

Diplomadolgozat

Bógó Zsolt Bence

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Genetika és Biotechnológia Intézet
Mezőgazdasági biotechnológus mesterképzés

**Halszaporítási módszerfejlesztés: natív szemínális plazma kezelés
hatása a spermatermelésre (előzetes eredmények)**
**Development of fish propagation method: effect of native seminal plasma
treatment on spermiation (preliminary results)**

Témavezetők: Prof. Dr. Müller Tamás, egyetemi tanár, MATE
AKI Természetesvízi Halökológiai Tanszék

Prof. Dr. Urbányi Béla, egyetemi tanár, MATE
AKI Halgazdálkodási Tanszék

Készítette: Bógó Zsolt Bence

Gödöllő
2024

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzés.....	4
2	Irodalmi áttekintés	6
2.1	Általános szaporodásbiológia.....	6
2.2	Ivarszervek biológiája.....	6
2.3	Here és sperma általános jellemzői.....	6
2.4	A vizsgált hal bemutatása.....	8
2.5	A ponty szaporodása	10
2.6	A ponty szaporítása.....	10
2.7	Technikai megoldások a szaporításban (hormon bejuttatási módszerek).....	11
2.8	Szeminális plazma	13
2.9	Halak neuroendokrin szabályozása.....	14
3	Anyag és módszer	16
3.1	Hévízi pontyok tartása.....	16
3.2	Ponty szeminális plazma előkészítése	16
3.3	Hévízi pontyok kezelése	18
3.4	Sperma mennyiségi és minőség vizsgálat	21
3.5	Szeminális plazma és hormonmeghatározás	22
3.6	Eredmények elemzése	23
4	Eredmények	24
5	Eredmények megvitatása.....	26
6	Összefoglalás	29
7	Irodalomjegyzék	30
8	Köszönetnyilvánítás.....	34

1 Bevezetés és célkitűzés

A halak vízi szervezetek, szaporodásuk minden fázisa vízhez kötött. A halakra kizárólag az ivaros szaporodás a jellemző, amelynek lényege, hogy az utódok a különböző nemű szülők ivarsejtjeinek egyesülésével keletkeznek. Természetes körülmények között a halak nászjátékát ívásnak nevezzük, amely során elszórják a nagyon bőséges ivarterméket. Az ívási időszakban a különböző nemű halak ivarsejtjeiket (petesejt és hímvarsejt) a vízbe ürítik. Itt történik meg az ivarsejtek egyesülése, ami után a megtermékenyült petesejt kikel, a lárvák fejlődése megkezdődik. A végső éréshez, más környezet szükséges, amit ívási környezetnek nevezünk. Ez az ívási környezet nagyon változó lehet fajonként. Az ívási környezet kiválasztása az adott faj túlélésének és fennmaradásának legjobban megfelelő környezet alapján történik. Ez a választás azért fontos, hogy az utódoknak megfelelő feltételeket biztosítson a születésükhöz és fejlődésükhöz. Ezzel szemben az indukált szaporítás során, a halak szaporodást mesterséges körülmények között végzi. Az indukált szaporítás során felhasználnak különféle hormonális készítményeket abból a célból, hogy kiváltsák a hiányzó természeti tényezőket és ezzel növelni tudják a megtermékenyülést és a ivadékok megmaradásának arányát. A XX. század közepétől a magyar kutatók vezető szerepet játszottak a halak indukált ivarérlelése és szaporítása területén. JACZÓ (1953) számolt be először sikeres kecsege (*Acipenser ruthenus*) szaporításról, amit kecsege hipofízis kezeléssel ért el. A következő évben pontytól (*Cyprinus carpio*) pontyhipofízis használatával nyert ivarterméket. ANTALFI és TÖLG (1968) leírta a Magyarországra behozott kínai növényevő halfajok (amur, (*Ctenopharyngodon idella*) pettyes busa, (*Hypophthalmichthys nobilis*) fehér busa (*Hypophthalmichthys molitrix*)) mesterséges indukált szaporítását és ivadék nevelését. Az 1970-es évek elején a harcsa (*Silurus glanis*) is felkerült a mesterségesen, hipofízissel szaporított halak listájára, amiről HORVÁTH és TAMÁS (1976) számolt be. A technológia fejlődésének következő lépése volt a természetes készítmények szintetikus készítményekkel való kiváltása. A szintetikus GnRH készítményekkel való halszaporítási munkák 1980-as évek körül kezdődtek.

Ezen készítmények közül, az ovopel egy GnRH analóg, dopamin receptor antagonistá vegyület. Ez a vegyület az egyike azon kevés halszaporításra alkalmas mesterséges készítménynek, amelyet engedélyeztek Európában. A hazai keltetőházi szaporítás során alkalmazott programozott ovulációkiváltására döntő többségben acetonált pontyhipofízis kezelést alkalmaznak napjainkban is. A különböző analógok eltérő okok miatt nem tudtak elterjedni a

gyakorlati halszaporításban. A pontyhipofízis kezelés során az agyalapi mirigyet a felhasználási helyen és/vagy halfeldolgozó üzemben gyűjtik nagy előmunka igényrel. A MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet kutatói egy új halszaporítási módszer tesztelése során érdekes megfigyelésről számoltak be. Zebradánió (*Danio rerio*) fajban a szaporításra felkészített ikrások petefészeklebenyébe feljutatott sperma parciális ovulációt váltott ki (GAZSI et al., 2021). Elgondolásuk alapján a spermát alkotó szeminális plazma részben vagy egészben felszívódott a petefészek falon keresztül és a benne lévő szteránvázas hormonok neuroendokrin választ indukáltak az ikrásokban és ez okozott részleges ovulációt. A perzsa tok (*Acipenser persicus*) és a kaszpi sebes pisztráng (*Salmo trutta caspius*) sperma szeminális plazmája különféle androgéneket tartalmaz, mint például tesztoszteront, 11-ketotesztoszteront, progeszteront és 17α , 20β , 21-trihidrox-4-pregnen-3-one-t (HAJIREZAEI et al., 2012, 2013, JAMALZADEH et al., 2014), így ezek a vegyületek feltételezhetően a pontyfélék (zebradánió, ponty) szeminális folyadékában is megtalálhatóak.

A kísérletünk célja, hogy fejlesszünk egy olyan „organikus halszaporítási módszert”, melyben a hormongyűjtés nem jár a donor hal elölésével.

Célkitűzésünk, hogy megvizsgáljuk, hogy natívan gyűjtött ponty sperma előkezelést követően (szeminális plazma és a spermium sejtek szétválasztása centrifugálással) milyen hatással bír a „szeminális plazmával kezelt” halak spermatermelésre. Valamint meghatározni a ponty szeminális plazma hormontartalmának összetételét.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Általános szaporodásbiológia

A halak váltivarú állatok, ivaros úton szaporodnak és a hazai tenyésztett fajainkra a testen kívüli megtermékenyítés (másnéven: külső megtermékenyítés) jellemző, mely szigorúan vízhez kötött. Az ivadék gondozás fejlettsége és a peteszám között szoros összefüggés van, melyet a halak nagyszámú petesejt (halak esetében ennek elnevezése: ikra) termeléssel és ürítéssel kompenzálnak. Az utódvédelem hiánya miatt a petesejtekben sok tartalék táplálóanyag halmozódik fel, ezért a halpete jelentős nagyságú - nem ritka, hogy a testi sejteknél 1 milliószor nagyobb térfogatú -, ugyanakkor a spermiumok általában csupán néhány mikrométer méretűek. A halak ivarsejtjeinek egyesülése, a termékenyülés mindig vízi környezetben játszódik le az ívásnak nevezett nászjáték (szaporodási viselkedésforma) közben (HORVÁTH és MAGYARY, 2008).

2.2 Ivarszervek biológiája

A halak gonádjaikat (ivarmirigyeiket) tekintve sok hasonlóságot mutatnak. Porcos és csontos halakban páros szerv, az ingoláknál és nyálkahalaknál páratlan. Az egyedfejlődés (ontogenezis) kezdetén a csontos halak ivarszervei - úgy ahogy más gerinceseknél is - a gononefrotom ventromediális részéről ventrális irányban megjelenő hosszanti kettőzettből, a genitális redőből indulnak fejlődésnek. Ebben a kettőzettben helyezkednek el kezdetben az ősivarsejtek (KISS, 2000; LUBZENS et al., 2009), amelyek az ontogenezis későbbi szakaszaiban fognak tovább differenciálódni.

