

Opponensi vélemény Dr. Müller Tamás

„Keltetőházi halszaporítási gyakorlattól eltérő új- és újszerű módszertani eljárások” című
MTA doktori értekezéséről

A Jelölt MTA doktori értekezésében az édesvízi akvakultúra halszaporítási gyakorlatától eltérő, alternatív szaporítási módszerek fejlesztése során kapott főbb kutatási eredményeit mutatja be, gyakran egymásra épülő kísérletek sorozatának ismertetésén keresztül. Az értekezés két fő részből áll. Az első részben a Jelölt azokat a főbb módszertani eredményeket mutatja be, amelyek mérföldkövei voltak egy új halszaporítási technika kifejlesztésének. A gazdaságilag jelentős halfajok (ponty, afrikai harcsa, dél-amerikai ezüstharcsa) mellett, zebadánión végzett inszeminációs kísérletek eredményeinek technikai részleteit, biológiai sajátosságait, és a módszer gyakorlati hasznosíthatóságát is részleteiben taglalja. Az értekezés második felében a mára súlyosan veszélyeztetett európai angolna mesterséges szaporítása terén elért eredményeit mutatja be. Ismerteti a nemzetközi szinten is jelentős új eredménynek tekintett, japán és európai angolna hibrid utódok sikeres létrehozásának körülményeit, valamint kitér a kutatási eredmények gazdasági, génmegőrzési és természetvédelmi jelentőségére.

Az **értekezés** alapját 9 db Q1-es besorolású, nívós tudományos folyóiratokban (Aquaculture, Theriogenology, Aquaculture Reports, Endangered Species Research) megjelent közlemény adja, amelyek közül 6-ban első, 3-ban utolsó szerző. A felsorolt közleményeken kívül, számos, a Jelölt első- vagy társszerzőségével megjelent cikk kapcsolódik közvetlenül az ismertetett kutatáshoz (ezek az Irodalomjegyzékben szerepelnek). Ezek közül több olyan van (elsősorban az Acta Biologica Hungarica szaklapban publikált cikkekre gondolok, mint például Müller et al. 2003, Horváth et al. 2011, vagy a Q2-es J. Applied Ichthyology lapban megjelent Müller et al. 2017 közleményre, de sorolhatnám tovább), amelyek annak ellenére, hogy nem Q1-es lapban megjelent közlemények, érdemes lett volna a dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények között felsorolni az általános irodalomjegyzék helyett. Véleményem szerint a kutatási folyamat bemutatásának ezek a munkák is fontos részét képezik, és a kutatás íve, időbeli egymásra épülése, valamint főbb mérföldkövei a saját közlemények jegyzékében is jobban tükröződtek volna ezáltal.

A 101 oldalas értekezés igényesen szerkesztett, megfelelően tagolt, a klasszikus felépítést követi. Nyelvezete érthető, világos, tárgyilagos és lényegre törő. A megértést 19 ábra és 15 táblázat segíti. Helyesírási hibák, elütések elvéve találhatóak a dolgozatban. A néhol előforduló kissé erőltetett megfogalmazások (11.old.: „feltételek optimális voltától függően”; 14. old.: „vitellogenezis végbementét”; 9. ábra: „különböző hormonkezelésekkel végzett, dél-amerikai ezüstharcában lefolytatott, szaporítási kísérlet”, 42. old.: „...felolvasztott spermaminták a

kontroll csoporthoz képest statisztikailag nem befolyásolták a csoportok beérését...” stb.) az érthetőséget összességében nem zavarják. Az értekezést 18 oldalas Irodalomjegyzék egészíti ki, és két-két oldalas magyar és angol nyelvű összefoglaló után a Köszönetnyilvánítás zárja.

