

# **DIPLOMADOLGOZAT**

**Horváth József István**

**2023**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**

**Szent István Campus**

**Genetika és Biotechnológia Intézet**

**Mezőgazdasági biotechnológus mesterképzési szak**

**Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) halfajban alkalmazott újszerű  
halszaporítási módszer hatása a lárvák életképességére**

**Belső konzulens:** Prof. Dr. Müller Tamás  
egyetemi tanár

**Belső konzulens  
intézete/tanszéke:** Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet  
Természetesvízi Halökológiai Tanszék

**Belső konzulens:** Varga Ádám  
PhD. hallgató

**Belső konzulens  
intézete/tanszéke:** Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet  
Természetesvízi Halökológiai Tanszék

**Készítette:** Horváth József István

**Gödöllő**

**2023**

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések .....	3
2. Irodalmi áttekintés .....	5
2.1. Halszaporítási módszerek .....	5
2.1.1. Természetes ívatás.....	5
2.1.2. Félmesterséges ívatás .....	5
2.1.3. Indukált keltetőházi/mesterséges szaporítás.....	6
2.1.4. Hormonálisan indukált ivarérelés és szaporítás .....	6
2.2. Inszeminációval történő halszaporítás bemutatása.....	6
2.2.1. Élettani és technológiai háttér, módszer leírás .....	6
2.2.2. Inszemináció módszer sajátosságai .....	7
2.2.3. Az inszeminációs módszer felhasználásának lehetőségei .....	9
2.3. Az afrikai harcra .....	11
2.3.1. Általános bemutatás és gazdasági jelentőség .....	11
2.3.2. Szaporítás .....	13
2.4. A munka előzményei, problémafelvetés .....	15
3. Anyag és módszer .....	16
3.1. Kísérleti helyszín, anyaghalak előélete.....	16
3.2. Első kísérlet .....	17
3.2.1. Hím hormonkezelése, spermagyűjtés.....	17
3.2.2. Ikrások hormonkezelése és inszemináció .....	18
3.2.3. Ikrások elhelyezése, második spermagyűjtés .....	19
3.2.4. Ikrafejés mindkét petefészeklebenyből, termékenyítés.....	20
3.2.5. Ikrainkubáció.....	21
3.3. Második kísérlet .....	22
3.3.1. Kísérleti halak hormonkezelése, inszemináció .....	23
3.3.2. Második spermagyűjtés, termékenyítés .....	23
3.3.3. Ikrainkubáció.....	24
3.3.4. Lárvanevelés.....	25
3.4. Spermaellenőrzés .....	26
3.5. Víztisztaság-vizsgálat .....	27
3.6. Statisztikai elemzés.....	27
4. Eredmények és értékelésük.....	29

4.1.	Eredmények .....	29
4.1.1.	Első kísérlet .....	29
4.1.2.	Második kísérlet .....	30
4.2.	Eredmények megvitatása .....	35
5.	Következtetések és javaslatok.....	39
6.	Összefoglalás .....	40
7.	Irodalomjegyzék .....	42
8.	Táblázatok és ábrák jegyzéke .....	48
9.	Köszönetnyilvánítás .....	49
10.	Melléklet.....	50
11.	Nyilatkozatok .....	51

## 1. Bevezetés és célkitűzések

A Föld lakossága jelenleg már meghaladja a 8 milliárdot, és 2050-re megközelíti a 10 milliárdot. A biztonságos, megfelelő minőségű élelmiszerellátás napjaink egyik legégetőbb problémája. A legfrissebb adatok alapján a globális éhezés 2022-ben elérte a 9,2%-ot, ami a 2019-es statisztikákhoz képest 1,3%-kal nagyobb (FAO, 2023). A jelenlegi mezőgazdasági struktúra nem lesz képes ezt az egyre növekvő igényt kielégíteni, ezért az agrárium átalakítása mára szükségszerűnek tűnik. Olyan fenntartható termelési környezet kialakítására van szükség, amely hosszú távon és fenntarthatóan képes biztosítani a növekvő létszámú emberiség tápanyagigényét, és azon belül is a fehérjeigényt. Ennek a kérdéskörnek az egyik legfontosabb szegmense az akvakultúra szektor. Az ágazat globális szinten folyamatosan növekszik, 2000-ben még nem érte el a 40 millió tonnát évente, azonban 2020-ban már bőven meghaladta a 80 millió tonnát az algatermelés nélkül vett globális akvakultúra termelés (FAO, 2022).

A világ haltermelése 1950 óta átlagosan 3 %-kal nőtt évente, a világ összes halászati termelésének és halfogásának kb. 75%-a kerül közvetlenül emberi fogyasztásra és ezek alapján a világban az egy főre jutó éves fogyasztás halászati termékekből mintegy 20 kg/fő/év. A legfontosabb tendencia, hogy az akvakultúrában termelt halászati termékek mennyisége évről évre növekszik, míg a belvízi és tengeri fogások mennyisége évről évre csökken. Az előrejelzések szerint, hosszabb távon a tengeri halfogások fokozatos csökkenése várható, mely köszönhető a túlhalászatnak és a bevezetett fogási korlátozásoknak. A globális haltermelésnek mintegy 43%-át teszik ki az édesvízi halak, melynek több, mint a 80%-a tenyésztett hal (FAO, 2022).

Az afrikai harcsa világszinten komoly szereppel bír az akvakultúrában, ezáltal igen fontos részét képezi a halhús előállításnak – első sorban a legnagyobb problémákkal küzdő elmaradottabb régiókban. Nagy előnye, hogy a növekedése gyors, és viszonylag alacsonyak a környezeti feltételek iránti igényei, így nem szükséges a legkorszerűbb szaporítási és tartási infrastruktúra kialakítása az üzemi méretű termeléséhez. Hazánk vezető szerepet tölt be az afrikai harcsa termelésében (2020-ban 4051 tonna, Lukácsik et al., 2021) az EU-n belül. Ezt a kedvező pozíciót csak folyamatos innovációval lehet megtartani.

Kutatócsoportunk egy új halszaporítási módszert fejlesztett ki, melynek alapja, hogy a spermium sejtek biológiai aktivitásukat megtartva hosszabb ideig „tárolhatóak” külső megtermékenyítésű halak petefészkekben indukált szaporítás (szaporodás) előtt. Íváskor (ovulációkor) a gaméták együtt ürülnek, és vízaktivációkor bekövetkezik az ivarsejt egyesülés,

termékenyülés. Bár az új halszaporítási módszert (inszeminációval történő halszaporítás) több fajon sikeresen kipróbáltuk - beleértve a pontyot (*Cyprinus carpio*), afrikai harsát (*Clarias gariepinus*), zebra-dániót (*Danio rerio*), amurt (*Ctenopharyngodon idella*), angolnát (*Anguilla anguilla*), dél-amerikai ezüstharsát (*Rhamdia quelen*) és tengeri süllőt (*Dicentrarchus labrax*) - a különböző rendbe tartozó halakat „modellként” vizsgáltuk, hogy feltárjuk a módszer előnyeit és hátrányait. A múlt évben megfigyelésünk alapján a hagyományos – úgynevezett *in vitro* fertilizáció/száraz termékenyítési eljárás – szaporításból származó utódok életképessége elmaradt az inszemináció szaporításból származó utódok életképességétől. Mivel a vizsgálat nem erre irányult, hanem egy kontroll kísérleti részeredményt képezett, így nem tudtuk eldönteni, hogy ez egy egyszeri véletlen fellépő eredmény volt, vagy a módszer sajátosságaiból adódó ismételhető kimenet. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a spermiumok petefészekbeli tárolása során olyan szelekciós folyamatok zajlanak le (például spermium verseny, sperma kompatibilitás stb.), amelyek során életerősebb ivadékot nyerhetünk. A kérdés megválaszolására további kísérletsorozatokra volt és van szükség, amelynek részét képezi jelenlegi munkánk is.

Jelen kísérleti ciklusunkban célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk és összehasonlítsuk az *in vitro* fertilizációból, és az inszeminációs halszaporításból származó utódok életképességét és növekedési tulajdonságait.

## 2. Irodalmi áttekintés

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. A következőkben a hagyományos halszaporítási módszereket, valamint a kutatócsoportunk által kifejlesztett úgynevezett inszemináció szaporítási módot mutatom be.

### 2.1. Halszaporítási módszerek

Az ivadék előállítás érdekében a legfőbb alkalmazható klasszikus szaporítási eljárások a következők:

#### 2.1.1. Természetes ívatás

A módszer azon alapul, hogy a természetes, ívási körülmények egy mesterséges környezetbe lesznek átültetve, amiben az ivarérett halak számára íváásra kedvező körülményeket biztosítunk. A módszer alapján a halastavi gazdálkodásban elterjedt a Dubics-módszerre épülő kistavas ívatás és a nagytavi ívatás. Elsősorban a pontyfélékre alkalmazható halastavi módszer úgy működik, hogy a tavasszal a frissen elárasztott, sekély és fűvel, vagy finom szálú vízinövényzettel borított területen a halak leívnak, így olcsó ivadék állítható elő. A természetes szaporodás ideális feltételei mellett a nagytavi ívatásnál igen nagy mennyiségű ivadék állítható így elő (Horváth és Urbányi, 2000). A legnagyobb mennyiségben tartott laborhalfaj, a zebradánió szaporítást is ezzel a módszerrel oldják meg (Nasiadka és Clark, 2012).

#### 2.1.2. Félmesterséges ívatás

Az ívás időzítését, valamint a szaporodást kiváltó tényezőket részben hormonkezelésekkel szabályozzák. Ezután az anyahalakat visszahelyezik olyan környezetbe, ami a természetes ívóhelyüket utánozza. Az ívási környezet kiválasztása során azt veszik figyelembe, mely környezet biztosítja a legjobb esélyt az utódok túlélésére és a faj fennmaradására az adott faj szempontjából. Ez a módszer napjainkban is használatos a szaporítás során, például tógazdasági körülmények között süllő (*Sander lucioperca*) fajban (Tamás et al., 2006; Demska-Zakes és Zakes, 2002), de elterjedt a labor körülmények között angolnafélek (*Anguilla* spp.) indukált ívatása során is (Di Biase et al., 2016; Okamura et al.,

2014; Mordenti et al., 2014). A szaporodás hatékonysága, azaz a megszülető utódok száma nagy mértékben függ a feltételek optimális voltától, jelentős faji és egyedi különbségeket mutathat (Horváth és Urbányi, 2000).