2.3 Here és sperma általános jellemzői

Habár a valódi csontos halak (Teleostei) heréjének szerkezete faj specifikusan változó, azonban két alap típusba sorolhatóak a germinális szövet differenciálódása szerint: (1) lebenyes (lobuláris) és (2) csöves (tubuláris) fajtát különböztetünk meg. A lebenyes here (a legtöbb gazdaságilag fontos halfajunk ezzel rendelkezik) számos lebenyéből (lobula) áll, amelyeket vékony rostos kötőszövet réteg választ el egymástól. A lebenyekén belül, az elsődleges spermatogónium több mitotikus osztódáson megy át, hogy nagy mennyiségű spermatogonális sejtet tartalmazó cisztákat termeljen. Az érés ideje alatt az összes csírasejt megközelítőleg azonos fejlettségi állapotban van. Mivel a spermatogenezis, majd a spermiogenezis folytatódik,

a ciszták kitelnek, végül megrepednek és felszabadítják a spermát a spermiumcsatornában folytatódó lebenyes lumenbe (NAGAHAMA, 1983). Csöves típusú heréje kizárólag a Poeciliidae családba tartozó elevenesülők fajoknak van (BILLARD et al., 1982). Az új rendszerezés alapján korlátozott (restricted) és korlátozatlan (unrestricted) típusra bontják a here típusokat (GRIER és NEIDIG, 2011). A csöves here (anastomosing tubular testis) jellemző a Protacanthopterygii öregrendre - lazacok és rokonaik, Clupeomorpha öregrend fajaira – hering alakúak tartoznak ide, valamint az Ostariophysi - pontyszerűekre. A herecsatornácskák átszövik a here állományát, egymással hálózatot alkotnak. A valódi lebenyes here Acanthopterygii – tüskésúszójú fajokra jellemző (nyálkásfejűek, kakashal alakúak, Percomorpha – például süllő, kősüllő, sügér, durbincs fajok stb.). Szemben az előző morfológiai alaktannal a herecsatornácskák sugárirányban állnak és csak a központi üreg környékén kapcsolódnak egymáshoz (egymástól így elkülönülnek). A valódi csontos halak spermiuma leegyszerűsödött, specializált sejt. A csontos halak jellegzetes spermiumtípusának a pontyfélék hímvarsejtjeit tekinthetjük. A spermium feje tartalmazza a gömbölyű vagy enyhén elliptikus sejtmagot, amely mindig oldalra eltolódva, excentrikusan helyezkedik el a farok tengelyéhez képest. A fej átmérője 1,5–2,5 μm . A sejtmag és a farok között az összeköttetést a két változatosan elhelyezkedő centriolum (proximális és distális) biztosítja. Ezek közül a distális centriolum a farok tengellyel egy vonalban található, míg a proximális megközelítőleg 120°-os szöveget alkot azzal. A halspermium nem rendelkezik az egyéb rendszertani egységek hímvarsejtjeire jellemző kifejezett középdarabbal. A sejtmag után egy, a spermium farkát (flagellumát) gyűrűszerűen körülölelő citoplazmatikus kitüremkedés található, amely 2-10 darab mitokondriumot tartalmaz. A farok tengelytőve és a citoplazmatikus kitüremkedés között egy úgynevezett poszt nukleáris csatorna figyelhető meg. A fejlődő ivarsejteken kívül két fontosabb szomatikus sejttípus lelhető fel a herében. Az interlobuláris térben a fibroblasztok között elszórt sejtcsoportokban található az úgynevezett intersticiális sejtek, amelyek szexuális szteroidhormon-termelésük miatt a fejlettebb gerincesek Leydig-sejtjeivel homológok. A Sertolli-sejteknek nevezett sejtek nevének jogosságát több kutató vitatja. Véleményük szerint ezek a sejtek valóban homológok a fejlettebb gerincesek Sertolli-sejtjeivel, ám működésükben azoktól több ponton is eltérnek. A halak spermiogenezise teljes egészében ezekbe a sejtekbe ágyazottan, azok által körülvéve történik. A fejlődő ivarsejtek semmiképpen sem érintkeznek a bazális membránnal, míg az emlősök heréjében ez a kapcsolat megvan. Ennek megfelelően ajánlják a ciszta-sejt elnevezést a Sertolli-sejt helyett, amely kizárólag emlősök esetében használható. A ciszta-sejtek funkciója azon túl, hogy a fejlődő ivarsejteket is tartalmazzák, a következő: tápanyagtranszport a fejlődő ivarsejtekhez és a spermiogenezis végén, a

visszamaradt spermiumok fagocitózisa (HORVÁTH és URBÁNYI, 2000). Az édesvízi halak spermiumainak mozgóképességét/aktivációját a spermacsatornából kikerülve a környezet (víz) ozmolalitás csökkenése (az ozmotikusan aktív részecskék koncentrációja az oldatban, oldott anyag per kiló oldószer értelemben) aktiválja (MORISAWA et al., 1983). Az aktivációtól számított néhány percig (átlagban maximum 1 perc) képesek a spermium sejtek önálló mozgásra (ALAVI és COSSON, 2005), ezért a lehető leggyorsabban kell közel kerülniük az ikra mikropüléhez (csírapapához), hogy a nagyon rövid életidejük alatt képesek legyenek termékenyíteni. A ponty spermasejtek szobahőmérsékleten tárolva mozgóképességüket több mint 4 napig megtartják, ha nem aktiválják azokat (KOWALSKI et al., 2014). A ponty szeminális folyadékának ozmolalitása 254-346 mOsmol kg⁻¹ (ALAVI és COSSON, 2006) gyakorlatilag megegyezik a petefészek folyadék ozmolalitásával (290 mOsmol kg⁻¹), valamint nagyon fontos megfigyelés, hogy a ponty petefészek folyadék nem aktiválja spermiumsejteket (HORVÁTH et al., 2010).

2.4 A vizsgált hal bemutatása

A ponty a csontos halak osztályán belül, a pontyalakúak rendjébe és a pontyfélék családjába tartozik. Elterjedését tekintve a hazai és Európa vizeiben honos alfaját (*C. carpio carpio*) a kontinensre nézve őshonosnak tekintik. A halak közül az emberiség elsők között a pontyot vonta hasznosításba. Ez köszönhető testparamétereinek és ízletes húsának. A ponty a legfontosabb haszonhalunk és a horgászok számára is kiemelt fogási célpont. Termelése domináns az étkezési halak előállításában, ami többek között a hazai természeti és klimatikus viszonyokra vezethető vissza. Hazánkban az összesített tógazdasági statisztikák szerint 2022-ben az összes lehalászott étkezési pontytermés 11 350 tonna volt, ami tógazdaságokban előállított étkezési célú haltermelés 81,9 százaléka (KSH, 2023). A hazai vizeinkben élő vadpontynak két formáját ismerjük (PINTÉR 1989): a nyurga pontyot (*C. carpio carpio morpha hungaricus*) és a tőpontyot (*C. carpio carpio morpha acuminatus*). A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (korábban Szent István Egyetem) kutatói közel 14 éve foglalkoznak ennek a hévízi törpenövésű vadponty (*C. carpio carpio morpha hungaricus*) a kutatásával (VARGA et al., 2013, 2021; BÓGÓ, 2021; BÓGÓ et al., 2022; MÜLLER et al., 2024). A hévízi törpenövésű vadponty valószínűleg a dunai vadpontytól eredeztethető. A hévízi vadponty (1. ábra) genotípus egy elszigetelt, önfenntartó állományt alkot a tóban, mely a szélsőséges hőmérsékleti és kémiai viszonyokhoz alkalmazkodott. Mivel egyedei kizárólag a Hévízi-tóban fordulnak elő, egyedi genetikai tulajdonságokkal és környezeti tűrőképességgel bírnak.

Valószínűleg a dunai vadpontytól eredeztethetőek, és hasonlóan hozzá "végveszélyben lévő" minősítést érdemelnek. A populáció - az alkalmazkodás egyik következményeként - törpenövésű egyedekből áll, melyek, jól lehet - a nemesített pontyfajtákhoz hasonlóan - rendelkeznek zsírraktárakkal, nagyon kis mérettel válnak ivaréretté (SPECZIÁR et al., 2013). A törpenövekedés magyarázatára számos alternatív hipotézis nyújt potenciális magyarázatot: 1) szélsőségesen magas hőmérséklet és ezzel járó alacsony oldott oxigén szint, 2) extrém vízkémiai adatok (radon tartalom, magas kénhidrogén tartalom stb.), 3) szélsőséges környezeti tényezők okozta genetikai szelekció, 4) több évszázados beltenyésztettség, 5) szélsőséges táplálékbázis (SPECZIÁR et al., 2004; VÁRKONYI, 2014; VARGA et al., 2013). Ennek ellenére, vagy éppen emiatt az állomány genetikai háttere egyedi, a sajátos ökológiai alkalmazkodó képesség eredménye. MOLNÁR et al (2019) vizsgálta a hévízi tó parazitológiai állapotát. Megállapították, hogy a ponty fajról leírt több, mint 100 élősködő fajból mindössze 5 volt kimutatható a halakról (parazita szegény környezet). Ugyanakkor érdekesség volt a pontyok legkülönbözőbb szezonban is fennálló magas fertőzöttsége a *Dactylogyrus minutus* (*Monogenea*) fajjal, ami csak itt fordul elő Magyarországon (esetenként néhány *D. extensus* egyed is kimutattak), a bél intenzív fertőzöttsége a pontyok diffúz coccidiosisát okozó *Goussia carpelli* fajjal, és a kormorán gyomrában kifejlődő *Contracaecum rudolphii* élő vagy elhalt lárváival.