A tartalomjegyzék részletes, jól szerkesztett, a dolgozat átláthatóságát nagyban segíti. A rövidítések jegyzéke alapos, a legfontosabb és/vagy gyakran említett fogalmak rövidítéseit mind tartalmazza. A testtömeg kilogramm (ttkg), a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM), és a zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein; gfp) rövidítéseit hiányoltam csupán a jegyzékből. A CPE (carp pituitary extract) esetében a „ponty hipofízis kivonat” megnevezés követte volna az angol nevet, viszont a jegyzékben „acetált pontyhipofízis kivonat” megnevezés szerepel, a szövegben (pl. 18. old.) pedig „acetonált”. Ez gondolom a hipofízis acetonnal történő víztelenítésére utal. A kettő közül a második áll közelebb a valósághoz, bár az acetonnal víztelenített ponty hipofízis kivonat lett volna talán a megfelelő kifejezés ez esetben.

A rövid, kb. kétoldalas Előszóban a Jelölt bemutatja az édesvízi akvakultúra egyre növekvő jelentőségének mibenlétét, a haltenyésztés és halszaporítás élelmezésügyi jelentősége mellett annak természetvédelmi és génmegőrzési szerepét is hangsúlyozza, valamint példákkal illusztrálja kutatási témájának előzményeit és annak relevanciáját. Az értekezés alapjául szolgáló munka céljainak összefoglalása világos, érthető, jól megfogalmazott.

Az értekezés két fő témáját a Jelölt elkülönítve tárgyalja, külön bevezetéssel, módszertani bemutatással, eredményekkel és azok értékelésével. Az első részben az inszemináció mint új, alternatív, és legfőképpen nem invazív szaporítási módszer fejlesztésével foglalkozó kutatásokat tárgyalja, beleértve a különböző halfajokon végzett szaporítási kísérleteket. Ez adja az értekezés nagyobb hányadát (összesen 53 oldalt). A második fő részben az európai angolna mesterséges szaporításával kapcsolatos kutatásait ismerteti 17 oldalban.

Az első téma bevezetésében részletesen, szinte már tankönyvszerűen ismerteti a csontos halak szaporodásbiológiájának fontosabb aspektusait, a szaporodási típusok jellegzetességeit, a különféle halcsoportokra jellemző megtermékenyítési típusokat, valamint a megtermékenyítés sejtbioológiai hátterét. Mindezt példákon bemutatva, szakirodalmi hivatkozásokkal teszi, ami hasznos összefoglalása lehet a témában dolgozó kollégák és hallgatók számára is a jövőben. Apró megjegyzés, hogy a faj többes száma, a species pluralis rövidítését (spp.) nem írjuk dőlt betűvel, csak a kettős nevezéktan szerinti fajneveknél helyes a dőlten szedés. A külső megtermékenyítés esetében az ivartermékek vízáktívációjának tárgyalásakor (10. old.) nem világos, hogy a ponty szemínális plazmára vonatkozik-e a Shaliutina-Kolešová et al., 2016 hivatkozás, ami egyébként hiányzik az irodalomjegyzékből.

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

A halszaporításban használt beavatkozások tárgyalásakor definiálja mit tekint invazív és nem invazív eljárásnak; ezt az 1. ábra is jól szemlélteti. Itt néhány pontosítást tennék. Az invazív eljárás során nem egy „szövetféleséget” sért meg a beavatkozás, hanem szervek (beleértve akár csak a kültakarót) és az azokat alkotó szövetek roncsolódnak. Az intraperitoneális injektlás pedig nemcsak a hashártyán, de a hasfalon keresztül is történik.

A hormonbejuttatási módszereket példákkal és hivatkozásokkal kiegészítve, részletesen bemutatja, amelyből kiderül, hogy halfajok között jelentős eltérések lehetnek a sikeres hormonindukció módszerének tekintetében. A faji „jellegzetességek” (érzékenység, fiziológiai különbségek stb.) mellett feltételezem a hormonkombináció és az alkalmazott hormonok mennyisége is fontos befolyásoló tényező. KÉRDÉS: A szakirodalmi adatok összehasonlíthatók-e a hormonmennyiség szempontjából, és a bejuttatási módok hatékonysága összevethető-e a hormonmennyiségek figyelembevételével?