### **2.1.3. Indukált keltetőházi/mesterséges szaporítás**

A szaporodásra felkészült halakban hormonkezeléssel helyettesítik a szaporodást kiváltó környezeti tényezőket. Ennek hatására az ikra leválásának folyamata és a spermiumok termelődése mesterséges környezetben, az ivási feltételek hiányában is bekövetkezik. Ezzel fölöslegessé vált az ivási környezet lemásolása (a természetes ívatással és a félmesterséges ívatási módszerrel szemben), amely egyes halfajok mesterséges tartásakor egyáltalán nem, vagy csak körülményesen valósítható meg (Horváth és Magyary, 2007; Müller, 2022). Az íváásra felkészült halaknál hormonkezelést alkalmaznak, ezután a halakból kinyert ivartermékkel termékenyítnek. A megtermékenyített ikrát egy mesterséges, keltetőházi környezetben keltetik, amely így folyamatos kontroll alatt van. Ennek eredményes műveléséhez szakaszosan tagolt szaporítási technológia szükséges a pontos előírások szerint (Horváth és Urbányi, 2000). A legtöbb gazdasági halfajunkat ponty, csuka (*Esox lucius*), harcsa (*Silurus glanis*) ezzel a módszerrel szaporítják, de ma már egyre több, a pontyfélékhez tartozó halfajt, mint a domolykót (*Squalius cephalus*, Bernáth et al., 2023) vagy jászt (*Leuciscus idus*, Molnár et al., 2019) is sikerült így szaporítani.

### **2.1.4. Hormonálisan indukált ivarérlelés és szaporítás**

A halak indukált ivarérlelése azt jelenti, hogy az íváásra felnem készült halban először a gametogenezist (ivarsejtképződés) ösztönzik különböző hormonkezelésekkel (hosszantartó több hetes kezelés mindkét ivarban), majd az íváásra felkészült ikrásokban egy döntő adagú hormonkezeléssel váltják ki az ovulációt. A tejesek esetében erre nincs szükség, mert a spermatermelés folyamatos. Elsősorban angolna fajok (*Anguilla spp.*) szaporításakor alkalmazzák (Ohta et al., 1995; Mordenti et al., 2014; Müller et al., 2012).

## **2.2. Inszeminációval történő halszaporítás bemutatása**

### **2.2.1. Élettani és technológiai háttér, módszer leírás**

A valódi csontshalak (Teleostei) taxonjába tartozó fajok nagy része a valódi, külső megtermékenyítésű halak csoportjába tartozik, a spermiumok a vízaktivációig (ívás) inaktív



állapotban vannak. Az aktivációt a spermiumokat körülvevő folyadék ozmolalitásának csökkenése váltja ki (Müller et al., 2020b). Horváth et al. (2010) bizonyították, hogy a petefészek által termelt-, az ovulált oociták idő előtti aktiválódását, az oociták túlérését megakadályozó folyadék (ovariális folyadék) vízzel hígítva képes hosszabb ideig magas értéken tartani a spermiumok motilitását ponty fajban. Az új halszaporítási módszer koncepciója alapján a petefészek ozmocomform környezetében a spermiumsejtek hosszabb ideig is „tárolhatóak” aktiváció nélkül (Müller et al., 2020b). Ovulációkor a folliculáris tokból kiszabaduló oociták felszínére feltapadnak a (még inaktív) spermiumsejtek, majd együtt ürülnek a genitális nyíláson keresztül a külvilágba. Vízzel érintkezve ezek a spermiumok aktiválódnak, és képesek megtermékenyíteni a szintén aktiválódott petesejteket.

A fenti elgondolás alapján kidolgozott petefészek inszemináció módszere egyszerű; a programozott ívársra felkészített és bődított ikrások petefészeklebensébe fecskendően rögzített szonda vagy katéter segítségével juttatjuk az előzőleg gyűjtött és minőségellenőrzésen átesett, egy-vagy több híműl származó, kevert sperma adagot/adagokat. A katéter könnyen irányítható, lehetőség van a petevezetékeken keresztül célzottan a jobb vagy a bal petefészeklebensét kezelni. Kisméretű halakban (pl. zebadánió: testméret 2-2,5 cm) a sperma befecskendezést automata pipettával vagy kapillárrissal is meg lehet oldani. (Müller et al., 2020b; Gazsi et al., 2021a,b).

## **2.2.2. Inszemináció módszer sajátosságai**

### ***2.2.2.1. A sperma életképességének/termékenyítőképességének megőrzése a petefészekben az idő és a spermamennyiség függvényében***

Müller et al. (2020b) megfigyelték, hogy afrikai harcsa esetében az ovuláció előtt 36 órával feljuttatott hímivar-sejtek is megőrizték termékenyítőképességüket. A 48 óra elteltével a termékenyülési és kelési értékek is nagymértékben lecsökkentek. A tengeri sügérben vagy más néven farkassügérben a petefészeklebensékből visszanyert sperma életképessége hasonlóan 40 óra körüli, ezt követően jelentős mértékben lecsökkent, illetve megszűnt a spermasejtek vízakivációt követő mozgóképessége (Bodur et al., 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, ami önmagában az ivarsejtek biológiai sajátosságaira utal fajtól függetlenül. Pontyban és a dél-amerikai ezüstharcában a keltetőházi gyakorlatnak megfelelő döntő hormonkezeléssel egy időben (10-12 órával az ovulációt megelőzően) inszeminált spermiumok sikeresen termékenyítették az ikratételeket (Müller et al., 2018a, Ittész et al., 2020).

#### ***2.2.2.2. Sperma szeminális plazma, mint hormonvivő anyag***

Korábban számos szerző által bizonyítást nyert, hogy a petefészeklebenszövetekbe juttatott hormonkészítmények a petefészekfalán is felszívódnak, és ovulációt indukálnak (Watson et al., 2009a,b; Németh et al., 2012). Müller et al. (2018) és Ittész et al. (2020) porított pontyhipofízist keverték frissen fejt spermával, és ezt a mixet juttatták fel az ikrások petefészeklebenszövetébe. Mindkét fajban a sperma szeminális plazma felszívódásával a petefészekfalán keresztül a GtH hormon is bejutott az ikrások szisztémás keringésébe, és ovulációt indukált. A kifejt gamétákat (ikra és felszínére tapadt spermiumsejtek együttesen) vízakivárással termékenyítették, a termékenyülési arány nem különbözött a kontroll halak értékeitől. Ezzel a módszerrel a hormonkezelést és a sperma bejuttatást egy időben, egy kezeléssel meg lehet oldani.

#### ***2.2.2.3. Sikeres utódlétrehozás ivás vagy ivatásos módszer alkalmazása során, hím jelenléte nélkül***

Zebradánió fajban hormonkezelés nélkül, csak sperma injektálást követő fényprogram alkalmazásával sikerült spontán ikraszórással bírni az ikrásokat (parciális ovuláció következett be, hagyományos ivatáshoz képest 60-75%-kal kevesebb ikra ovulált) tejesek jelenléte nélkül. Az ikrákból sikerrel lehetett lárvákat keltetni (Gazsi et al., 2021b). Az ikrások petefészkébe injektált és ott tárolt sperma feltétlenül szükséges, de egyidejűleg ivó tejes jelenléte már nem feltétel a sikeres utódlétrehozáshoz, amennyiben (akár részleges, vagy teljes) ovulációra lehet bírni az ikrásokat (Gazsi et al., 2019a). Süllő fajban én is részt vettem hormonkezelést és inszeminált ikrások szaporodási jellemzőinek feltárásában (Horváth, 2023; Varga et al., 2022). Tíz hormonkezelést követően 9 ovulált, és szórta el az ikratételeit a hormonkezelést követő 83-154 óra között (nem volt egységes beérési idő). A petefészekbe feljuttatott sperma 0-84%-ban termékenyítette az ikratételeket. Azonban hátrányként jelentkezett még, hogy tejesek nélkül elmaradt az ivó hímek által kiváltott körkörös násztánc, emiatt az ikrások döntő többsége egy pontba, egymásra rétegezve tette le az ikratételét az alájuk behelyezett műfészkekre.

#### ***2.2.2.4. Mélyhűtött sperma felhasználása sperma injektációs módszer esetén (mélyhűtött sperma felhasználása indukált ivatás esetén)***

Müller et al. (2019) kísérletükben afrikai harcsa spermát fagyasztottak le egy már korábban leírt protokoll alapján, majd felolvasztást követően a műszalmából származó mintákat Eppendorf-csővekbe gyűjtötték, és centrifugálták. A szeminális plazmában lévő hígítót és metanol védőanyagot eltávolították a kicentrifugált sejtpogácsa (centrifugálás után az

Eppendorf alján összegyűlt spermiumtömeg) felszínéről. A spermiumokat nem hagyták kiszáradni, hanem natív pontyspermából származó szeminális folyadékkal töltötték fel. Az így nyert elegyet (afrikai harcsa sperma + ponty szeminális folyadék) inszeminálták afrikai harcsa ikrásokba hormonkezelésükkel egyidejűleg (intramuszkuláris kezelés – ponty hipofízis kivonat). A termékenyítési tesztek során minden halfaj ikratételében sikerült termékenyülést kimutatni, azonban a kelési százalék (18%) elmaradt a kezeletlen kontroll csoport értékeitől (61%). Ez a modellkísérlet szolgálhat alapul ahhoz, hogy ívatásos módszer esetén is lehet alkalmazni mélyhűtött spermát.