1. ábra: Hévízi törpenövésű vadponty (fotó: Ferincz Árpád)

2.5 A ponty szaporodása

Magyarország a mérsékelt éghajlati övben fekszik. Ebben az éghajlati övben a ponty 2-4 év alatt éri el az ivarérettséget (íkrás esetében 3-4 év, tejesnél 2-3), ennyi idő szükséges, hogy kifejlődjenek az ivarszervek. Az ivarilag érett pontyok az első ívás után, évente szaporodnak. A mérsékelt éghajlati övben a szaporodási időszak nagyjából az akác virágzásával esik egybe, így tavasz végén, nyár elején, amikor a vizek elérik a 17°C-ot és kialakul a megfelelő ívási környezet (megfelelő -5-6 mg/l -oxigén tartalom szint; ívásiszubsztrát -aljzat növényzet-megléte; egyéb környezeti változás, pl.: meleg front, áradás), akkor elindul a sekély part menti vizekben a pontyok csoportos násza. Hazánkban a pontyfélék évente egy alkalommal szaporodnak. Más éghajlati övben (pl.: egyenlítő környékén) a *Cyprinidae* családba tartozó fajok éves szinten akár négy alkalommal is szaporodhatnak, a vizek magas hőmérsékletének köszönhetően (HORVÁTH és URBÁNYI, 2004).

2.6 A ponty szaporítása

A következő fejezet WOYNÁROVICH és HORVÁTH (1980), HORVÁTH (1980), HORVÁTH et al. (1984), HORVÁTH et al. (2000), HORVÁTH és URBÁNYI (2000); HORVÁTH et al. (2015) és ITTZÉS et al. (2017) munkáin alapul. A ponty szaporításának módszereit 3 nagy csoportra bonthatjuk: (i) természetszerű szaporítás, nagy tavi ívatás, (ii) félmesterséges szaporítás, ívatás és (iii) mesterséges/keltetőházi szaporítás.

Természetszerű szaporítás: A környezeti tényezők jeleinek megfelelő erősségűnek kell lennie ahhoz, hogy az ívasra felkészült halaknál elkezdődjön a szaporodás. Ennél a módszernél ki kell alakítani a megfelelő ívási körülményeket és az ívasra felkészült halak reagálni fognak azokra. A nagytavas szaporítás lényege, hogy nagyméretű, akár több hektár vízfelületű tavakba helyezik ki az anyahalakat, ($1 \text{ ♀} + 2 \text{ ♂} / \text{ha} = \text{kistörzs}$ vagy $2 \text{ ♀} + 3 \text{ ♂} / \text{ha} = \text{nagytörzs}$) ahol a szaporodáshoz szükséges feltételek kialakíthatóak (pl.: ívási szubsztrát). Megfelelő időben és feltételek mellett, ezzel a módszerrel olcsón és nagy mennyiségben lehet ivadékokat előállítani. Előnyei: (i) olcsó és nagy mennyiségű ivadékokat lehet előállítani, (ii) alacsony eszközigény, (iii) nem igényel komolyabb technikai háttérrel és szakmai tudást. Hátrányai: (i) nagy területről kevés halat lehet előállítani, (ii) termelés biztonsága nagyban függ a környezeti tényezőktől (időjárás, betelepülő ragadozók stb.), (iii) a termelési eredmények évente változnak, (iv) a lehalászásnak nagy a munkaerőigénye.

Félmesterséges szaporítás, ivatás: A módszer lényege, hogy mivel a halak bizonyos környezeti változásokra/tényezőkire nem egyformán reagálnak, ezért az ivás időzítésére és az ivást kiváltó tényezők helyettesítésére bizonyos hormon alapú készítményekkel kezelik a halakat, majd a kezelés után engedik őket a szaporodási helyeiket helyettesítő környezetbe, ahol szinkron leívnak. Előnyei a módszernek: (i) olcsó és nagy mennyiségű ivadék előállítás, (ii) alacsony eszközigeny, (iii) szinkronizált ivás. Hátrányai: (i) nagy területről kevés halat lehet termelni, (ii) a termelés biztonsága nagyban függ a környezeti tényezőktől (időjárás, betelepülő ragadozók stb.), (iii) a termelési eredmények évente változnak (termelés biztonság nem adott), (iv) a lehalászásnak nagy munkaerőigénye.

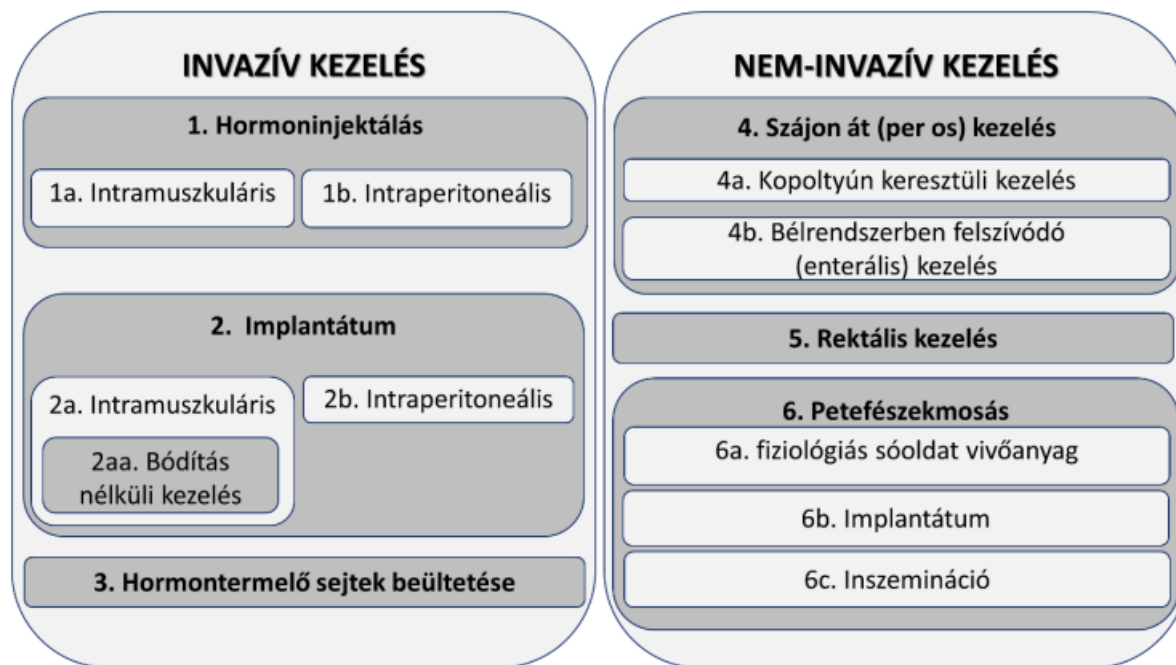
Mesterséges/keltetőházi szaporítás: A szaporodásra felkészült/felkészített halakban a környezeti tényezők hatásait hormonkezeléssel helyettesítik, majd az ivarterméket mesterségesen (fejéssel) nyerik és az ikrákat ellenőrzött körülmények között keltetik ki. A ponty keltetőházi szaporítási módszerének kifejlesztésében sokáig akadályozó tényező volt a ponty ikrájának természetes ragadoSSága. Az áttörést, egy magyar professzor, Woynárovich Elek által kifejlesztett módszer (ikraduzzasztáshoz használt oldat: 10 liter vízben 30 g karbamid és 40 g só, valamint a végső ragadoSSág megszüntetésére alkalmazott oldat: 10 liter vízben 5 g csersav (WOYNÁROVICH, 1962), ami elősegítette a Zuger üveges ikrainkubációt. Az indukált szaporításban a hormonindukció során általában ponty hipofízist használunk. Jelenlegi ismereteink alapján az ikraleváláshoz 3-5 mg/testtömeg-kilogramm hipofízis szükséges. Ezt a mennyiséget 2 részletben, elő- és döntő adag formájában szokták különböző hormonbejuttatási módszerekkel a halak vérkeringésébe juttatni. Előnyei: (i) kis helyen, rövid idő alatt sok halat lehet termelni, (ii) jól tervezhető, (iii) egész évben folyamatos termelést lehet biztosítani, (iv) a minőség fenntartható, (v) jó nyomon követhetőség, (vi) víztakarékos módszer. Hátrányai: (i) magas beruházási és üzemeltetési költségek, (ii) komoly szaktudást igényel, (iii) folyamatos ellenőrzést igényel.

2.7 Technikai megoldások a szaporításban (hormon bejuttatási módszerek)

A fejezet összeállításánál MÜLLER et al. (2020a) összefoglaló munkáját vettem alapul. A halfajok szaporítására kiválasztott hormonokat és hormonhatású anyagokat exogén úton, két módon lehet bejuttatni a halakba: invazív és nem invazív módon. Az invazív módszernél meg kell sértenünk valamely szövetféleséget a beavatkozás során (injekció, kapszula-beültetés). A nem invazív módszerek esetén nem okozunk sebzést, e helyett alternatív hormonbejuttatási eljárásokat, kezeléseket alkalmazunk (2. ábra).

