, M., Asturiano, J.F., 2009. Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. *Cryobiology* 59, 119–126.
- Pereira, C.R., Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Ritter, F., Silva, L.B., 2006. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. *Brazilian J. Biol.* 66, 1057–1063.
- Perera, D.A., Alsaqufi, A., Shang, M., Wade, D.C., Su, B., Elawad, A., Fobes, M., Beam, R., Garcia, G., Dunn, D.A., Lipke, E.A., Dunham, R.A., 2017. Xenogenesis-production of channel catfish × blue catfish hybrid progeny by fertilization of channel catfish eggs with sperm from triploid channel catfish males with transplanted blue catfish germ cells. *North. Amer. J. Aquac.* <https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1221008>.
- Pérez, L., Asturiano, J.F., Tomás, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinós, F.J., Navarro, J.C., Jover, M., 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: Assessment of sperm quality throughout treatment. *J. Fish Biol.* 57, 1488–1504.
- Peter, R.E., Lin, H.R., Van Der Kraak, G., 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74, 1–10.
- Priyadarshi, H., Das, R., Singh, A.A., Patel, A.B., Pandey, P.K., 2021. Hormone manipulation to overcome a major barrier in male catfish spawning: The role of oxytocin augmentation in inducing voluntary captive spawning. *Aquacult. Res.* 52, 51–64.
- Pires, L.B., Sanches, E.A., Romagosa, E., Corrêa Filho, R.A.C., Nass, R.A.R., Lopera-Barrero, N.M., Povh, J.A., 2019. Sperm quality of *Colossoma macropomum* after room-temperature and cold storage. *J. Appl. Ichthyol.* 35, 747–753.
- Prokhorchik, G.A., 1986. Postembryonic development of European eel, *Anguilla anguilla*, under experimental conditions. *Vopr. Ikhtiologii* 26, 802–807.
- Prokhorchik, G.A., Petukhov, V.B., Petrikov, A.M., 1987. Embryonic development of European eel, *Anguilla anguilla*, under experimental conditions. *Vopr. Ikhtiologii* 27, 124–131.
- Rasband, W.S., 2011. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Robinet, T., Feunteun, E., 2002. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: A cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* 11, 265–277.
- Rosengrave, P., Taylor, H., Montgomerie, R., Metcalf, V., McBride, K., Gemmell, N.J., 2009. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 152, 123–129.
- Rosengrave, P., Taylor, H., Montgomerie, R., Metcalf, V., McBride, K., Gemmell, N.J., 2009. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*

- Mol. Integr. Physiol. 152, 123–129.
- Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D.E., Ollevier, F., 1998. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *J. Fish Biol.* 53, 402–413.
- Saad, A., Billard, R., Theron, M.C., Hollebecq, M.G., 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture* 71, 133–150.
- Sampaio, E. V, Sato, Y., 2006. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (*Osteichthyes: Siluriformes*) da bacia do rio São Francisco. *Acta Sci. Biol. Sci.* 28, 263–268.
- Santana, J., Cabrita, E., Eggen, B., Beirão, J., 2020. Step by step optimization of a sperm cryopreservation protocol for spotted wolffish (*Anarhichas minor Olafsen, 1772*). *Theriogenology* 149, 16–24.
- Santos, H.B., Arantes, F.P., Sampaio, E. V, Sato, Y., 2013. Artificial reproduction and reproductive parameters of the internally inseminated driftwood catfish *Trachelyopterus galeatus* (*Siluriformes: Auchenipteridae*). *Ichthyol. Res.* 60, 142–148.
- Sarosiek, B., Dryl, K., Krejszeff, S., Żarski, D., 2016. Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) milt collected with a syringe and a catheter. *Aquaculture* 450, 14–16.
- Sato, N., Kawazoe, I., Suzuki, Y., Aida, K., 1997. Development of an emulsion prepared with lipophilized gelatin and its application for hormone administration in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 171–178.
- Satoh, H., Yamamori, K., Hibiya, T., 1992. Induced spawning of the Japanese Eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 825–832.