Az anyag és módszer fejezetben (2.2.) kellő részletességgel tárgyalja a kutatás során alkalmazott módszereket és mutatja be a kísérleti elrendezéseket. A fejezetben található 8 db ábra rendkívül szemléletes, és igényesen kivitelezett, nagyban segíti a kísérleti folyamat megértését. Az ábraalírások kissé elnagyoltak, helyenként pontatlanok; a magyarázatok is lehetnek volna konkrétabbak. Több esetben keresni kellett, hogy pontosan melyik kísérlethez kapcsolódik egy-egy adott ábra, mert a gyakran használt „Sematikus összefoglaló ábra a kísérletről” megnevezésből nem derült ki azonnal.

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

A pontyon végzett megtermékenyítési kísérletek során az első kísérletben nem pontyon, hanem japán díszpontyon (koi) dolgoztak. A *Cyprinus rubrofuscus* Lacepède, 1803 latin név is jelzi, hogy már nem a ponty (*Cyprinus carpio* L. 1758) egy alfajaként tartják számon a koi, (régebben használt latin nevéen *C. c. haematopterus*-t), így a pontyféléken végzett kísérletek megnevezés talán pontosabb lett volna.

Bár ez nem derül ki, feltételezem a sperma minták minőségellenőrzése során a hímivarsejtek számának számtani közepét vették alapul (18. old. 2.2.2.2. alfejezet). KÉRDÉS(ek): Általában

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

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

Az Eredmények (2.3.) fejezetben a különféle halfajokon elvégzett, inszeminációs kísérletek eredményét foglalja össze. Az átláthatóságot 9 db, szépen szerkesztett táblázat segíti. A táblázatok számozásánál történt némi hiba, aminek következtében a 9. táblázat 1-es sorszámot kapott, a 11. táblázat 2-es sorszámot, és onnantól kezdve a kettős számozás (a valós és a hibás) az Eredmények értékelése és a második fő téma tárgyalásánál is hibás táblázat-számozást eredményezett. A szövegben – ennek ellenére – a valós sorszámokra, helyesen történt a hivatkozás. A 3. táblázatban a japán koi-n végzett kísérlet eredményeinek összesítésekor a csoportok más elnevezést kaptak, mint ami a módszertani fejezetben szerepelt (kontroll helyett G1; G12 helyett G3), azonban ez kikövetkeztethető volt, így az értelmezést nem zavarta az eltérő csoportnév.

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

Az Eredmények értékelése (2.4.) fejezetben bőséges szakirodalmi hivatkozás mellett, részletesen kitér az alkalmazott inszeminációs eljárás technikai újdonságtartalmára, annak biológiai jelentőségére, és további vizsgálati irányvonalakat vázol fel. Ezenkívül gyakorlati szakemberek számára is hasznosítható ajánlást fogalmaz meg az inszeminációs eljárás főbb paramétereit, kivitelezési módját illetően. Idézet a 2.4.5. alfejezetből: „Kísérleteink eredményei alapján a genetikai változatosság valóban növelhető sperma petefészekbe juttatásával (indukált) ívatásos szaporítás esetében. A módszert azonban optimalizálni szükséges (irányított spermafeljuttatás csak az egyik petefészek lebenybe, spermium-ikra arány beállítása stb.)”. KÉRDÉS: Miért javasolja azt, hogy az inszemináció csak az egyik petefészek lebenybe történjen, ne pedig mindkettőbe?

A jelölt külön alfejezetben (2.5.) tárgyalja a módszer lehetséges felhasználási területeit, a természetvédelmi célú halszaporítástól és génmegőrzéstől kezdve a gazdasági célú

felhasználásig. Nagyon fontos szempontok ezek, ezért külön fejezetben való tárgyalásuk feltétlenül indokolt.

Apró megjegyzés halparazitológusként, hogy a *Thelohanellus nikolskii* nem alfaj, hanem önálló faj a nyálkaspórák paraziták (Myxozoa) között. A faj a pontyok bőrén (főleg a farok- és hátúszókon) képez cisztákat, amelyek szabad szemmel is jól láthatóak az ivadékon.