1. Hormoninjektálás: Cél az ovulációt kiváltó hormonpreparátumok bejuttatása injekciós tű segítségével. A hormon vivőanyag vagy halfiziológiás (0,65% NaCl) vagy humán fiziológiás (0,9% NaCl) sóoldat. Halszaporítás esetén a hormoninjekciónak alapvetően két formája ismert, a bejuttatási helytől függően: 1/a intraperitoneális: injekció a hashártyán keresztül a hasüregbe, leggyakrabban a hasúszók tövéénél és 1/b intramuszkuláris: injekció az izomba, leggyakrabban a faroknyélbe, vagy a hátúszók magasságában a hátizomba.
2. Implantátum: Az eljárás lényege, hogy a hormonkészítményeket olyan vivőanyagba oldva viszik be a halak testébe, amelyből a hormonok kis dózisban, de hosszú idő (akár több hét) alatt oldódnak ki. Előnye, hogy nagymértékben csökken a halakra ható stressz mennyisége, mert egyre csökken a kezelések száma. További előnyt jelent, hogy az egyenletesen a véráramba jutó kis hormonadagokkal a természetes élettani működés szimulálható, ezáltal jobb minőségű ivartermék nyerhető. Az implantátumot bejuttathatjuk izomközé (intramuszkulárisan), illetve hasüregbe is (intraperitonálisan)
3. Hormontermelő sejtek beültetése: A módszer lényege az, hogy olyan embrionális sejt vonalakat vonjanak ki és ültessenek át zebradánióból angolna (*A. anguilla*) ikrásokba, amelyek kimondottan az FSH-LH (GtH I., GtH II.) termeléséért felelősek. Ezáltal egy megemelt és folyamatos vérplazma FSH szint biztosítja a vitellogenezis végbementét, bármilyen egyéb kezelés nélkül. Csak kezdeti kísérleti eredmények állnak rendelkezésre ennél a módszernél.
4. Szájon keresztüli (per os) kezelés: A szájon keresztüli hormonkezelések jelenleg még nem kiforrott módszerek. Alapvetően két részre bonthatók, a hormonfelszívódás helye alapján: 4/a kopoltyún keresztüli felszívódás, 4/b bélrendszerben felszívódó (enterális) kezelés.
5. Petefészek-mosás. Ezt a kifejezést a hormonkezelés katéteren keresztüli petefészekbe juttatására alkalmazzuk. Lényege, hogy katéter, biopszia-mintavevő és etetőszonda segítségével a genitális nyíláson, majd a petevezetőn keresztül közvetlenül a petefészek-üregbe juttatják be a hormonoldatot/szuszpenziót. Ennek egyik változata a (5/a) Sperma-petefészekmosás: Hazai szakemberek (gazdálkodók, kutatók) által kifejlesztett halszaporítási módszer. Korábbi megfigyelések szerint a ponty fajban az izoozmotikus ovarialis folyadék önmagában nem, vízzel hígítva azonban a spermiumokat nem csak aktiválta, hanem a motilitásukat hosszú ideig igen magas értéken tudta tartani (HORVÁTH et al., 2010). Ez alapján elgondolás az volt, hogy a szeminális folyadékban mozdulatlan spermiumsejtek a petefészek ozmocomform környezetében sem fognak aktiválódni, így hosszabb ideig képesek biológiai aktivitásukat megtartva életben maradni. Ovulációkor a follikuláris tokból kiszabaduló oociták felszínére feltapadnak a (még inaktív) spermiumsejtek, majd együtt

ürülnek a genitális nyíláson keresztül a külvilágba. Vízrel érintkezve ezek a spermiumok aktiválódnak és képesek megtermékenyíteni a szintén aktiválódott petesejteket. (MÜLLER et al., 2018a, b, 2019, 2020a,b,c)



2. ábra. Halak hormonkezelési módszereinek csoportosítása (MÜLLER et al., 2020a)

2.8 Szeminális plazma

A halsperma két összetevőből épül fel, egyfelől spermiumsejtekből, illetve az őket körülvevő szeminális plazmából. A szeminális plazmát a here és a spermavezeték termeli. A szeminális plazmában jelen lévő spermiumok száma fajfüggő (tokfélékben kisebb a koncentráció, míg a sügérfélékben magas), szerepe elsősorban a spermiumsejtek védelme. A hímivarsejtek a szeminális plazmában mozdulatlanok (CIERESZKO et al. 2000). Az SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ et al. (2016) kimutatták, hogy a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) szeminális plazma fehérje koncentrációja az ivási időszak alatt változik, a legmagasabb értéket az ivási idő közepén mutatta. A szeminális plazma ion koncentrációja is változhat az ivási időszak alatt (ALAVI és COSSON, 2006).

MÜLLER (2022) felvetette a szeminális plazma, mint új természetes hormon esetlegesen alkalmazhatóságát hím ivarú halak spermatermelés fokozására, vagy nő ivarú halakban ovuláció kiváltására. Az elgondolás alapja, hogy a spermát alkotó szeminális plazmában különféle szteránvázas hormonok jelenlétét igazolták. A perzsa tok és a kaszpi sebes pisztráng

sperma szeminális plazma különféle androgéneket tartalmaz, mint például tesztoszteront, 11-ketotesztozsteront, progeszteront és 17α , 20β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-one-t (HAJIREZAEI et al., 2012, 2013, JAMALZADEH et al., 2014). Ezek a hormonok – feltételezve, hogy a többi csontos hal sperma szeminális plazmájában is megtalálhatóak – a petefészekfalán keresztül felszívódva hatással lehetnek az ikrás halak vérének hormonszintjére, esetleg a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengelyen keresztül bekapcsolódhatnak a neurohormonális szabályozási folyamatokba, így parciális ovulációt idézhetnek elő. Amennyiben a jövőben sikerül felderíteni ezeket a folyamatokat és megértjük a spontán oocita-felszabadulás specifikus mechanizmusait, akkor ezen ismeretek is hozzájárulhatnak a szaporítás fejlesztéséhez (hagyományos hormonkezelés kiváltás). A feltételezést részben igazolta GAZSI et al. (2021) kísérleti eredményei, ahol zebradánio inszeminált ikrások (sperma feljuttatása a petefészekleányba) hím ivarú halak jelenléte nélkül spontán ovuláltak (részleges/parciális ovuláció) és a petefészekben tárolt spermiumok részben az ikratételeket termékenyítették.

2.9 Halak neuroendokrin szabályozása

Az endokrin mirigyek által termelt hormonok, különböző hormonális válaszokat váltanak ki a szervezetben, a külvilágból érkező ingerekre.

A hipotalamusz egy olyan endokrin mirigy, amely neuroszekretoros funkcióval rendelkezik. A hipotalamusz által termelt neuropeptidok az agyalapi mirigy hormontermelésére fejtik ki hatásukat. A hipotalamuszban termelt GnRH (gonadatróp releasing hormon), a szaporodásbiológiai funkciók szabályozása miatt kiemelendő, mivel az agyalapi mirigyben termelt GtH (gonadatróp hormonok) termelődését és szabályozását befolyásolja.

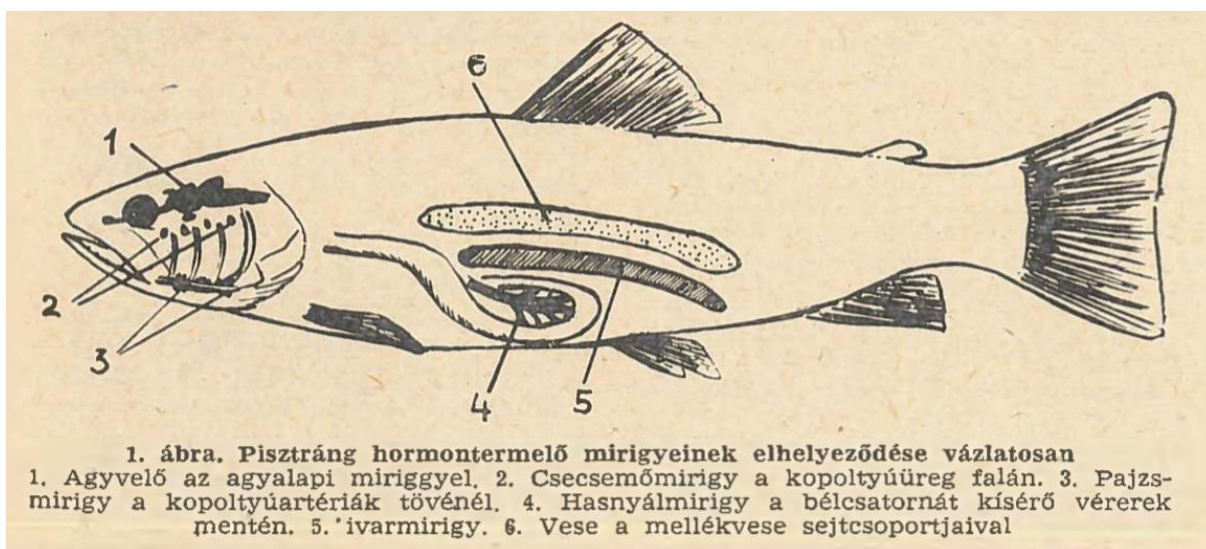
Az agyalapi mirigy legfontosabb hormontermelő része az elülső lebeny, vagyis az adenohipofízis (3. ábra).

A gonadatróp hormonok az ivarérettséget és a szaporodási folyamatokat szabályozzák. Két csoportra bonthatjuk őket, GtH I és GtH II, amelyek funkciójuk alapján kismértékben eltérőek, de inkább a hatások erősségében különböznek. A GtH I FSH-szerű, még a GtH II LH hatással rendelkezik. Némely esetben is eltérő hatást váltanak ki. Ikrások esetében a GtH I az ivartermék érésért felel (pl.: 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-on), míg a GtH II a végsőérés folyamatát és az ovulációt segíti elő (pl.: 17β ösztadiol). Az oocitákat körülvevő follikuláris sejtrétegekben termelődnek ezek a szteroid hormonok.

Tejeseknél a korai szakaszban a here fejlődését, majd a későbbiekben a sperma termelését befolyásolja a GtH I. A GtH II pedig a tesztoszteron termelésére hat.