- Schnabel, D., Palstra, A., Van den Thillart, G., Spaink, H.P., 2007. Induced sexual maturation in eel with embryonic zebrafish cell lines that constitutive produce LH and FSH. *Dev. Biol.* 1, 384.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3, 390–411.
- Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., França, L.R., Vilela, D.A., Godinho, H.P., 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis—evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891–898.
- Seddon, P.J., Soorae, P.S., Launay, F., 2005. Taxonomic bias in reintroduction projects. *Anim. Conserv.* 8, 51–58.
- Sellyei, B., Horváth, L., Székely, C., Boltizár, O., Várkonyi, L., Molnár, K., Kucharczyk, D., Jánosi, S., Bokor, Z., Müller, T., 2017. Az európai angolna (*Anguilla anguilla*) ikrainkubációja során fellépő patogén *Vibrio* sp. azonosítása és az ellene való védekezés lehetőségeinek kidolgozása. *Magy. Állatorv. Lapja* 139, 385–448.
- Sequeira, V., Vila, S., Neves, A., Rifes, P., Nunes, M.L., Vieira, A.R., Paiva, R.B., Muñoz, M., Gordo, L.S. (2012). The gelatinous matrix of the Teleost *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Delaroche, 1809) in the context of its reproductive strategy. *Mar. Biol. Res.* 7, 478–487.
- Sivakumaran, K.P., Brown, P., Stoessel, D., Giles, A., 2003. Maturation and reproductive biology of female wild carp, *Cyprinus carpio*, in Victoria, Australia. *Environ. Biol. Fishes* 68, 321–332.
- Sneed, K.E., Clemens, H.P., 1959. The use of human chorionic gonadotrophin to spawn warm-

- water fishes. *Progress. Fish-Culturist* 21, 117–120.
- Solar, I.I., McLean, E., Baker, I.J., Sherwood, N.M., Donaldson, E.M., 1990. Short communication: Induced ovulation of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) following oral administration of des Gly10-(D-Ala6)LH-RH ethylamide. *Fish Physiol. Biochem.* 8, 497–499.
- Sorensen, S.R., Butts, I.A.E., Munk, P., Tomkiewicz, J., 2016. Effects of salinity and sea salt type on egg activation, fertilization, buoyancy and early embryology of European eel, *Anguilla anguilla*. *Zygote* 24, 121–138.
- Sørensen, S.R., Tomkiewicz, J., Munk, P., Butts, I.A.E., Nielsen, A., Lauesen, P., Graver, C., 2016. Ontogeny and growth of early life stages of captive-bred European eel. *Aquaculture* 456, 50–61.
- Spence, R., Smith, C., 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 69, 1317–1323.
- Sprengel, G., Luchtenberg, H., 1991. Infection by endoparasites reduces maximum swimming speed of European smelt *Osmerus eperlanus* and European eel *Anguilla anguilla*. *Dis. Aquat. Organ.* 11, 31–35.
- Stein, F.M., Wong, J.C., Sheng, V., Law, C.S., Schröder, B., Baker, D.M., 2016. First genetic evidence of illegal trade in endangered European eel (*Anguilla anguilla*) from Europe to Asia. *Conserv. Genet. Resour.* 8, 533–537.
- Steyn, G.J., Van Vuren, J.H.J., 1986. The role of the blood-testis barrier in the chemical composition of the seminal plasma of the freshwater teleost *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 83, 421–425.
- Sukumasavin, N., Leelapatra, W., McLean, E., Donaldson, E.M., 1992. Orally induced spawning of Thai carp (*Puntius gonionotus*, *Bleeker*) following co-administration of des Gly10 (D-Arg6) sGnRH ethylamide and domperidone. *J. Fish Biol.* 40, 477–479.
- Szabó, G., Müller, T., Bercsényi, M., Urbányi, B., Kucska, B., Horváth, A., 2005. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. *Acta Biol. Hung.* 56, 173–175.
- Taborsky, M., 1998. Sperm competition in fish:bourgeois' males and parasitic spawning. *Trends Ecol. Evol.* 13, 222–227.
- Takács, P., Erős, T., Specziár, A., Sály, P., Vitál, Z., Ferincz, Á., Molnár, T., Szabolcsi, Z., Bíró, P., Csoma, E., 2015a. Population genetic patterns of threatened European Mudminnow (*Umbra krameri* Walbaum, 1792) in a fragmented landscape: implications for conservation management. *PLoS One* 10, e0138640.