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

Az értekezés második fő része az európai angolna szaporításának néhány kulcsmomentumára fókuszál. A tejesek ivari érését, a spermamélyhűtést, valamint a mesterséges megtermékenyítést célzó kísérleteinek folyamatát és eredményeit foglalja össze 4 db ábra és 2 db táblázat segítségével szemléltetve.

A Bevezetésben (3.1.) bőszéges szakirodalmi hivatkozással mutatja be a világon eddig elért eredményeket, felvázolja az európai angolna szaporításának számos nehézségét, illetve bemutatja a japán angolna mesterséges szaporításának kidolgozása során elért nemzetközi sikereket. Utóbbiból kiderül, hogy több mint 35 év telt el a kezdeti lépésektől, mire a japán angolna mesterséges szaporításának gyakorlatban is használható protokollját kidolgozták. Emellett a kutatás előzményei alfejezetben (3.1.1.) részletesen bemutatja a Jelölt és munkatársai által, európai és részben japán angolnán végzett korábbi vizsgálataik eredményeit, amelyek alapjául szolgáltak az értekezésben ismertetett kutatásoknak. Ezen eredmények egy részére utaltam véleményem elején, hogy az értekezés részeként is felhasználhatóak lehettek volna.

A módszertani rész (3.2.) elején a japán és európai angolna spermára kidolgozott mélyhűtési technikákat foglalja össze hazai és nemzetközi szerzők munkái alapján. A táblázatra történt szövegek közötti hivatkozás hibás, nem a 15. táblázat tartalmazza ezt összesítést, hanem a 14. (ami egyébként szintén helytelenül, 4. táblázatként szerepel a 68. oldalon).

Az európai és japán angolna hibrid utódok genetikai elemzésének módszerismertetése kissé pontatlan (pl. a célgén a genomon kódolt FSH, ami nem „genomikus”, nem „genomi”, hanem genomiális), a PCR kondíciók leírása helyenként zavaros (a PCR puffer nem tartalmaz szekvenciát; a PCR összetevőinek vagy a végkoncentrációját szokás leírni, vagy esetleg az oldatból használt mennyiséget az oldat koncentrációjának megadásával, a kettő „hibridjének” feltüntetése helytelen, stb.). Hasonló a helyzet a genetikai vizsgálatok eredményének ismertetése alpontban (3.3.2.). Az agaróz gélen látható „sávok” valójában DNS fragmentumok,

amiknek egy része PCR termék (19.a ábra bal oldal), másik része a PCR-RFLP módszerével kapott és agaróz gélen vizualizált DNS termék (19.a ábra jobb oldal). A szövegekőzi hivatkozás hibás, 21. ábra nincs, a 19. ábra mutatja ezeket az eredményeket. Mindezekről függetlenül a módszer lényege világos, és eredményei érthetőek.

Az Eredmények értékelése (3.4.) fejezetben részletesen elemzi az elért eredmények jelentőségét, de kitér azok korlátaira is, amik miatt – jelen állás szerint – az európai angolna mesterséges szaporításának gyakorlati kivitelezése nem lehetséges. Külön említi a hosszú egyedfejlődési időt, ami már a japán és európai angolna hibridek esetében is 322 nap volt, a japán angolnára jellemző 179 nap helyett. Ez a több hónapos fejlődés számos technológiai és állategészségügyi kihívással jár. Ezeket említi is a Jelölt (apró megjegyzés, hogy a vibriosis egy bakteriális fertőzés, nem parazitás bántalom).

Az értekezés végéről kissé hiányolom a végső konklúziót, a disszertációt lezáró összegző gondolatokat és a lehetséges jövőbeli kutatási irányok megfogalmazását. Mondjuk utóbbira történt azért utalás az inszeminációs vizsgálatokkal kapcsolatban. KÉRDÉS(ek): Mit gondol, az európai angolna mesterséges szaporításának gyakorlatba is átültethető protokollja mikorra lesz kidolgozva? Mi hiányzik hozzá?