A 11-ketotesztoszteron és a tesztoszteron termelést a herében gonadotróp hormonok befolyásolják.

11-ketotesztoszteron a Sertoli sejtekben fokozza a spermiogenezist (a spermiumok differenciálódását, majd az érésüket). A végső érési folyamatban azonban szerepe van a $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-on női hormonnak, ami a hímek számára egy bizonyos feromonként szolgál. A Leydig sejtek termelik a tesztoszteront, aminek a spermációban és a párzási viselkedésben van szerepe (MÉZES, 2000).



1. ábra. Pisztráng hormontermelő mirigyeinek elhelyeződése vázlatosan
1. Agyvelő az agyalapi miriggyel. 2. Csecsemőmirigy a kopolyaüreg falán. 3. Pajzsmirigy a kopolyaartériák tövénél. 4. Hasnyálmirigy a bélcsatornát kísérő vérerek mentén. 5. ivarmirigy. 6. Vese a mellékvese sejtcsoportjaival

3. ábra: Pisztráng hormontermelő mirigyeinek elhelyezkedése (SZÉKY 1963).

3 Anyag és módszer

3.1 Hévízi pontyok tartása

A halak saját szaporításból származó, intenzív rendszerekben nevelt halak voltak (BÓGÓ, 2021, BÓGÓ et al., 2022). A szaporítás 2021.02.22-én a Hévízi-tó partján történt, majd az ikratételt innen szállítottuk a Szent István Campus Halgazdálkodási tanszékének meleg vizes laboratóriumába, ahol egy 30 literes, 60 cm hosszú és 29 cm magas recirkulációs rendszere kötött, egyik átfolyó vizes kádjába helyeztük. A lárvák takarmányozását artemia mellett SDS-100 zebradánió táppal, valamint dekapuszulált artemia petével oldottuk meg. Az ivadékokat kereskedelemben kapható keveréktakarmányokkal (táppal) neveltük tovább (Aquagarant indítótápok; Aqua Start 0,4, átmérő: 0,4 mm nyersfehérje (nyf): 60%, nyerszsír (nyzs): 15% ~ 3 cm-es testhosszig, Aqua Start 0,6/1: átmérő 0,6-1mm, nyf: 60%, nyzs:15%; ~ 5-7 cm-es testhosszig). Az ivadékutónevelés során külső szűrővel ellátott 2 m³-es kádba neveltük tovább vegyes ivarban a halakat kísérletünkig. Naponta két alkalommal etettünk, mindkét etetést megelőzően a medencéket szivornya segítségével kitisztítottuk.



4. ábra: A rendszer, amiben a Hévízi pontyokat tartottuk (saját kép)

3.2 Ponty szeminális plazma előkészítése

A kezelések előtt (hormon indukció, ivarsejt gyűjtés (4. ábra) a halakat 100 mg /L benzokain (ethyl 4- 126 aminobenzoate, Norcaine) oldattal elaltattuk a könnyebb kezelés érdekében. A szeminális plazmát keltetőházi körülmények között szaporított majd a Tanszék intenzív rendszerben nevelt halakból nyertük ki. 4 db 3 nyaras tejest használtunk fel az ivartermék

gyűjtéséhez, melyek testtömege az alábbi volt: 835 gramm, 1359 gramm, 1701 gramm, 630 gramm.

A pontyokat 1 pellet/ 1ml 0,89% NaCl oldat / testtömegkilogramm dóziséú ovopellel (1 pellet tartalmaz: 18-20 µg emlős GnRH analóg (D-Ala 6 Pro 9 NEt-mGnRH), 8-10 mg dopamin receptor antagonistát (metoklopramidot, HORVÁTH et al., 1997) kezeltük a farokalatti úszóinak tövébe intraperitoneálisan injektálva. 24 óra elteltével a bódított tejeseket lefejtük. A genitália környékét egy puha törölközővel megtöröltük, hogy elkerüljük a vízkontaminációt, és a spermát a has óvatos megnyomásával gyűjtöttük be. A sperma mintákat 50 ml-es falkoncsőbe gyűjtöttük egyedenként külön-külön (5. ábra).



5. ábra: Sperma gyűjtése, a szeminális plazma kinyeréséhez (fotó: Varga Ádám)

A spermát ezek után szétosztottuk ml-enként 1,5 ml-es eppendorf csövekbe, majd ezek után centrifugáltuk 10.000 g-n 5 percig (Hettich EBA 12 Centrifuge 18000rpm típusú centrifugát használtunk, 6. ábra).



6. ábra: A centrifugába helyezett 1,5 ml-es eppendorf csövek (balra) és a kicentrifugált ivartermék (jobbra) (saját kép)

A mintákban a kicentrifugált spermiumpogácsa feletti szeminális plazmát lepipettáztam és 2,5 ml-es eppendorf csövekbe szétosztva egyedileg felcímkézve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hűtőbe helyeztem. A minták felhasználásig (szeminális plazma hormonvizsgálat, illetve ponty kezelés időszaka alatt) a hűtőben tároltuk.

3.3 Hévízi pontyok kezelése

A kezelésre a halakat véletlenszerűen választottuk ki az állományból (7. ábra), egy merítőháló segítségével, csak arra figyeltünk, hogy testtömegük ne térjen el jelentős mértékben egymástól. A kiválasztott tejeseket egy másik 2 m^3 -es külső szűrővel ellátott kádba helyeztük (ne legyen feromon hatás az ikrásokkal).



7. ábra: Hévízi pontyok altatása (saját kép)

A kísérlet előtt a halak elrendezését az 1. táblázat mutatja

1. táblázat: A kísérleti halak elrendezése

kezelés (minden esetben 0,5 ml/hal)	egyedszám (db)
0,89% NaCl kezelt halak	4
szeminális plazmával kezelt halak	4

A halak elhelyezésére csoportonként (2 csoport) 1-1 IKEA Fyllen összecusukható hálókötrec szolgált: magassága 50 cm, átmérője 45 cm, térfogata 79 l. háló lyukbősség: 0,7 mm, felülről tépőzáras tetővel zárható (8. ábra). A kezelést követően a halakat 24 órát zavartalanul ezekben a ketrecekben hagytuk. Kézbevételekor (kezelés előtt és 24 órával a kezelést követően) megmértük a halak testtömegét (ami azonosításként is szolgált) 0,1 g pontossággal.



8. ábra: Halak elhelyezése a kísérlet során (saját kép)

A kezeléseket Chirana 1ml INSULIN típusú fecskendővel egybeépített tűvel végeztük, a számított adagokat a hasúszó tövéénél a hasüregbe injektáltam (intraperitonális kezelés, 9. ábra).



9. ábra: Hévízi ponty intraperitonális kezelése (fotó: Varga Ádám)

3.4 Sperma mennyiségi és minőség vizsgálat

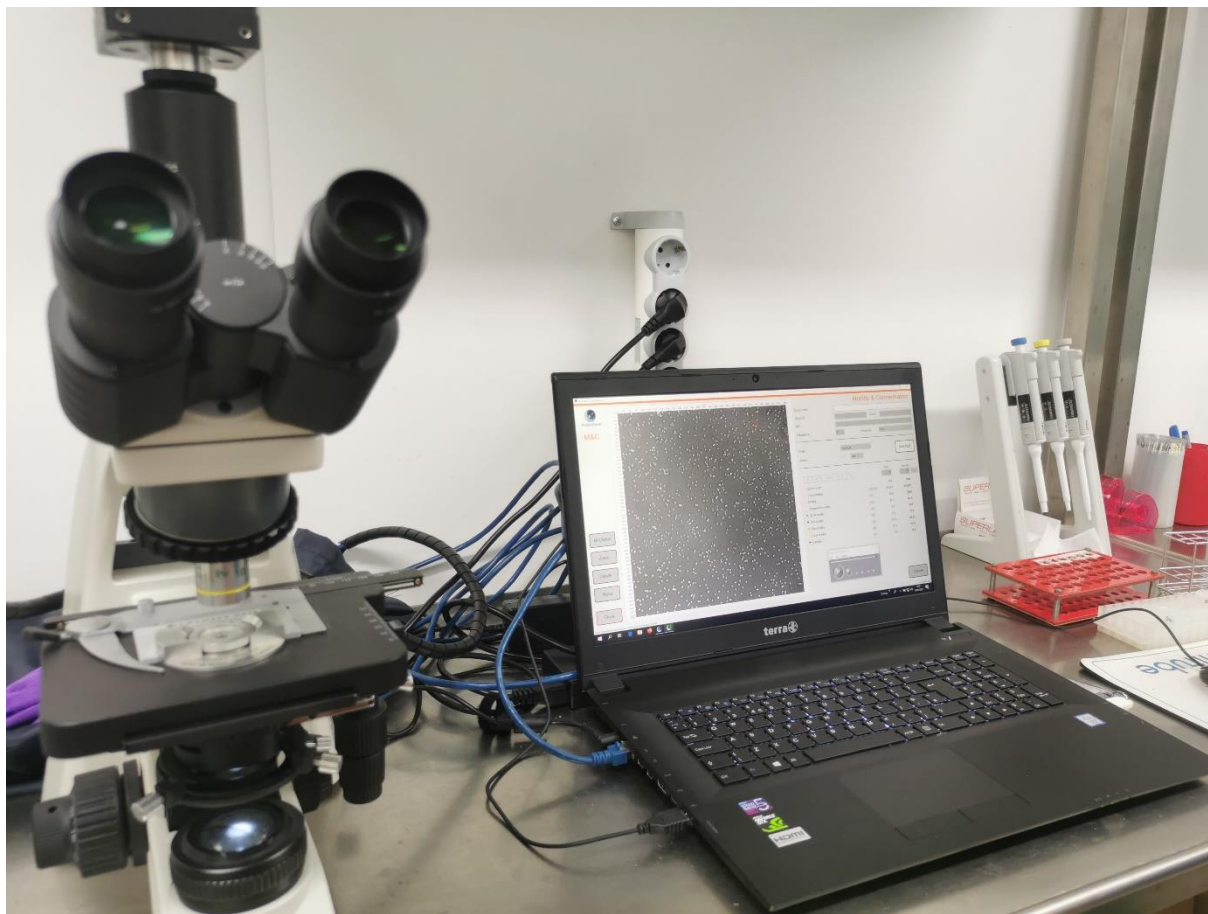
A halak kezelése előtt közvetlenül, valamint 24 órával a kezelést követően a bódított halakból spermát gyűjtöttünk (módszer megegyezett a 3.2. fejezetben leírtakkal). Minden haltól azonosítást követően (testtömeg és ketrec szám alapján) egyedileg jelölt 0,5 ml eppendorfba gyűjtöttük a mintát és feljegyeztük a nyert sperma mennyiséget mikroliter pontossággal. Az ivarterméket minden esetben egy automata pipetta segítségével gyűjtöttük be (10. ábra).