- Takács, P., Erős, T., Specziár, A., Sály, P., Vitál, Z., Ferincz, Á., Szabolcsi, Z., Molnár, T., Csoma, E., Bíró, P., 2015b. A lápi póc (*Umbra krameri*) magyarországi állományainak populációgenetikai vizsgálata. *Pisces Hungarici* 9, 5–17.
- Tamás, G., Csorbai, B., Kovács, É., Németh, I., Horváth, L., 2006. A süllő (*Sander lucioperca*) szaporítási technológiájának továbbfejlesztése. *Halászat* 99, 157–170.
- Tamás, H.G., Horváth, L., Tölg, I., 1987. Tógazdasági tenyészanyag-termelés, Mezőgazdasági Kiadó.
- Tamás, H.G., Horváth, L., Tölg, I., 1987. Tógazdasági tenyészanyag-termelés, Mezőgazdasági Kiadó.

- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., 2001. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture* 201, 51–60.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Okuzawa, K., Hirose, K., 1995. The First Report of Eel Larvae Ingesting Rotifers. *Fish. Sci.* 61, 171–172.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T., Nomura, K., 2003. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 493–497.
- Tanaka, S., Zhang, H., Horie, N., Yamada, Y., Okamura, A., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H.P., Kurokura, H., 2002. Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J. Fish Biol.* 60, 139–146.
- Tatár, S., Bajomi, B., Specziár, A., Tóth, B., Müllerné, T.M., Urbányi, B., Csányi, B., Szekeres, J., Müller, T., 2017. Habitat establishment, captive breeding and conservation translocation to save threatened populations of the Vulnerable European mudminnow *Umbra krameri*. *Oryx* 51, 718–729.
- Tatár, S., Sallai, Z., Demény, F., Urbányi, B., Tóth, B., Müller, T., 2010. A lápi póc fajvédelmi mintaprogram. *Halászat* 103, 70–75.
- Thomas, P., Boyd, N.W., 1989. Dietary administration of an LHRH analogue induces spawning of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Aquaculture* 80, 363–370.
- Tomkiewicz, J., 2012. Reproduction of European Eel in Aquaculture (REEL): consolidation and new production methods. National Institute of Aquatic Resources, Technical University of Denmark.
- Tomkiewicz, J., Jarlbæk, H., 2008. Artificial reproduction of eels, ROE II and IIB, DTU Aqua Report Series. Bergen.
- Tóth, B., Sevcsik, A., Várkonyi, L., Urbányi, B., Müller, T., 2016. A lápi póc (*Umbra krameri*) ivatóketreces szaporítása Farmoson (European mudminnow (*Umbra krameri*) propagation in cages in Farmos), in: XII. Magyar Haltani Konferencia. 2016. július 7–8. Abstract book, p: 6.
- Treasure, J.W., 1981. Some aspects of the reproductive biology of perch *Perca fluviatilis* L. Fecundity, maturation and spawning behaviour. *J. Fish Biol.* 18, 729–740.
- Tsukamoto, K., Nakai, I., Tesch, W. V., 1998. Do all freshwater eels migrate? *Nature* 396, 635–636.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. fish Biol. Fish.* 6, 287–318.
- Uribe, M.C., Grier, H.J., Mejía-Roa, V., 2014. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* 4, e983400.
- Vahid, A.S., Pashazadeh, F., Pourmoghaddam, Z., Aghebati-Maleki, L., Abdollahi-Fard, S., Yousefi, M., 2019. The effectiveness of IVIG therapy in pregnancy and live birth rate of women with recurrent implantation failure (RIF): A systematic review and meta-analysis. *Journal Reprod. Immunol.* 134, 28–33.
- Van Banning, P., Haenen, O.L.M., 1990. Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel, *Anguilla anguilla*, in: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), *Pathology in Marine Science*. Academic Press, New York, pp. 317–330.