### **2.2.3. Az inszeminációs módszer felhasználásának lehetőségei**

#### **2.2.3.1. Felhasználás gazdaságilag jelentős halfajok esetében**

Hazánkban a gazdaságilag jelentős halfajok szaporítási technológiája nagymértékben az *in vitro* termékenyítési (IVF) eljárásra alapozott. Számos ázsiai országban (kiemelendő Kína) azonban még a mai napig az ívatásos módszer jelenti a halszaporítás gerincét (Horváth et al., 2015). A tengeri akvakultúrában (pl.: tengeri süllő/farkas sügér, aranydurbincs (*Sparus aurata*)) is komoly jelentősége van az ívatásos módszernek (Bodur et al., 2019). A sperma inszeminációs eljárással irányíthatóvá válik a keresztezés (korábban korlátozottan volt kivitelezhető), egységnyi területről több ivartermék gyűjthető. Az értékes hímek spermájával (akár mélyhűtött spermával is) nagyobb mennyiségű, több ikrás ikratétele termékenyíthető egyidejűleg, valamint a kevert spermaadagok feljuttatásával potenciálisan növelhető a genetikai változékonyság (Müller, 2022, 1. táblázat). Az akvakultúrában az olyan gazdaságilag jelentős halfajok szaporítási technológiájának kidolgozásához is hozzájárulhat, amelyeknek a szaporítása nehézkes, vagy még nem megoldott (pl.: pettyes farkashal (*Anarhichas minor*). A pettyes farkashalat korábban még nem sikerült leívatni kontrollált körülmények között (Santana et al., 2020). Az inszeminációs módszerrel áthidalhatóak a faj szaporítása során felmerülő problémák (kis mennyiségű sperma rövid ideig tárolható, nem szinkronizálható az ikraszórás (Kime és Tveiten, 2002; Müller, 2022).

**1. táblázat:** A hagyományos ívatás és inszemináció szaporítási módszerek közötti elméleti összevetés külső megtermékenyítésű halfajok esetén  
(Forrás: Müller, 2022 nyomán)

	Hagyományos ívatás		Ívatás előtt inszemináció	
	Ivar arány ♀:♂	Egységnyi területről megtermelhető elvi ikramennyiség	Ivar arány ♀:♂	Egységnyi területről megtermelhető elvi ikramennyiség
3 hal / egységnyi hely (úgynevezett kistörzsös ívatás)	1:2	n	2:1	2n
5 hal / egységnyi hely (úgynevezett nagytörzsös 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	

### 2.2.3.2. Természetvédelmi célú halszaporítás

Az inszeminációs eljárással kiküszöbölhetőek a hagyományos halmentés és a különböző természetvédelmi célú halszaporítási programok során felmerülő nehézségek (2. táblázat). Mivel a tejesekre fizikailag nincs is szükség az íváskor, ezért vérfrissítés esetén a különböző ektoparaziták behurcolásának valószínűsége minimalizálódik inszemináció alkalmazása esetén. A tejesek spermatermelése ívási időszakban állandó, emiatt az eredeti élőhelyükön is részt tudnak venni az ívásban. A módszer felhasználásával egy ikrástól származó ikratételt több tejestől származó spermaadagok tudják termékenyíteni, ezáltal a genetikai diverzitás növelhető. A veszélyeztetett populációk esetében ezáltal elkerülhetők az állományokat potenciálisan érintő káros genetikai folyamatok (beltenyésztettség, palacknyak hatás, káros mutációk felhalmozódása stb.) (Fernández és Caballero, 2001; Woodworth et al., 2002; Fuller és Doyle, 2018; Müller, 2022). Az inszeminációs eljárással nem csak, hogy megelőzhetőek lennének ezek a folyamatok, de a már beltenyésztett populációk esetében fontos eszköz lehetne a genetikai diverzitás növelésének (vérfrissítés élőhelyen). Akár spermabankból származó spermaminták is felhasználásra kerülhetnek a célok megvalósítása érdekében (Müller, 2022).

**2. táblázat:** Mentett állományok szaporításával és kitelepítésével foglalkozó módszerek összevetése (irányított szaporítás = ívató ketrecek alkalmazása)  
(Forrás: Müller, 2022 nyomán)

	Tradicionális állomány mentés	Irányított szaporítás	Új módszerű szaporítás (inszemináció)
Szaporítási/keresztelési stratégia			
	Random párválasztás, több a tejes	Irányított párválasztás	Több tejesből származó sperma az "A" populációból (sperma gyűjtést követően visszatelepítés)
A populáció(♂♀); B populáció(♂♀) szükséges szülők	A♀ 1: A♂ >1 B♀ 1: B♂ >1	A♀ 1: B♂ 1 B♀ 1: A♂ 1	A♀ ∅: A♂ ∅ B♀ 1: B♂ 1
Szülői génohhozjárulás az utódgenerációban (♀:♂)	1:1	1:1	1:1 ≤
Mentett élőhely I. generáció genetikai háttere (♀♂)	Példa: 1 ikrás és 3-3 tejes esetén 2 a 12 lehetséges variációból: 1; <b>AA,AA,AA,AB,AB,AB</b> 2; <b>BB,BB,BB,BA,BA,BA</b>	<b>AB, BA</b>	Példa: 1 ikrás és 1 tejes esetén B populáció, de 3 különböző tejesből származó sperma részvétele mellett <b>BA+BA+BA+BB</b>
Várható utódszám	n	n <	n <
Parazita átviteli esély	mindkét élőhelyről	mindkét élőhelyről	csak a B populáció élőhelyéről

## 2.3. Az afrikai harcsa

### 2.3.1. Általános bemutatás és gazdasági jelentőség

Az afrikai harcsa (*C. gariepinus* Burchell, 1822) (1. ábra) a zacskósharcsafélék (Clariidae) családjába tartozik több mint 100 másik fajjal együtt. A halfaj az afrikai kontinens egészén, Törökország déli területein, valamint Kis-Ázsiában őshonos (Péteri et al., 1989). Teste hosszúka, hengeres. Feje nagy, a legtöbb harcsaféléhez hasonlóan felülről lapított, ami jelentős vágási veszteséget is jelent. Nagy száját kívülről 8 bajusszal határolja, szeme a testéhez viszonyítva kicsi. Rendkívül hosszú hátúszóval rendelkezik, bőre pikkelytelen, színe a háti részen szürkés-márványozott, a hasi részen piszkos-fehéres (Harka és Sallai, 2004). A halfaj

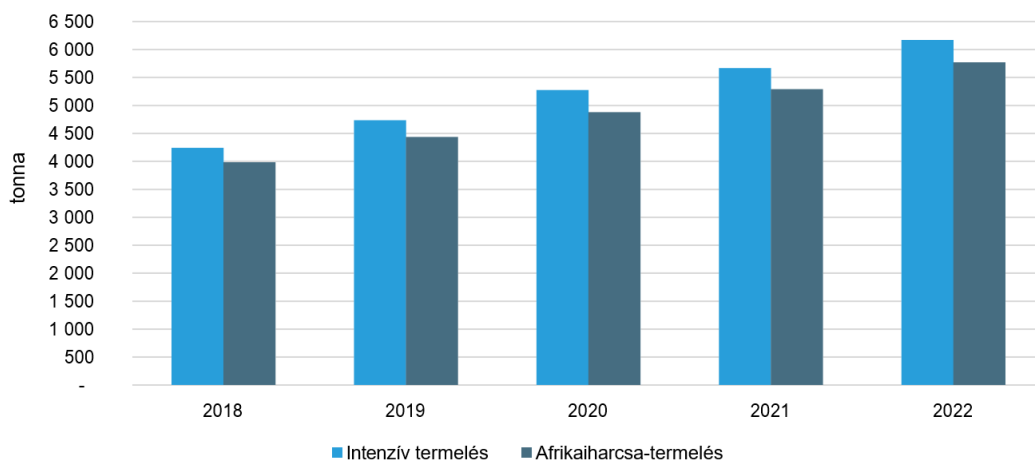
számára a magas (25-30 °C-os) vízhőmérséklet az ideális, 20 °C alatt csökken a bakteriális fertőzések iránti toleranciája, mesterséges rendszerekben 16 °C alatt általában elpusztul. A maximális vízhőmérséklet 39-40 °C, amelyet képes még elviselni. A kopolyúüregében található kisegítő légzőszervvel a légköri oxigén hasznosítására is képes. Ez a képesség létfontosságú az eredeti élőhelyén való túléléséhez. (Péteri et al., 1989). Ivarérettségét nagyon gyorsan eléri – környezettől függően 6-18 hónap alatt -, de általában 8-9 hónapos korban már biztonsággal szaporíthatók (Péteri et al., 1989; Radics, 1990). Hazánkba teljesen véletlenül került be a halfaj, de a szakemberek miután felismerték a benne rejlő gazdasági potenciált, nyomban termelésbe vonták (Woynárovich, 1996).

**1. ábra:** Az afrikai harcsa (fotó: Dr. Ferincz Árpád)



A zacskóharcsafélék családjába tartozó Clarias nembe tartozó fajok (*Clarias* spp.) össztermelése 1,249 millió tonna, amivel az édesvízi haltermelésben a 10. helyet foglalják el (FAO, 2022). Az afrikai harcsát az elmúlt 20 évben egyre nagyobb mennyiségben termelik, 2021-ben 239 000 tonnát állítottak elő akvakultúrában. A halfaj pozitív adottságaiból adódik termelési mennyiségük folyamatos növekedése; gyors növekedés, környezeti paraméterek iránti tolerancia, nagy technológiai tűrőképesség stb. (FAO, 2021; Kiss, 2023). A világon legalább 50 országban tenyésztik, ezek közül is Nigéria a legnagyobb termelő, megelőzve Magyarországot és Hollandiát (Srimai et al., 2020; FAO, 2021). Az Európai Unióban Magyarország piacvezető az afrikai harcsa termelésben (Lukácsik et al., 2021). Hazánkban ez a halfaj képezi az intenzív rendszerű haltermelés gerincét, 2022-ben az ilyen módon előállított halhús 93,6%-át (5778 tonna) adta az afrikai harcsa (Kiss, 2023, 2. ábra).