10. ábra: Spermagyűjtés Hévízi pontyokból, automata pipetta segítségével (fotó: Müller Tamás)

Ezt követően minőség vizsgálatot végeztünk számítógép-vezérelt spermavizsgálati (Computer-Assisted Sperm Analysis) berendezés (11. ábra) és Sperm Vision® nevű szoftver segítségével. A sperma aktivációt a következő oldattal végeztük; 0,1 mikroliter sperma 30 mikroliter ponty aktiváló (a sperma aktiválásához szükséges standard folyadék, összetevői: 45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8; SAAD et al., 1988.) + szarvasmarha szérum albumin (spermiumok üvegre tapadásának gátlásához). A rendszer által mért számos paraméter közül a progresszív motilitást választottuk (beállítás: progresszív motilitás küszöbértéke –minden halfaj esetében-:

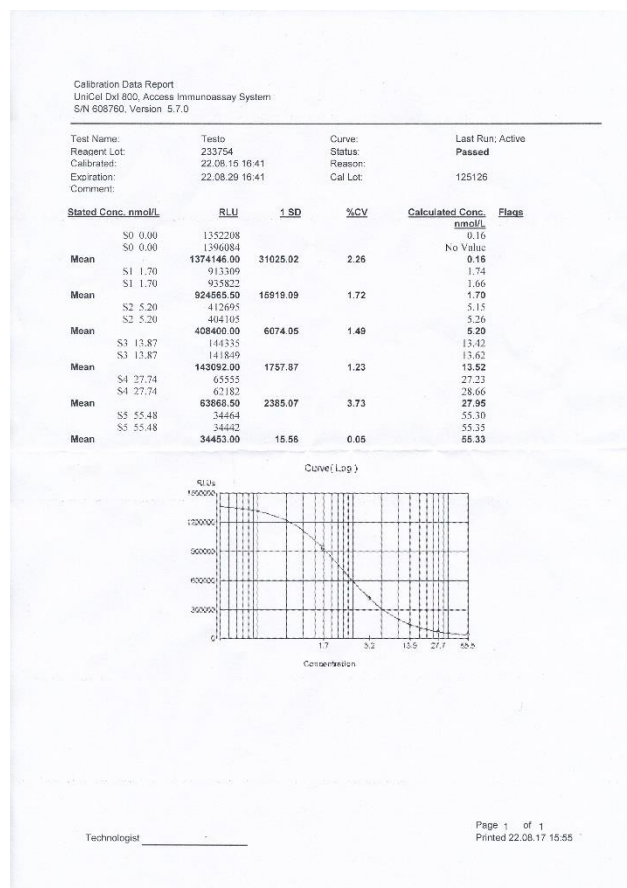
DSL (megtett egyenes útvonal a mozgás kiindulási- és végpontja között) $>5\ \mu\text{m}$)) a minták értékeléséhez (WILSON-LEEDY és INGERMANN, 2007; KÁSA, 2017).



11. ábra: CASA rendszer használat közben (fotó: Pataki Bernadett)

3.5 Szeminális plazma és hormonmeghatározás

A -80°C tárolt szeminális plazmát jégen Budapestre szállítottam a Spektrum-Lab központi laboratóriumába, ahol elvégezték nekünk a szeminális plazmában két szteránvázias ivarhormon (tesztoszteron és 17β -ösztradiol) szint mérést a 4 tejesből származó mintából külön-külön (12. ábra).



12. ábra: A Spektrum-Lab Kft. által kimutatott eredmények

3.6 Eredmények elemzése

A kapott eredmények statisztikai elemzéséhez a Windows Excel, adatelemzés (Analysis ToolPack) kétmintás t-próba nem egyenlő szórásnégyzetekkel elemző szoftvert használtam.

4 Eredmények

A 2. táblázatban láthatjuk a 3 nyaras tejesek hormonkezelést követő spermamennyiség és a szeminális plazmában mért hormon adatokat. Jó látszik, hogy mind a 4 hal esetében sikeresen tudtunk spermát kinyerni és mindegyik hal szeminális plazmájából sikerült kimutatni mind a tesztoszteront mind pedig az ösztradiolt és azok mennyiségét is a különböző egyedek szeminális plazmájában. Az ösztradiol szintnél 2 esetben nem kaptunk vissza pontos adatot, de adódhat a kismennyiségű mintából is. (A hormon szintek mérték egységei a szeminális plazmából történt kimutatásra vonatkoznak)

2. táblázat: Összesített eredmények a hormonálisan indukált spermatermelésről és a szeminális plazma hormontartalmáról (*A tesztoszteron moláris tömege =288,42 g/mol, az **ösztadiol moláris tömege = 272,39 g/mol).

Testtömeg (g)	Gyűjtött spermamennyiség (ml)	Tesztoszteron* (nmol/l)	Ösztadiol** (pmol /l)
835	2,5	6,86	<55
1359	10	4,13	84,38
1701	20	3,63	72,63
630	7,5	0,89	<55

A 3. táblázat azoknak a halaknak az eredményei láthatóak, amelyeket a 2. táblázatban bemutatott mintákkal kezeltünk (szeminális plazmával kezelt csoport), illetve a kontroll csoportként használt fiziológiás só oldattal kezelt csoportot.

3. táblázat: A különböző betűjelek statisztikailag igazolható különbséget jelölnek kezelési csoporton belül ($p < 0,05$) (* $p = 0,07$).

	Fiziológiás sóoldat (0,5 ml)		Szeminális plazma (0,5 ml)	
	kezelés előtt	kezelés után	kezelés előtt	kezelés után
Testtömeg (g)	25,14±11,8	24,67±11,8	20,94±10,55	20,83±10,64
Spermamennyiség (µm)	0,13±0,05	16,05±29,35	0,13±0,05	36±25,26
Progresszív motilitás (%)	74,56±26,86 (n=3)	69,43±32 (n=4)	46,6±46,58 (n=4)	91,34±4,84 (n=4)
Sejt koncentráció ($h \times 10^9$ db/ml)	8,8±13,73	2,8±2,23	7,75±6,87	2,95±2,03

Egyértelműen látható, hogy mind a NaCl oldat, mind a szeminális plazma a spermatermelést megemelte, elsősorban a szeminális plazma mennyiséget (kontroll 126%-os térfogat

növekedés, szeminális plazma kezelték 276%-os átlagos növekedést értek el). A kis elemszám és a nagy egyedi különbségek miatt a kontroll csoport kezelés előtti és utáni eredménye nem volt statisztikailag igazolható $p < 0,05$ szinten. Abszolút értékben a sejtkoncentráció csökkent (kontroll 32%-kal, a szeminális plazmával kezelt halak 38%-kal átlagosan), azaz hígulás következett be. Relatív mennyiségeket tekintve azonban mindkét kezelés a sejtmennyiséget a megnövekedett összmennyiségnek köszönhetően emelt. A progresszív motilitási értékeket tekintve statisztikailag igazolható módon nem volt különbség a csoportok között, ami szintén a nagy egyedi különbségeknek és a kis elemszámnak tudható be. Ki kell hangsúlyozni, hogy a csoportban lévő halak száma ($n=4$), valamint a nagy egyedi különbségek miatt az elért eredmények csupán tájékoztató jellegűek.

5 Eredmények megvitatása

A ponty sperma szeminális plazma hormontartalmáról jelenleg még nem állt rendelkezésre irodalmi adat, így az általunk közölt adatok a fajra tekintve tudományosan új eredménynek tekinthetők. Egyéb fajokban már mértek tesztoszteron és ösztradiol szinteket spermából, azonban ezek a lazacalkatúak (*Salmoniformes*) és tok alakúak (*Acipenseriformes*) rendbe tartozó fajok evolúciósan messze állnak a pontyalakúakhoz (*Cypriniformes*) képest, a megadott adatok csak tájékoztató jellegűek (4. táblázat).