- Vílchez, M.C., Mazzeo, I., Peñaranda, D.S., Gallego, V., Dufour, S., Weltzien, F.A., Asturiano, J.F., Pérez, L., 2014a. Effect of thermal regime on vitellogenesis, ovulation and larval

- development of European eel, in: In 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Olhão (Portugal), pp. 25–30.
- Vílchez, M.C., Morini, M., Peñaranda, D.S., Pérez, L., Depince, A., Kasa, E., Labbe, C., Horvath, A., Asturiano, J.F., 2014b. Cryopreserving European eel (*A. anguilla*) sperm: comparison of two methods for standardization, in: In 5. Jornadas Ibéricas de Ictiología-SIBIC2014.
- Virág, Á., 1997. A Balaton múltja és jelene. Egri Nyomda Kft, Eger.
- Von Ihering, R., 1937. A method for inducing fish to spawn. Progr. Fish-Culturist 4, 15–16.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Am. Zool. 21, 325–343.
- Watson, C.A., Hill, J.E., Graves, J.S., Wood, A.L., Kilgore, K.H., 2009a. Use of a novel induced spawning technique for the first reported captive spawning of *Tetraodon nigroviridis*. Mar. Genomics 2, 143–146.
- Watson, C.A., Wood, A., Graves, J.S., 2009b. New technique for administration of human chorionic gonadotropin – Ovarian lavage, in: Aquaculture America 2009. Seattle, USA, p. 394.
- Weil, C., Crim, L.W., 1983. Administration of LHRH analogues in various ways: Effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 35, 103–115.
- Woodworth, L.M., Montgomery, M.E., Briscoe, D.A., Frankham, R., 2002. Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. Conserv. Genet. 3, 277–288.
- Wourms, J.P., Grove, B.D., Lombardi, J., 1988. The maternal-embryonic relationship in viviparous fishes, in: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology 11B. Academic Press, pp. 1–134.
- Woynarovich, E., 1962. Hatching of carp eggs in Zuger-glasses and breeding of carp larva until an age of 10 days. Bamidgeh, Bull. Fish Cult. Isr. 14, 38–46.
- Woynárovich, E., 1954. A ponty mesterséges szaporítása. Magy. Tudományos Akadémia Agrártudományi Osztályának Közleményei 3, 227–242.
- Woynarovich, E., Horvath, L., 1980. The artificial propagation of warm-water finfishes: a manual for extension. FAO Fish. Tech. Paper, FAO, Rome.
- Yamamoto, K., 1963. Cyclic changes in the wall of the ovarian lumen in the medaka, *Oryzias latipes*. Ann. Zool. Jpn. 36, 179–186.
- Yamamoto, K., Yamauchi, K., 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature 251, 520–522.
- Yamauchi, K., Nakamura, M., Takahashi, H., Takano, K., 1976. Cultivation of larvae of Japanese eel. Nature 263, 412–412.
- Yang, H., Hazlewood, L., Heater, S.J., Guerrero, P.A., Walter, R.B., Tiersch, T.R., 2007. Production of F1 interspecies hybrid offspring with cryopreserved sperm from a live-bearing fish, the swordtail *Xiphophorus helleri*. Biol. Reprod. 76, 401–406.

- Yang, H., Hazlewood, L., Walter, R.B., Tiersch, T.R., 2009. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, *Xiphophorus couchianus*: Male-to-male variation in post-thaw motility and production of F1 hybrid offspring. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 233–239.
- Yang, H., Tiersch, T.R., 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 224–232.
- Yaron, Z., Bogomoinaya, A., Drori, S., Biton, I., Aizen, J., Kulikovsky, Z., Levavi-Sivan, B., 2009. Spawning induction in the carp: past experience and future prospects-a review. *Isr. J. Aquac.* 61, 5–26.
- Young, W.P., Frenyea, K., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 2009. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 289, 13–18.
- Żarski, D., Kucharczyk, D., Targońska, K., Palińska, K., Kupren, K., Fontaine, P., Kestemont, P., 2012. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquac. Res.* 43, 713–721.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99–136.

9. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Urbányi Béla, Prof. Horváth László, Prof. Mézes Miklós professzor uraknak a szakmai-, finansiális, 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 halsaporítási 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, Dr. 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!