**2. ábra:** A hazai intenzív termelés és az afrikai harcsa termelésének változásai a 2018-2022-es időszakban  
(Forrás: Kiss, 2023)



Forrás: AKI ASIR

### 2.3.2. Szaporítás

Természetes élőhelyén a faj természetszerű szaporítását – elsősorban azokban a régiókban, ahol az infrastruktúra felszereltség alacsony szinten áll - kis méretű tavakban, medencékben végzik, ahol rendszerint a vízszint éjszakai emelésével váltják ki az ívást. Mára természetesen a keltetőházi (mesterséges) szaporítási eljárás vált a világon meghatározóvá. Intenzív rendszerben tartott anyahalak elvesztik ivari ciklusuk szezonálisát, így az optimális tartási körülmények mellett akár havonta is szaporíthatóak. Ezen kedvező tulajdonsága miatt a kutatásokban is kedvelt modell. Az általános szaporítási technológia alapját a száraz termékenyítési eljárás (*in vitro* fertilizáció) adja, amely során az ikrás anyahalakat hormonindukcióval készítik ovulációra (különbéle hormonkezelések összefoglalása 3. táblázatban), a hímeket általában nem hormonkezelik. Az ikrásokból a programozott ovuláció bekövetkezése során kifejt ikradagokat a hímek előlése után a műtéti úton eltávolított herékből nyert spermával termékenyítik (Péteri et al., 2015). Ebbe a témakörbe tartozik az ivarsejtek mélyhűtése is. Az utóbbi években a haltudományokban is felgyorsultak elsősorban a sperma mélyhűtésével kapcsolatos kutatások, melyekben a hazai szakemberek eredményei jelentősek (Urbányi et al., 1999; Horváth és Urbányi, 2000; Miskolczi et al., 2005; Kovács et al., 2010).

### 3. táblázat: Különböző hormonkészítmények alkalmazása afrikai harcsa ikrásokban (Forrás: Quyen, 2023 nyomán módosítva)

Hormon	mód	vívőanyag	dózis/ttkg	O(%)	Irodalom
LHRHa + PIM	IP	0.8% NaCl oldat 0.1% SMBS-sel és 0.25% BSA	0,05 mg + 5 mg	100	De Leeuw et al., 1985
LHRHa + PIM	IP	0.8% NaCl oldat 0.1% SMBS-sel és 0.25% BSA	0,05 mg + 5 mg	100	
17 $\alpha$ -OHP	IM	dimetil-izoszorbid	4 mg	100	Richter et al., 1987a
hCG	IM	0.7% NaCl oldat	6900 IU	93	Inyang és Hettiarachchi, 1994
varangy HK	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	4 mg	100	
	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	6 mg	100	
béka HK	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	4 mg	100	
	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	6 mg	100	Salami et al., 1994
hCG	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	2000 IU	100	
harcsa HK	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	4 mg	100	
	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	6 mg	100	
harcsa HK	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	1 gland	100	
mGnRHa+MET	IP	0.7% NaCl oldat	0,05 mg + 10 mg	100	
cGnRH-II+MET	IP	0.7% NaCl oldat	0,05 mg + 10 mg	100	
cGnRH-I+MET	IP	0.7% NaCl oldat	0,05 mg + 10 mg	0	Akpajda et al., 1996
sGnRH+MET	IP	0.7% NaCl oldat	0,05 mg + 10 mg	80	
mGnRH+MET	IP	0.7% NaCl oldat	0,05 mg + 10 mg	35	
PH	IP	0,05 mg + 10 mg	4 mg	100	
GnRHa+pimozid	IP			100	
GnRHa+pimozid	IP	NaCl oldat	0,02 mg + 0,002 mg	100	
GnRHa+pimozid	IP	NaCl oldat	0,02 mg + 0,001 mg	100	Bruska et al., 1999
PH	IM	NaCl oldat	4 mg	100	
Biogonadyl 500	IP	NaCl oldat	800 IU	100	
PH	IP	NaCl oldat	4 mg	100	
GnRHa + DOM (Aquaspawn)	IP	NaCl oldat	20 $\mu$ g + 50 mg	87.5	
PH	IP	0.9% NaCl oldat	4 mg	90	Brzuska, 2004
mGnRHa+MET (Ovopel)	IP	0.9% NaCl oldat	20 $\mu$ g + 10 mg	100	
LHRHa	IM	0.9% NaCl oldat	10 $\mu$ g	68	
LHRHa	IM	0.9% NaCl oldat	30 $\mu$ g	73	
LHRHa	IM	0.9% NaCl oldat	50 $\mu$ g	82	Ude et al., 2005
LHRHa	IM	0.9% NaCl oldat	70 $\mu$ g	85	
PH	IP	0.9% NaCl oldat	4 mg	90	
GnRHa (Gonazon)	IM	gyártó által mellékelt oldatban felhígítva	20 $\mu$ g	100	
GnRHa (Gonazon)	IM	gyártó által mellékelt oldatban felhígítva	40 $\mu$ g	100	
GnRHa (Gonazon)	IM	gyártó által mellékelt oldatban felhígítva	80 $\mu$ g	100	Rónyai et al., 2008
PH	IM	0,65 % NaCl oldat	4 mg	100	
PH	IP	NaCl oldat	4 mg	100	
mGnRHa+MET (Ovopel)	IP	NaCl oldat	20 $\mu$ g + 10 mg	83	Brzuska, 2011
17 $\alpha$ -OHP	IM	dimetil-izoszorbid	4 mg	100	
GnRHa	IM		40 $\mu$ g	20	
	IM	NaCl oldat	20 $\mu$ g	60	
GnRH + PIM	IM	NaCl oldat + DMSO	20 $\mu$ g + 4 mg	90	Sharaf, 2012
	IM	NaCl oldat + DMSO	30 $\mu$ g + 8 mg	98	
	IM	NaCl oldat + DMSO	40 $\mu$ g + 16 mg	100	
sGnRHa +DOM (Ovaprim)	IM	0.6% NaCl oldat	10 $\mu$ g + 5 mg	100	Ndimele és Owodeinde, 2012
tartósított HM	IM	0.9 g/ml NaCl oldat	0.9 g	100	
friss HM	IM	0.9 g/ml NaCl oldat	0.9 g	100	Okomoda et al., 2017b
sGnRHa +DOM (Ovaprim)	IM	-	10 $\mu$ g + 5 mg	100	
sGnRHa +DOM (Ovaprim)	IM	5 mL NaCl oldat	8 $\mu$ g + 4 mg	100	
	IM	5 mL NaCl oldat	10 $\mu$ g + 5 mg	100	Marimuthu et al., 2015
	IM	5 mL NaCl oldat	12 $\mu$ g + 6 mg	100	
PH	IM	0.9% NaCl oldat	4 mg	88	El-Hawarry et al., 2016
PH+DOM	IM	0.9% NaCl oldat	4 mg + 10 mg	100	
LHRHa+DOM	IM	0.9% NaCl oldat	50 $\mu$ g + 10 mg	100	
GnRHa+DOM	IM	0.9% NaCl oldat	40 $\mu$ g + 10 mg	100	
PH	PM	0.9% NaCl oldat sperma	5 mg 5mg	100	Müller et al., 2018b
PH	IP	0.9% NaCl oldat	5 mg	100	Müller et al., 2019
sGnRHa +DOM (Ovaprim)	IM	-	10 $\mu$ g + 5 mg	100	Kucharczyk et al., 2019a
LHRHa + DOM		-	25 $\mu$ g + 5 mg	100	Srimai et al., 2020
harcsa HK	IM	2 ml 0.9% NaCl oldat	1 mirigy	100	Amoah et al., 2020
hCG	IM	0.9% NaCl oldat	500 IU	100	
	IM	0.9% NaCl oldat	1500 IU	100	Zidan et al., 2020
	IM	0.9% NaCl oldat	3000 IU	100	
	IM	0.9% NaCl oldat	6000 IU	100	
PH	IP	0.9% NaCl oldat	5 mg	100	Müller et al., 2020b
mGnRHa+MET (Ovopel)	IP, IM, PM	0,65 NaCl oldat	20 $\mu$ g + 10 mg	100	Kucska et al., 2022
sGnRHa +DOM (Ovaprim)	IP, IM, PM	0,9 NaCl	10 $\mu$ g + 5 mg	100	Okomoda et al., 2023
PH	IP	0,7% NaCl oldat	4 mg	100	Szabó et al., 2023
mGnRHa+MET (Ovopel)	R	0,9 NaCl oldat	5*(20 $\mu$ g + 10 mg)	100	Quyen et al. (2023)

Megjegyzések: O(%)=ovulációs ráta; mód-hormonbejutatás módja, PH-pontyhipofízis; HK-hipofízis kivonat; Aquaspawn- 20  $\mu$ g GnRHa + 100 mg DOM; Ovaprim- [20  $\mu$ g (D-Agr6, Pro9-NET) sGnRHa] + 10 mg DOM; Ovopel-[18-20  $\mu$ g (D-Ala6,Pro9Ne1) mGnRHa]+10  $\mu$ g MET; IU- nemzetközi egység; DMSO-dimetil-szulfoxid; BSA- borjú eredetű szérum albumin; SMBS-nátrium metabiszulfid; mGnRHa- emlős GnRHa analóg; sGnRHa-lazac GnRH analóg; IM-intramuszkuláris; IP-intraperitoneális, PM-petefészekmosás; R-rektális



## 2.4. A munka előzményei, problémafelvetés

Az inszeminációval történő halszaporítási módszer alkalmazásánál az afrikai harcsát a kutatócsoportunk modell halfajként használta. Azonban kutatási eredményeink alapján gazdaságilag jelentős értékmérőben is esetleges haladást lehet elérni ennél a halfajnál az új halszaporítási eljárás alkalmazásával. Korábbi megfigyelések szerint az utódok életképességében esetlegesen lehet pozitív irányú eltérés az *in vitro* fertilizáció (száraz termékenyítési eljárás) és az inszemináció szaporítás között.