Az értekezéshez kapcsolódó rövid **tézisek**ben a Jelölt 25 oldal terjedelemben foglalja össze a kutatás lényegét, szintén a klasszikus szerkezeti felépítést követve, igényesen szerkesztve, megfelelő tagolással. Az értekezéssel ellentétben a két fő téma tárgyalása itt együtt történt. Az eredmények könnyebb átláthatóságát három táblázat segíti. Némi szépséghiba, hogy az 1. táblázatra nincs szövegekőzi hivatkozás, a 2. táblázatnál nem szerepel táblázat cím és magyarázat, valamint hibásan 1. táblázatként hivatkozik rá a Jelölt a szövegben. A 3. táblázat esetében sem sorszám, sem magyarázat, sem szövegekőzi hivatkozás nem található, valamint a táblázat nem a megfelelő szövegekörnyezetbe került, hanem hátrébb. Rövidítések jegyzéke ugyan nem szerepel a tézisfüzetben, a használt fogalmak többsége így is érthető. A testtömeg kg „ttkg” rövidítése szabályosan be van vezetve az első említéskor, azonban a későbbiekben mégis teljes névvel használja a Jelölt. Érthetőséget zavaró hiba azonban itt sem fordul elő.

Az Új tudományos eredmények fejezetben a Jelölt reálisan foglalja össze elért eredményeit. Véleményem szerint a leírtak helyenként pontosításra szorulnak, így a következőket javaslom elfogadásra új eredményként:

1. Egy új halszaporítási módszer kifejlesztésének alapjait dolgozta ki. A módszer alkalmazásával a külső megtermékenyítésű halfajok spermium sejtjei biológiai aktivitásukat megtartva, hosszabb ideig „tárolhatóak” a petefészkek lebenyben indukált szaporítás (vagy szaporodás) előtt. Íváskor (ovulációkor) a gaméták együtt ürülnek, és vízaktivációkor bekövetkezik a termékenyülés.

2. Megállapította, hogy a sperma szeminális folyadék alkalmas hormonvivőanyag is lehet. A spermában diszpergált, porított ponty hipofízis katéteres petefészekbe juttatása nyomán a kezelt halak (ponty, afrikai harcsa) ovuláltak, a petefészekbe juttatott spermiumok megtermékenyítették a vízaktivált ovulált ikrákat.
3. Meghatározta az afrikai harcsa ikrások petefészkébe juttatott spermiumok életképességének idejét *in vivo* kísérletben.
4. Megállapította, hogy afrikai harcsa ikrások petefészkében, a természetes módon elő nem forduló gaméta egyesülés, inszeminációt követően, mesterséges körülmények között létrejöhet.
5. Elsőként igazolta, hogy külső megtermékenyítésű fajokban íváskor/spontán ikraszóráskor a teljes közvetlen jelenléte nélkül is életképes utódok jönnek létre, amennyiben az ovulációt megelőzően spermát juttatnak az ikrások petefészeklebensébe.
6. Először sikerült mélyhűtött európai angolna spermával sikeres termékenyítést végrehajtani japán angolnában, és annak használatával, genetikai markerekkel is igazoltan, életképes hibrid utódokat keltetni.
7. Kísérletes úton bizonyította, hogy a tengervízben szaporodó angolnák tejeseinek esetében nincs szükség tengervízi ivarérlelésre; az édesvízben ivarérlelt halak az eltérő ozmolalitású környezet ellenére is termékenyítőképes spermiumokat termelnek.

A Jelölt tudományos pályáját PhD hallgató kora óta volt szerencsém a „távolból” nyomon követni. A halak szaporodásbiológiájának tudományterülete iránti kutatói elkötelezettségét és lelkesedését, valamint az utánpótlásnevelésben való aktív szerepvállalását példaértékűnek tartom. Ennek az évtizedes, kitartó munkának a szemléletesen és jól átláthatóan összerendezett kivonata a jelen MTA doktori értekezés.

Mindezek figyelembevételével a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak tartom, és a fokozat odaítélését feltétlenül támogatom.

Budapest, 2022. november 21.



Dr. Eszterbauer Edit

az MTA doktora

Állatorvostudományi Kutatóintézet