4. táblázat. Különböző halfajok szeminális plazma tesztoszteron és ösztradiol tartalma.

Faj (latin)	tesztoszteron	ösztradiol (E2)	Megjegyzés	Szerző
Kaspi tengeri pisztráng (<i>Salmo trutta caspius</i>)	25,1±3,3 min-max: 20-30 ng/ml	2±0,6 min-max: 1-3 ng/ml	hormonkezelés nélküli mérés	Jamalzadeh et al., 2014
Perzsa tok (<i>Acipenser persicus</i>)	7.45± 1.12 ng/ml	0,5 ng/ml	hipofizissel kezelték 10 mg hipofízis/1 mL sóoldat (0.7%NaCl),	Hajirezaee et al., 2012,2013
Perzsa tok (<i>Acipenser persicus</i>)	9.00 ± 2.20 ng/ml 6.90 ± 2.20 ng/ml 7.45 ± 3.20 ng/ml 6.40 ± 0.60 ng/ml		intramuszkuláris hipofízises kezelés, 50-70 mg / hal dózissal	Hajirezaee et al., 2011
Ponty (<i>Cyprinus carpio</i>)	0,89-6,86 nmol/ml	<55 – 84,38 pmol/ml	sGnRH + metaklopramid kezelés (1 ovopel / testtömeg kg)	jelen tanulmány

Tudomásunk szerint először teszteltük a sperma szeminális plazmát, mint természetes hormontartalmú anyagot spermáció indukálásra. Az eredményeink előkísérleti jellegűek, a csoportba beállított halak száma, valamint az alkalmazott dózis miatt is. 0,5 ml szeminális plazma mennyiség egyszeri kiadagolása ilyen méretű halaknál (~ 25 g) túlságosan is nagy. Fontos kiemelni, hogy nem volt pusztulás a halakban a kísérletet követően. Előkísérletünkben most csak arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e élettani hatása a szeminális plazmának, így szélsőséges pontot jelöltünk ki. A jövőben csökkenteni kell még kísérleti szinten is a dózist, megvizsgálva, hogy csökkentett térfogatban is van-e a szteránvázas hormonkoncentrációnak a

spermációra. Az intramuszkuláris kezeléskor a beadandó mennyiség 0,5 ml/testtömeg kg, vagy kevesebb, intraperitoneális kezelés nem annyira érzékeny a térfogatra (2-3 ml/kg) (MÜLLER et al., 2020).

Spermatermelésre ható NaCl (kontroll) kezelés meglepő eredménnyel zárult. Előzetesen úgy gondoltuk, hogy a nagy térfogatú, fiziológiai szempontból közömbös kezelés, ami a kísérletben csak az okozott stressz hatását kívánta felmérni, nem fog értékelhető változást indukálni. Ezzel szemben növelte a kezelés a spermamennyiséget 24 óra alatt, valamint a sperma abszolút spermiumtermelés is növekedett (relatív értékben a spermiumkoncentráció alacsonyabb lett, hígult). Valószínűleg a nagy mennyiségű testfolyadék ozmolalitásával közel megegyező, izotóniás oldat (mi humán NaCl 0,89% oldattal dolgoztunk, a halak testfolyadék ozmolalitása 0,65% NaCl oldattal egyezik meg) többlet kiválasztásában nem csak a vese vett részt, hanem részben a herére is hathatott, megemelt szemínális plazma termeléssel. A szemínális plazma kezeléssel szemben csak a spermiumsejtek progresszív motilitását nem emelte a kezelés.

A szemínális plazma kezelés a sóoldattal kezelt kontroll halakhoz képest még spermamennyiségi többletet indukált, és ahogy korábban is megemlítettem a progresszív motilitási értékeket is jelentős mértékben megemelte. A gyakorlati- és a kísérleti halszaporításban is éppen az ivarsejtek végső beéréséért, ovulációért alkalmazzunk hormonkezelést különféle szinteken a neurohormonális szabályozásban (hipotalamusz szinten – GnRH analógok, GnRH analógok és dopamin receptor antagonisták kezelése; agyalapi szinten – hipofízis, hCG, PMSG kezelése; gonád szinten – 17α , 20β , 21-trihidroxipregnen-3-one). A módszer alkalmazásának vannak korlátai, amely még jelentős kutatást igényel:

- korábban említett minimum dózis meghatározás
- immunológiai folyamatok nyomonkövetése a kezelést követően is
- standardizálni az alkalmazást (például természetes állapotban gyűjtött, vagy hormonkezelt ponty tejesek alkalmasabbak szemínális plazma gyűjtésre a benne lévő hormonkoncentrációkat is figyelembe véve.
- további vizsgálatokat tervezni arra nézve, hogy alkalmasak lehet-e ovuláció kiváltására is, illetve, ha igen, akkor az oociták milyen fejlődési stádiumba érzékenyek a szemínális plazma szteránvázas hormonjaira. Angolna szaporításban általánosan alkalmazzák a 17α , 20β , 21-trihidroxipregnen-3-one ikranyerésre (pl. NAGAHAMA, 1997; MÜLLER et al., 2012). A szemínális plazmában a MIS hormon-t kimutatták (HAJIREZAEI et al., 2012, 2013). Korábbi vizsgálatunk alkalmával (GAZSI et al., 2021) sikerült sperma inszeminációval egyéb hormonhatású anyag kezelés mellett

spontán ikraszórást elérni zebradánió fajban. Elképzelhető, hogy a szeminális plazmában lévő ivarhormonok felszívódva a petefészekfalán keresztül és bejutva a szisztémás vérkeringésbe okoztak részleges ovulációt.

Amennyiben valóban sikerül ezzel az anyaggal ovulációt elérni, úgy a hipofízis kezeléssel szemben a szeminális plazma gyűjtéshez nem szükséges a donor halat elpusztítani. Ez jelentős eredmény lenne, illetve olyan akvakultúrás termelésben használni, ahol mesterséges hormonkészítmények beszerzése korlátozott (egyes afrikai és dél-kelet ázsiai országok elsősorban).

6 Összefoglalás

A perzsa tok (*Acipenser persicus*) és a kaszpi sebes pisztráng (*S. trutta caspius*) sperma szeminális plazmája különféle androgéneket tartalmaz, mint például tesztoszteront, 11-ketotesztoszteront, progeszteront és 17α , 20β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-one-t, így ezek a vegyületek feltételezhetően a pontyfélék (zebradánió, ponty) szeminális folyadékában is megtalálhatóak.

Jelen kísérletünkben célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, hogy natívan gyűjtött ponty sperma előkezelést követően milyen hatással bír a „szeminális plazmával kezelt” halak spermatermelésre. Valamint meghatározni a ponty szeminális plazma hormontartalmának összetételét.

A szeminális plazma gyűjtéséhez 4 darab 3 nyaras pontyot választottunk ki. A pontyokat 1 pellet/ 1ml 0,89% NaCl oldat / testtömegkilogramm dózisú ovopellel kezeltük a farokalatti úszóinak tövébe intraperitoneálisan injektálva. A gyűjtött ivarterméket ml-enként 1,5 ml-es eppendorf csövekbe, majd ezek után centrifugáltuk 10.000 g-n 5 percig. A gyűjtött szeminális plazmát felhasználásig -80°C hűtőben tároltuk. A gyűjtött szeminális plazma egy részét a Spektrum-Lab Kft-hez szállítottuk bevizsgálásra.

A kezelésre saját szaporítású Hévízi pontyokat használtunk fel. 2 csoportot alakítottunk ki, csoportonként 4-4 hallal. A kezelés előtt lemértük a halak testtömegét és gyűjtöttünk ivarterméket is. A gyűjtött sperma paramétereit CASA rendszerrel mértük. Az egyik csoportot szeminális plazmával kezeltük, a másikat pedig fiziológias sóoldattal, mindkét esetben 0,5 ml-re mennyiséggel. A kezelés után 24 órával ismét megmértük a testtömegüket és gyűjtött ivarterméket CASA rendszerrel vizsgáltuk ismét.

Egyértelműen látható, hogy mind a NaCl oldat, mind a szeminális plazma a spermatermelést megemelte, elsősorban a szeminális plazma mennyiséget. A kis elemszám és a nagy egyedi különbségek miatt a kontroll csoport kezelés előtti és utáni eredménye nem volt statisztikailag igazolható $p < 0,05$ szinten. Abszolút értékben a sejtkoncentráció csökkent. Relatív mennyiségeket tekintve azonban mindkét kezelés a sejtmennyiséget a megnövekedett összmennyiségnek köszönhetően emelt. A progresszív motilitási értékeket tekintve statisztikailag igazolható módon nem volt különbség a csoportok között, ami szintén a nagy egyedi különbségeknek és a kis elemszámnak tudható be.

További vizsgálatok szükségesek a szeminális plazmával történő indukált szaporítás fejlesztéséhez.