Quyen et al. (2022) hibridizációs szaporítás céljából ugyanazon vundu (*Heterobranchus longifilis*) tejestől származó spermájával inszemináltak afrikai harcsa ikrásokat, *valamint in vitro* termékenyítéssel hoztak létre hibrid utódokat. A két különböző eljárásból származó utódokat 28 napig nevelték. Eredményeikben az inszeminált ikrásoktól származó ivadékok statisztikailag igazolható módon ( $p < 0,05$ ) magasabb túlélési arányt mutattak ( $66,75 \pm 5,52$  %, minimum-maximum: 58-75 %), mint az *in vitro* termékenyítésből született halak ( $43 \pm 12,19$  %, minimum-maximum: 23-55 %). Okomoda et al. (2023) kísérleteikben nem volt statisztikailag igazolható különbség ( $p < 0,05$ ) a kétféle *in vitro* termékenyítésből (friss sperma, 24 órán át 4 °C-on tárolt sperma), *valamint* az inszemináció eljárásból származó ikratételek termékenyülésében, majd a kelési arányokban és a 72. óras megmaradásban.

Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a petefészekbeli expozíció során olyan szelekciós folyamatok zajlanak le (például spermium verseny, sperma kompatibilitás stb.), amelyek során életerősebb ivadékokat nyerhetünk. A kérdés megválaszolására további kísérletsorozatokra van szükség, amelynek részét képezi jelenlegi munkánk is.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Kísérleti helyszín, anyahalak előélete

Vizsgálatainkat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campusán, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetének hallaboratóriumában végeztük. A kísérletekbe vont ikrás anyahalak saját szaporításából származtak, amelyeket szintén a munkacsoportunk által fenntartott kísérleti recirkulációs rendszerekben (200×45×145 cm, hasznos térfogat kb. 1300 l) tartottunk, valamint készítettünk fel a szaporítási munkákra. A halakat a nevelési időszakban  $26\pm 0,5$  °C-on tartottuk, napi 1,5 %/testtömegkilogramm (ttkg) takarmányadag (Aller Aqua Bona float 4,5 mm) mellett (3. ábra). A legfontosabb vízminőség paramétereket -  $\text{NH}_4\text{-N}$  0,1-0,4 mg/l,  $\text{NO}_2$  0,02-0,3 mg/l, és  $\text{NO}_3$  9,3-30 mg/l koncentrációs tartományokban – a halak számára megfelelő értékeken tartottuk. Az ikrás anyahalak ivartermékeinek termékenyítéséhez felhasznált tejeseket a Bajcsihal Kft. (korábban Győri „Előre” HTSz.) kisbajcsi telephelyéről szereztük be. Erre azért volt szükség, mert az általunk nevelt hímek (átlagos testtömeg: 200-250 g) közül nem tudtunk volna egy tejestől származó a különböző csoportokhoz megfelelő mennyiségű spermát nyerni. A kísérlet során poolozott sperma adagok minőségi paramétereinek különbségei miatt a két szaporítási eljárásból származó utódok életképességi és növekedési mutatói nem lettek volna vizsgálhatóak.

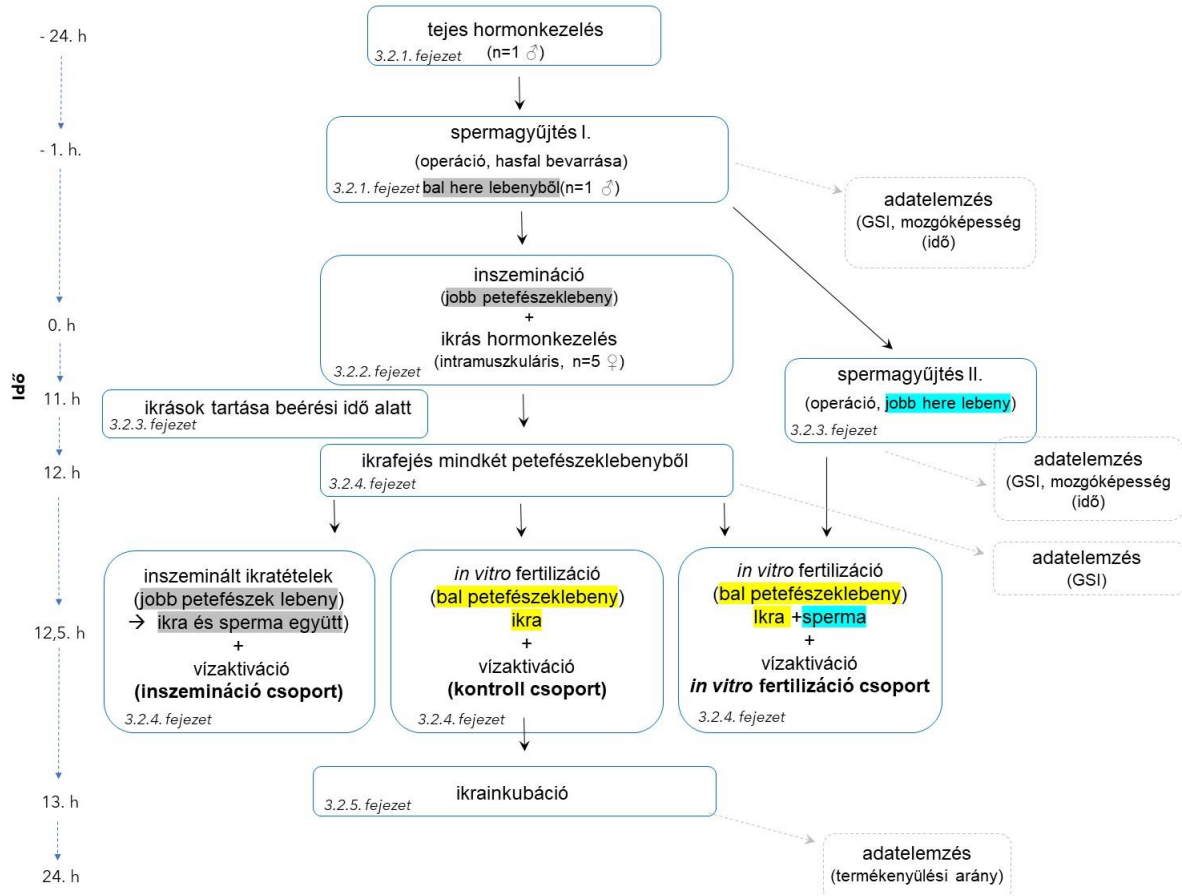
**3. ábra:** Az általunk nevelt- és kísérletbe vont afrikai harcsa ikrások (saját fotó)



## 3.2. Első kísérlet

A kísérleti folyamatok könnyebb megértéséhez, és időfüggő nyomon követéséhez a 4. ábra nyújt segítséget.

4. ábra: Az első kísérlet folyamatábrája



### 3.2.1. Hím hormonkezelése, spermagyűjtés

A szaporítási munkákhoz felhasznált afrikai harcsa hímet (testtömeg: 4008 g) benzokainos bódítást követően 0,5 Ovopel pellet/ttkg) hormonkezeltek az ikrások hormonkezelését megelőző napon (melléklet 28. ábra). Egy Ovopel pellet 20 µg emlős GnRH-a-t (D-Ala6, Pro9NEt-mGnRH) és 10 mg metaklopramidot (dopamin antagonistá vegyület) tartalmaz (Interfish Kft.). A spermát a here egyik lebenyének kiműtésével (bal oldali here) nyertük ki az ikrások hormonkezelését közvetlenül megelőzően. A lebeny műtéti eltávolítása után a műtét helyét összevarrtuk (5. ábra, bal oldali kép), majd a kioperált herelebenyből nyertük ki a spermát (5. ábra, jobb oldali kép).

**5. ábra:** Balra: a műtét helyén összevarrt hím, jobbra: sperma gyűjtés (saját fotók)



### 3.2.2. Ikrások hormonkezelése és inszemináció

A véletlenszerűen kiválasztott ikrás anyahalakat ( $n=5$ , testtömeg:  $340,4 \pm 86,05$  g) benzokainos bódítást követően, a testtömegek és a testhosszak meghatározása után intramuszkulárisan 1 Ovopel pellet / ttkg hormonkezeltük (6. ábra, bal oldali kép). A hormonpreparátum bejuttatásával egyidőben a halak azonos petefészeklebenyeibe (jobb oldali) 1 ml spermát injektáltunk – a Müller et al. (2018a) által bemutatott módon - testtömegkilogrammonként csecsemőszonda segítségével (A katéter paraméterei: hossz: 400 mm, külső átmérő: 1,3 mm, belső átmérő: 1 mm (GALMED Wytwórnia Sprzętu Medycznego®, Lengyelország). A szondát a petefészeklebeny csúcsáig vezettük (10-12 cm a kezelt ikrás testnagyságától függően), és egy helybe juttattuk a számított sperma adagot (6. ábra, jobb oldali kép).

**6. ábra:** Balra: intramuszkuláris hormonkezelés, jobbra: inszemináció, célzott petefészeklebeny-kezelés (saját fotók)



### 3.2.3. Ikrások elhelyezése, második spermagyűjtés

A kezelt ikrásokat ezt követően egy külön medencében felébresztettük (erősen levegőztetett medence, vízhőmérséklet:  $27\pm 0,5^\circ\text{C}$ ), majd egyedi elhelyezésüket szolgáló, úgynevezett tartóketrecekbe (Fyllen szennyestartó kosár, magasság: 50 cm, átmérő: 45 cm, térfogat: 79 l, léhőmérséklet 0,75mm) helyeztük a beérési idejükig (~12 óra) (7. ábra).

**7. ábra:** A kísérletek során használt tartóketrecek (saját fotó)



A termékenyítési tesztek előtt közvetlenül megelőzően a hímet túlaltatással előltük, majd a másik herelebenyt (jobb oldali) is eltávolítottuk, és ebből nyertük ki a spermát az *in vitro* szaporítási munkákhoz (8. ábra).

**8. ábra:** Here másik lebenyének kiműtése (saját fotó)



### 3.2.4. Ikrafejés mindkét petefészeklebenyből, termékenyítés

A termékenyítéseket a beérési időnek, és a hormonkezelések sorrendjének megfelelően az 1-es számú haltól az 5-ös sorszámú halig sorban végeztük. Minden egyes ikrást túllattatással előltünk, ezt követően az összes kísérleti hal során a következőkben leírtak alapján végeztük a szaporításokat. Az ikrásból kiműtöttük a petefészeket (9. ábra, bal felső kép), megmértük a tömegét (GSI meghatározás) (9. ábra, jobb felső kép)), majd ezt követően a korábban inszeminált petefészeklebenyből azonos mennyiségű ikradagokat (0,1 ml térfogat,  $65,5 \pm 13,14$  ikraszem/petricsésze) fejtünk ki a lebeny teljes térfogatának 3 különböző területéről 3 normál méretű petricsészébe (átmérő×magasság:  $90 \times 14,2$  mm), ezután vízaktivációval termékenyítettünk (9. ábra, alsó sor).

**9. ábra:** Fenti sor, balra: kiműtött petefészek, jobbra: petefészek tömegének meghatározása (saját fotók), alsó sor: petefészeklebenyből ikrakinyerés (fotók: Varga Ádám)



A másik (nem inszeminált, bal oldali) petefészeklebens esetében hasonlóan jártunk el (szintén 3 különböző területről, csészénként 0,1 ml ikrát, 3 petricsészébe), azzal a különbséggel, hogy itt a termékenyítéshez a frissen kiműtött herelebensből származó spermaadagokat használtuk fel a vízaktiváció előtt. Ezen nem inszeminált lebens esetében halanként a lebens 3 különböző területéről 3 további kis méretű petricsészébe (átmérő×magasság: 60×15 mm) további ikratételeket mértünk ki annak érdekében, hogy megbizonyosodhassunk a célzott petefészeklebens inszemináció sikerességéről (nem jut át spermiumsejt a kezelt lebensből a nem kezelt lebensbe), ezzel is biztosítva, az utódok összehasonlíthatóságát (valóban két különböző szaporításból származnak). A fel nem használt ikradagokat termékenyítés után halanként két óriás petricsészében (átmérő×magasság: 140×20 mm) (1 az inszeminációból, 1 az *in vitro* eljárásból származó utódokhoz) keltettük (melléklet 29. ábra).

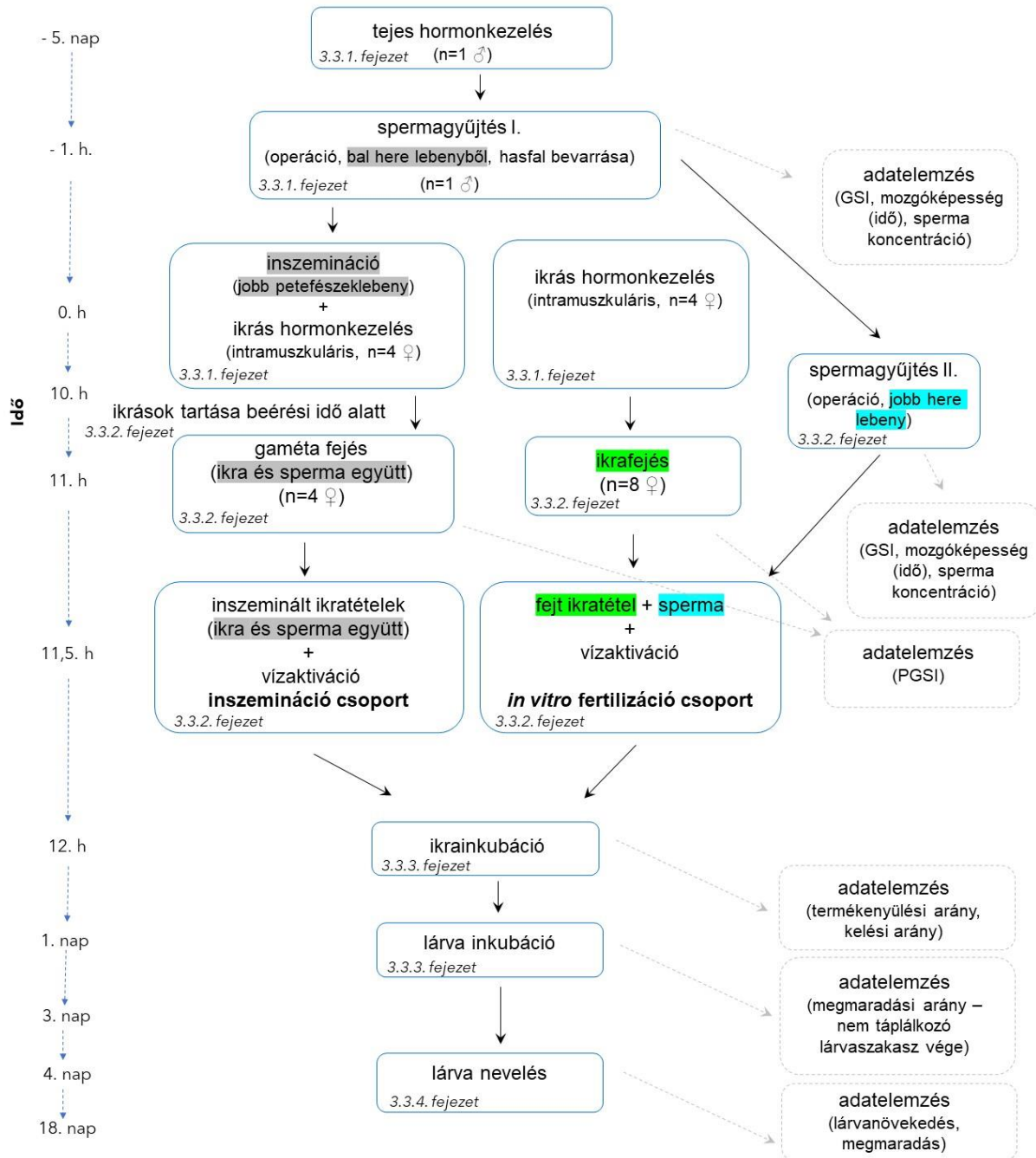
### **3.2.5. Ikrainkubáció**

Az ikrainkubációhoz új, kísérleti csepegtetőket használtunk, amelyet a munkacsoportunk által már évek óta használt szaporító-nevelő rendszerhez csatlakoztattunk (melléklet 30. ábra). A kísérlet során a vízminőséget állandó jelleggel ellenőriztük, napi 10%-os vízcsere mellett (lásd 3.5 fejezet). A két csepegtetőben anyahalanként 3-3 normál petricsészét ( $n=5 \times 3 \times 2=30$ ) helyeztünk el a különböző csoportoknak (3 inszeminált, 3 *in vitro*) megfelelően teljesen random elhelyezésben. A csepegtető rendszereket maximális kapacitáson üzemeltettük 200 ml/óra/csepegtető egység átfolyási sebesség mellett. Az inszeminációs kontrollként használt kis méretű petricsészéket a rendszer mellett helyeztük el, míg a maradék ikratételekhez tartozó óriás petricsészéket állandó vízátfolyás mellett a szaporító-nevelő rendszerhez csatlakoztattuk. A termékenyülési értékeket gerinchúros állapotban határoztuk meg 12 órával a termékenyítést követően.

### 3.3. Második kísérlet

A kísérleti folyamatok könnyebb megértéséhez, és időfüggő nyomon követéséhez a 10. ábra nyújt segítséget.

10. ábra: A második kísérlet folyamatábrája





### 3.3.1. Kísérleti halak hormonkezelése, inszemináció

A második kísérletben külön-külön ikrás egyedeket ( $n=8$ , testtömeg =  $256,6 \pm 23,16$  g) válogattuk, és szaporítottuk mind az *in vitro* eljárás esetében, és mind az inszeminációs módszer alkalmazásánál is. Ezzel a beállítással elsősorban a korábban, a petefészeklebenyek között tapasztalt sperma átjutást próbáltuk kiküszöbölni. Ebben az esetben a felhasználni kívánt hímeket (testtömeg: 3990 g) az ikrások hormonkezelése előtt az 5. napon (az előző kísérlet során az ott kísérletbe vont hímekkel együtt történt a hormonkezelés) 1 Ovopel pellet/ttkg hormonkezeltek. A spermát ismételtelen ettől az egyetlen afrikai harcsa hímektől nyertük. A hímektől a spermát a már korábban bemutatott módon (lásd 3.2.1. fejezet) nyertük ki. Az ikrásokat kezelési csoportoktól függetlenül 1 Ovopel pellet/ttkg intramuszkulárisan hormonkezeltek – először az *in vitro* termékenyítéshez használtakat, majd az inszeminációs módszerhez használtakat. Az inszeminációt (az első kísérlet esetében már bemutatott katéter (lásd 3.2.2. fejezet) segítségével) a jobb oldali petefészeklebenybe (1 ml sperma/ttkg) a kísérletbe vont anyahalak felénél ( $n=4$ ) a hormonpreparátum bejuttatásával egy időben végeztük. Az anyahalakat a beérési idejükig (~11 óra) az első kísérlet esetében bemutatott (lásd 3.2.3 fejezet) keltető ketrecekbe (medence vízhőmérséklet:  $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) helyeztük.

### 3.3.2. Második spermagyűjtés, termékenyítés

A beérési idők letelte előtt az összevart hímeket túllaltatással előltük, és kiműtöttük a másik herelebensyt is, amelyet az *in vitro* fertilizációhoz használtunk. A termékenyítéseket a kontroll halakkal (IVF) kezdtük, majd az inszeminált egyedekkel folytattuk a hormonkezelések sorrendjének megfelelően. Minden egyes ikrást benzokain oldatban bódítottunk, megmértük a halak testtömegét (11. ábra, bal oldali kép), ezt követően lefejtük őket (11. ábra, középső kép). A kinyert ivartermék tömegének meghatározása (későbbi PGSI (pszeudo-gonado-szomatikus index)) érték meghatározása, 11. ábra, jobb oldali kép) után azonos mennyiségű ikrádagokat (0,2 ml térfogat,  $124,71 \pm 15,11$  ikraszem/petricsésze) osztottunk szét a kifejt ikratétel 3 különböző területéről 3 normál méretű petricsészébe.