7 Irodalomjegyzék

- Alavi, S.M.H., Cosson, J. (2005) Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* 29, 101–110.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J. (2006) Sperm motility in fishes (II) Effects of ions and osmolality a review. *Cell Biology International* 30(1), pp.1–14.
- Antalfi A., Tölg I (1968) Növényevő halak. Mezőgazdasági kiadó, Budapest, 155.p
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Brenton, B. (1982) Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 65-79
- Bógó, B (2021) Hévízi törpenövésű vadponty ex situ és in situ konzervációbiológiai kutatások. Szakdolgozat, pp 1-49. (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, kézirat).
- Bógó, B., Ferincz, Á., Horváth, J., Staszny, Á., Tóth, A., Ivánovics, B., Specziár, A., Weiperth, A., Lenta, V., Müller, T. (2022): Természetes pontyívás minden évben...téli. *Halászat*, 115(1): 22.
- Ciereszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K. (2000) Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Szerk.) *Cryopreservation in Aquatic Species*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p. 20-48.
- 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.
- Grier, H., Neidig, C. (2011) Gonads and Gametes of Fishes. In: Tiersch TR, Green CC (eds) *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd edn, World Aquaculture Society, pp 19–32.
- 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 Pathol* 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*. *Journal of Applied Biological Sciences* 6 (1): 41-43.
- Hajirezaee, 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.
- Horváth L. (1980) A ponty (*Cyprinus carpio* L.) petefejlődésének elemzése és szabályozása. Haltenyésztési Kutató Intézet, Szarvas, 166 p.
- Horváth L., H. Tamás G. (1976) A harcsa (*Silurus glanis* L.) szaporítás és az ivadékelőnevelés módszerének továbbfejlesztése. *Halászat* (69), Tudományos melléklet, pp. 11-13
- Horváth L., Magyary I. (2008) A halak szaporodásbiológiája. pp 74-113. In: Hancz (szerk), Haltenyésztés. egyetemi jegyzet, Kaposvári Egyetem, Kaposvár pp 1-262.
- Horváth L., Urbányi B. (2000) A ponty szaporítási módszerei. In: Horváth L., Urbányi B. (szerk.): Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda kiadó, Budapest, 440 p., 236-248. p.

- Horváth L., Urbányi B. (2000) Általános szaporodásbiológia. In: Halbiológia és haltenyésztés (egyetemi tankönyv). Szerk: Horváth, L. Mezőgazda Kiadó, Budapest 168-180. p.
- Horváth L., Urbányi B. (2000) Halak szaporodásbiológiája. In: Horváth L. (szerk.). Halbiológia és Haltenyésztés. Mezőgazda kiadó, Budapest, 440 p., 214-343. p.
- Horváth L., Urbányi B. (2004) Tógazdálkodás. SZIE szakmérnöki jegyzet, Gödöllő, 125 p.
- 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* Linnaeus). Állattani Közlemények 95(1), 25–33 (in Hungarian with English abstract).
- Horváth, L., H. Tamás, G., Tölg, L. (1984) Special methods in pond fish husbandry. Akadémia Kiadó, Budapest, Halver Corporation, Seattle, 147 p.
- 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., 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, Rome, 32 p.
- Ittész Á. (2017) Újszerű módszer a halszaporításban. TDK dolgozat, Szent István Egyetem, Gödöllő, 43 p.
- Jaczó, I., (1953) Kísérletek a kecssege mesterséges szaporítására a Dunán Hidrológiai Közlöny 33. 3-4, pp.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.
- Kása, E. (2017) Halsperma és -spermatogóniumok vitrifikációja. Doktori disszertáció, pp 1-103. (Szent István Egyetem, kézirat).
- Kiss, I. (2000) Az ivarszervek felépítése. In: Halbiológia és haltenyésztés (egyetemi tankönyv). Szerk: Horváth, L. Mezőgazda Kiadó, Budapest 45-80.
- Kolešová, S.A., Kotas, P., Štěřba, 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.
- 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 Journal of Fish Aquatic Sciences 381 (14), 831–834
- KSH (2020) Idősoros éves adatok. Hús és haltermelés.
- KSH (2023): <https://statinfo.ksh.hu/Statinfo>
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdá, J. (2009) Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. General Comparative Endocrinology 165 (3.) 367-389
- Mézes M. (2000) Halélettan. In: Horváth L. szerk Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp.69-98.
- Molnár, K., Székely, C., Baska, F., Müller, T., Zuo, S., Kania, P.W., Nowak, B., Buchmann, K. (2019) Differential survival of 3rd stage larvae of *Contracaecum rudolphii* type B infecting common bream (*Abramis brama*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Parasitol Res., 118(10): 2811-2817.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. & Yasuda, K. (1983) Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Animal Science 107, 95–103.

- Müller, T. (2022) Keltetőházi halszaporítási gyakorlattól eltérő új- és újszerű módszertani eljárások. Akadémia dolgozat (kézirat), p 1-101.
- 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. (2020b) 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 31.
- 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., Horváth, L., Szabó, T., Ittész, I., Bognár, A., Faidt, P., Ittész, Á., Urbányi, B., Kucska, B. (2018a) 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., Gutti, Cs., Csorbai, B., Kovács, B., Szabó, T. (2018b) Successful, induced propagation of African catfish (*Clarias gariepinus*) by ovarian lavage with sperm and hormone mixture. *Aquaculture* 485, 197-200.
- Müller, T., Kucska, B., Szabó, T., Horváth, L., Horváth, Á., Ittész, I., Havasi, M., Urbányi, B. (2020c) A magyar halszaporítás technológia kutatások sarokkövei és egy új indukált szaporítási mód bemutatása. Állattenyésztés és Takarmányozás (in press)
- 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 (2), 69-76.
- Müller, T., Ferincz, Á., Weiperth, A., Ivánovics, B., Bógó, B., Horváth, J., Urbányi, B., Specziár, A. (2024). Uncommon life history and winter spawning of common carp (*Cyprinus carpio*) in a natural thermal spring, under temperate climate. *Fish Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01305-w>.
- Nagahama Y.M. (1997) 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62(1), 190-196.
- Nagahama, Y. (1983) The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S., Randal, D.J. and Donaldson (editors) *Fish Physiology*, vol. IX. Reproduction. E.M. Academic press, San Diego. pp 223-276.
- Pintér K. (1989) Magyarország halai. Akadémia Kiadó, Budapest, 202 p.
- Saad, A., Billard, R., Theron, G. M., Hollebecq, G. M. (1988) Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture* 71, 133-150.
- Specziár A., Staszny Á., Horváth Á., Urbányi B., Müller T. (2013) A hévízi törpenövésű magyar vadponton populációbiológiai és morfológiai vizsgálata (2007-2013). XXXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, HAKI Szarvas, 2013. máj. 22-23, 57 p.
- Specziár, A. (2004) Life history pattern and feeding ecology of the introduced eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in a thermal spa under temperate climate, of Lake Hévíz, Hungary. *Hydrobiologia*, (522): 249–260.

- Széky, P. (1963). Mit tudunk a halak mellékveséjéről és hasnyálmirigyéről? Halászat IX. 56(5): 135.
- Varga, D., Müller, T., Specziár, A., Fébel, H., Hancz, Cs., Bázár, Gy., Szabó, A. (2013) Note on the special fillet fatty acid composition of the dwarf carp (*Cyprinus carpio carpio*) living in thermal Lake Hévíz, Hungary. Acta Biologica Hungarica, 64: 38–48.
- Varga, D., Müller, T., Tóth, B., Hancz, Cs. (2021). Length-weight relationship of the endemic dwarf carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) living in thermal Lake Hévíz, Hungary. AACL Bioflux 14(5), 2791- 2796.
- Várkonyi L., Specziár A., Horváth L., Urbányi B., Müllerné Trenovszki M., Müller T. (2014) Hévízi törpenövésű vadponty indukált szaporítása az élőhelyén. XXXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás. Szarvas, 2014. május 28-29, 11 p.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L. (2007) Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. Theriogenology 67, 661–672.
- Woynarovich, E. (1962) A pontyikra Zuger-üveges érlelése és az ivadék nevelése 10 napos korig. Halászat (55): 14-15.
- Woynarovich, E., Horvath, L., (1980) The artificial propagation of warm-water finfishes: a manual for extension. FAO Fish. Tech. Paper, FAO, Rome. 183 p.

8 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk megköszönni a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet vezetésének, hogy lehetőséget biztosítottak arra, hogy az Intézet keretein belül végezhattük munkánkat. Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Prof. Dr. Urbányi Bélának, Prof. Dr. Müller Tamásnak, hogy dolgozatom elkészítése során mindenben a segítségemre álltak. Továbbá köszönöm mindazoknak, akik a kísérlet során és a dolgozat elkészítése során támogattak.

A dolgozat a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-22-2-1 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: **Bógó Zsolt Bence**
A Hallgató Neptun kódja: **A17KFR**
A dolgozat címe: **Halszaporítási módszerfejlesztés: natív szeminális plazma kezelés hatása a spermatermelésre (előzetes eredmények)**
A megjelenés éve: **2024**
A konzulens intézetének neve: **Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet**
A konzulens tanszékének a neve: **Természetesvízi Halökológiai Tanszék, Halgazdálkodási Tanszék**

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2024 év április hó 18 nap



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Bógó Zsolt Bence (hallgató Neptun azonosítója: **A17KFR**) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: **igen** nem

Kelt: 2024 év április hó 15 nap

Dr. Urbányi Béla

belső konzulens

NYILATKOZAT

Bógó Zsolt Bence (név) (hallgató Neptun azonosítója: **AI7KFR**) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védésre javaslom

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: **nem**

Kelt: 2024. ápr. 18.

Prof. Dr. Müller Tamás
egyetemi tanár
MATE AKI
Természetesvízi
halökológiai tanszék