**11. ábra:** Balra: ikrás testtömegének meghatározása, középen: ikrás egyed fejése, jobbra: ikrakiadagolás előkészített petricsészébe termékenyítési tesztekhez (saját fotók)



Az *in vitro* kezelt csoportnál ezt egy csepp sperma/ikraadag (körülbelül 5 mm<sup>3</sup>) vegyítve vízakivációval termékenyítettünk, míg a sperma inszeminált egyedek esetében csak vízakivációt alkalmaztunk. A fel nem használt ikratételeket – az első kísérlet esetében leirtakkal megegyezően - termékenyítés után halanként kettő, kezelésenként egy óriás petricsészében keltettük.

### 3.3.3. Ikrainkubáció

A második kísérlet során a 3.2.5. fejezetben bemutatott csepegtető rendszereket használtuk. Anyahalanként 3 normál méretű petricsészét (n=8×3=24) helyeztünk el a két rendszerben random elrendezésben (12. ábra), a megmaradt ikratételeket a két rendszer között óriás petricsészékben keltettük. A kísérlet során meghatároztuk az embrió gerinchúros állapotában a termékenyülési (12. órában a termékenyítést követően), a kelési (26 órával a termékenyítést követően), valamint a 72 órás túlélési arányokat (nem-táplálkozó lárvaszakasz vége).

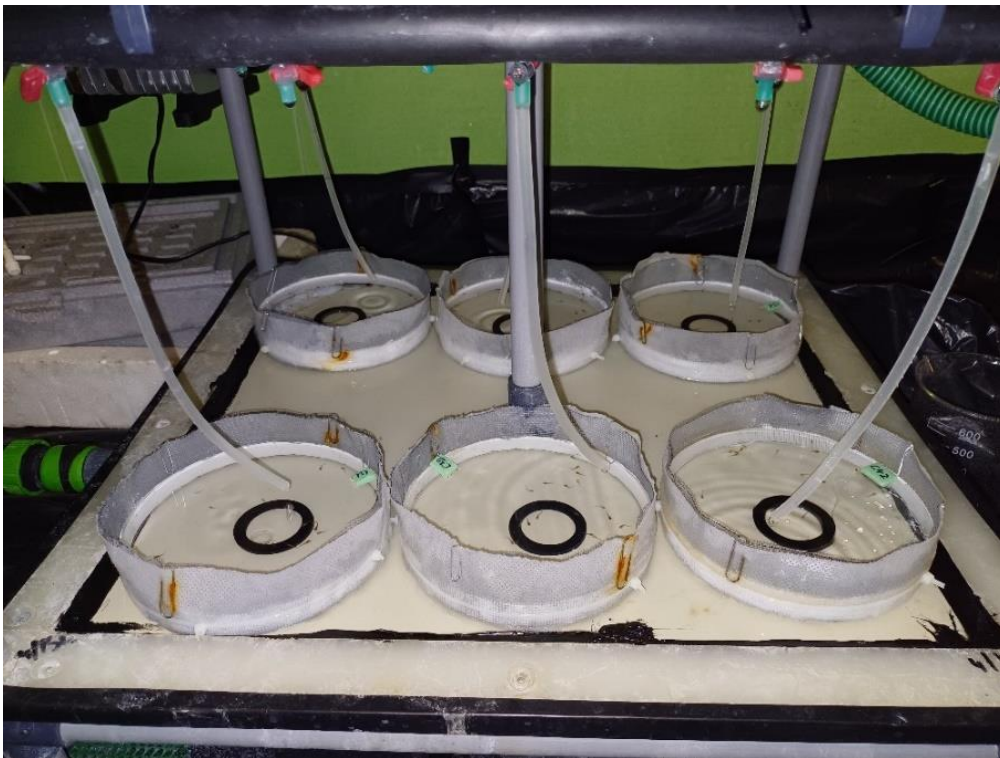
**12. ábra:** Ikrainkubáció (saját fotó)



### 3.3.4. Lárwanevelés

A második szakaszt az életképességi és növekedési vizsgálatok lebonyolításához használt második napja táplálkozó lárvák óriás petricsészékbe való válogatásával kezdtük. Anyahalanként 3 óriás petricsészébe, csészénként 30-30 egyedeket szelektáltunk. Ezt követően az óriás petricsészéket random elrendezésben helyeztük el a csepegtető rendszerek tálcáin (13. ábra).

**13. ábra:** A csepegtető rendszer egyik tálcája a lárwanevelés közben (saját fotó)



A halakat a kísérlet egésze alatt dekapszulált artemia petével (Ocean Nutrition, Shell Free Artemia) takarmányoztuk *ad libitum*. A takarmány kiadagolásához egy kis műanyag kanalat használtunk. A kísérletbe vont táplálkozó lárvákat az első naptól 0,01 ml/petricsésze, a 3. naptól 0,015 ml/petricsésze, a 4. naptól 0,02 ml/petricsésze, az 5. naptól 0,03 ml/petricsésze, a 7. naptól 0,04 ml/petricsésze, a 10. naptól pedig 0,06 ml/petricsésze adaggal etettük (melléklet 31. ábra). A kihelyezett lárvákról petricsészénként fényképeket készítettünk, majd ezeket is random módon helyeztük el a rendszerek tálcáin. Az elhullásokat napi rendszerességgel feljegyeztük, a növekedés üteméről - a kihelyezéskor készült fényképeken túl – a 7. és a 14. napon fényképeket készítettünk. A halak testhosszát (teljes testhossz) a fényképek alapján ImageJ (Image J for Windows, v.1.54, National Institutes of Health, Egyesült Államok) program segítségével határoztuk meg.

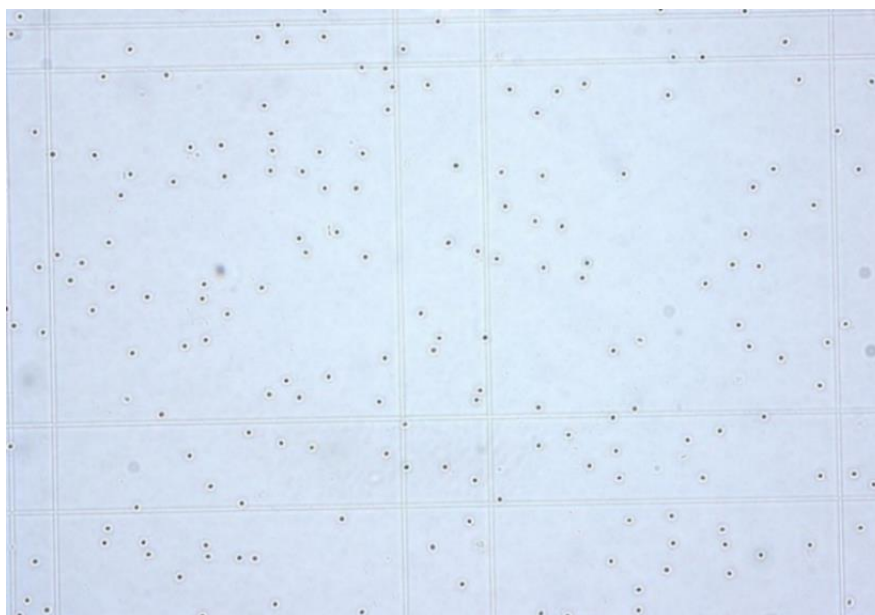
### 3.4. Spermaellenőrzés

Az első és második kísérletben a gyűjtött spermátételekből 3-3 alkalommal random mintát vettünk (5  $\mu$ l sperma automata pipettával) fénymikroszkóp segítségével (100-szoros nagyításon), sötét látótéren meghatároztuk a vízaktiváció előtti-, majd 0,1 ml rendszervíz hozzáadásával a vízaktivációkor mutatott mozgást végző spermiumok becsült arányát minden kezelés (inszemináció) és termékenyítési teszt (*in vitro* fertilizáció) előtt.

A második kísérletben az egy tejestől származó, de két különböző időpontban kiműtött heréiből származó spermamintákban összehasonlítottuk a spermiumok mozgóképességének hosszát vízaktivációt követően. A mozgás idejének hosszát az időt stopper segítségével mértük Szabó (2003) alapján. A becslést egy ember végezte, a vízaktivációtól a mozgóképes sejtek becsült 5% arányáig tartott a mérés.

A második kísérletben meghatároztuk a két különböző időpontban kiemelt heréből gyűjtött spermium koncentrációkat. A spermamintákat mindkét esetben kihígítottuk (hígítási arány 1:500), majd Bürker-típusú sejtszámláló kamrába töltöttük (Marienfield Superior, Paul Marienfield GmbH & CO. KG, Németország.). A spermáról fénymikroszkóp segítségével 200-szoros nagyításon felvételeket készítettünk (14. ábra). A sejtkoncentrációt a sejtek ImageJ programban történő számolásával és a következő képlet alkalmazásával számítottuk: sejtsűrűség/minta = kapott átlag $\times$ 25 $\times$ 10 $\times$ 1000 $\times$ hígítási arány (Horváth, 2001; Bokor, 2009; Bernáth, 2016).

**14. ábra:** Sejtkoncentráció meghatározása Bürker-típusú sejtszámláló kamrákban (fotó: Dr. Müller Tamás)



### 3.5. Vízminőség-vizsgálat

Az első és második kísérlet során víz hőmérsékletet mértünk az ikrafejési időpont pontos meghatározásához. Az ikrások keltető ketrecekben való elhelyezése során az 1. kísérletben a víz hőmérséklet  $27\pm 0,5^\circ\text{C}$ , míg a második kísérletben  $28\pm 0,5^\circ\text{C}$  volt a medencében.

A lárwanevelési kísérlet során vízminőséget, különböző vízparamétereket mértünk (melléklet 26., 27. ábra). A mérések során víz hőmérsékletet (napi mérés), oldott oxigén mennyiséget, oxigén telítettséget, pH-t, és vezetőképességet (4 mérés, kísérlet beállítása, 5., 10., nap, kísérlet befejezése) mértünk a Hanna 98194 kombinált mérőműszerrel (15. ábra, jobb oldali kép). A legfontosabb vízkémiai paramétereket, mint a nitrit-ion, nitrát-ion, ammónia, ammónium-ion, foszfát, a Hanna 83303 többparaméteres fotométerünk segítségével mértük (15. ábra, bal oldali kép). Ezek mellett állandó és karbonát keménységet, szabad klórt és széndioxidot is mértünk JBL ProScan tesztcsík alkalmazásával (okostelefonnal leolvasható paraméterértékelés).

**15. ábra:** Balra: Hanna 83303 többparaméteres fotométer, jobbra: Hanna 98194 kombinált mérőműszer (fotók: Varga Ádám)



A lárwanevelési kísérletkor a víz hőmérséklet  $28\pm 0,5^\circ\text{C}$  volt, míg az oldott telítettsége 83-90% volt. A legfontosabb mért paraméterek a következők voltak (min-max.): szabad ammónia: 0,03-0,19 mg/l, ammónium-ion: 0,03-0,04 mg/l, nitrit-ion: 0,13-0,66 mg/l, nitrát-ion: 9,0-15,0 mg/l, orto-foszfát-ion: 0,27-0,76 mg/l, pH: 8-8,2, vezetőképesség: 542-560  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , állandó keménység:  $>21^\circ\text{dH}$ , karbonát keménység: 10-15  $^\circ\text{dH}$ .

### 3.6. Statisztikai elemzés

Az eredmények kiértékelését és ábrakészítést a Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok) programcsomag segítségével elemeztük. A

különböző paraméterek (termékenyülési-, kelési-, megmaradási arányok, valamint a növekedő képesség) adatait két mintás t próba nem egyenlő szórásnégyzetekkel (Excel, adatelemzés ToolPak) vizsgáltuk meg  $p < 0,05$  szinten. A következő értékeket az alábbi képletekkel határoztuk meg:

- GSI (%) (gonado-szomatikus index):  $(\text{gonád tömege (g)} / \text{hal testtömege (g)}) \times 100$
- PGSI (%) (pszeudo-gonado-szomatikus index):  $(\text{fejt ikratétel tömege (g)} / \text{hal testtömege (g)}) \times 100$
- termékenyülési arány (%):  $(\text{termékenyült ikraszemek} / \text{összes ikraszem}) \times 100$
- kelési arány (%):  $(\text{kikelt lárva száma} / \text{termékenyült ikraszem}) \times 100$
- megmaradás (%):  $(\text{72. órában élő lárvák} / \text{kikelt lárvák száma}) \times 100$

## 4. Eredmények és értékelésük

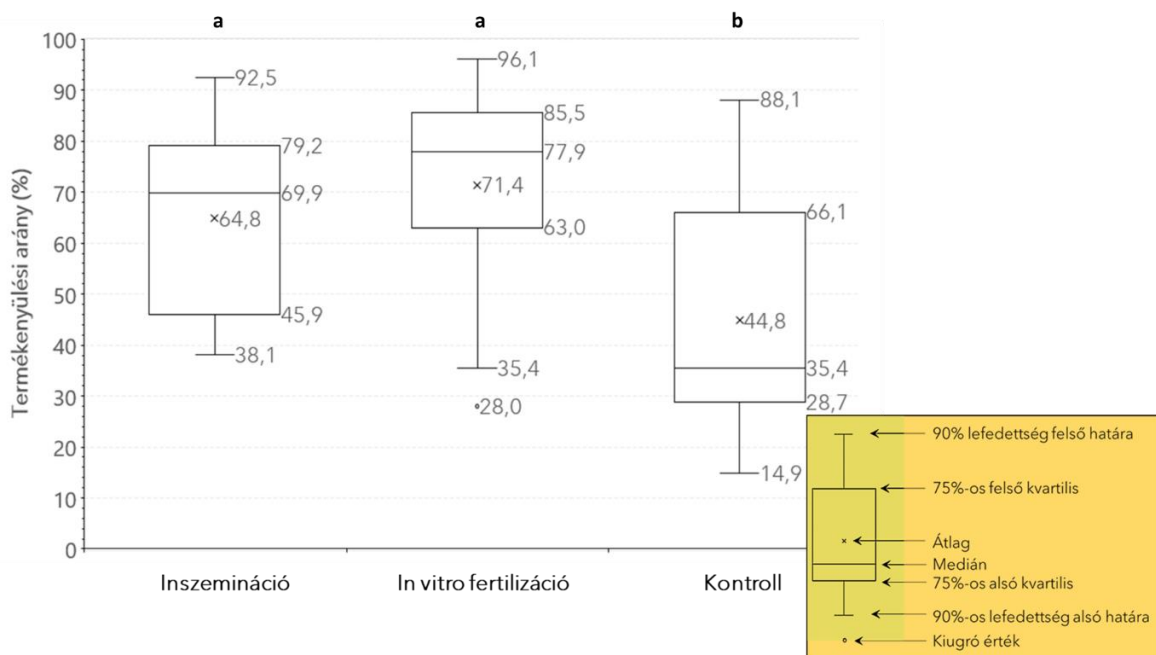
### 4.1. Eredmények

#### 4.1.1. Első kísérlet

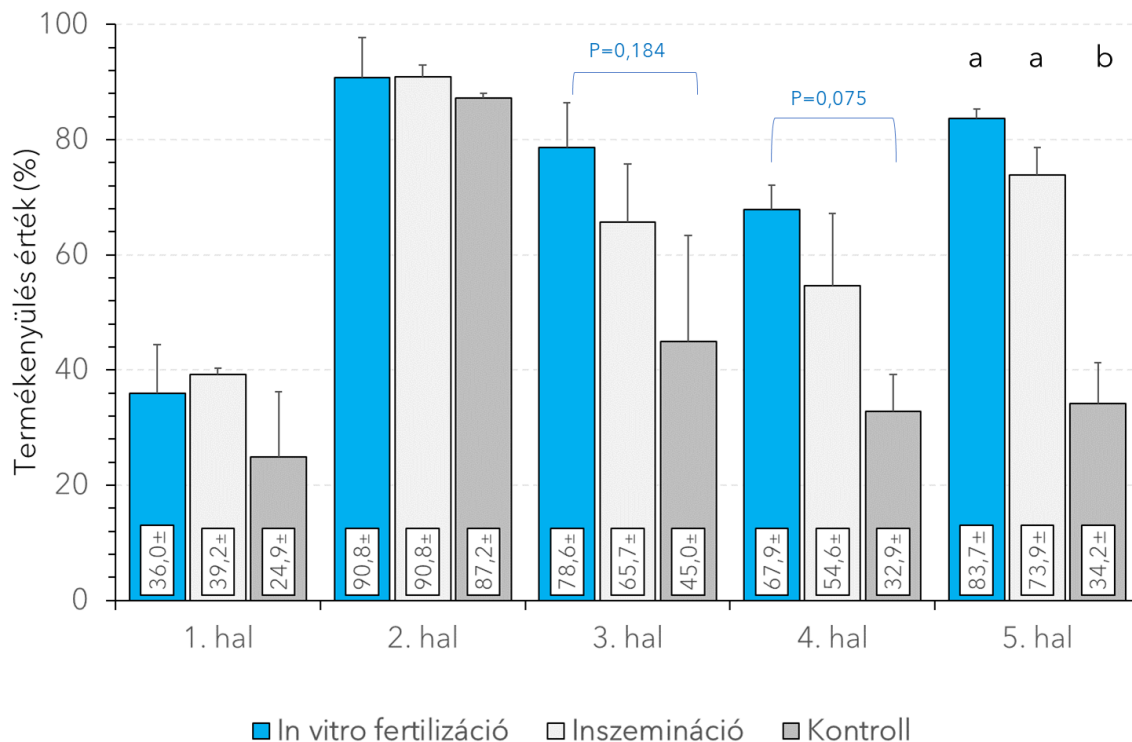
Az első kísérleti ciklusban *post mortem*, tehát elölt állapotú ikrásokból kioperált petefészekből kifejt ikratételeket sikerült termékenyíteni mindkét kezeléssel. Az inszeminált ikratételek termékenyülőképessége statisztikailag igazolható módon ( $p < 0,05$ , 16. ábra) nem különbözött az *in vitro* fertilizációval termékenyített ikratételektől. Mindkét kezeléssel belül nagy egyedi szórásokat mutatott a termékenyülés (16. ábra).

A kontroll, tehát az inszeminációval nem kezelt petefészeklebenszövetből származó minden vizsgált ikratételek termékenyülési értékeit mutatott, tehát a kezelt petefészeklebenszövetből a közös petevezető csatornán keresztül a sperma az átlagosan (12 óra, minimum 11:25 h, maximum 12:55 h) átjutott a kezeletlen petefészeklebenszövetbe. A kontroll termékenyülési értékek statisztikailag igazolható módon elmaradtak mindkét csoport értékeitől ( $p < 0,05$ , 16. ábra). Mivel a kontroll csoport is termékenyült (16.-17. ábra), így a kísérletet nem volt érdemes tovább folytatni, mert nem volt lehetőség meghatározni, hogy az *in vitro* termékenyített ikratételek melyik kezelési módból származó spermiumok termékenyítették.

**16. ábra:** Az első kísérlet összesített termékenyülési értékei dobozdiagramban és a hozzá tartozó értékekben kifejezve. Az ábra jobb oldalán a dobozdiagram magyarázó ábrája látható. A különböző betűjelek a statisztikailag igazolható értékeket jelölik  $p < 0,05$  szinten.



**17. ábra:** Összesített termékenyülési értékek a kísérletbe vont ikrások és kezelési csoportok alapján. A különböző betűjelek (5. hal) statisztikailag igazolható különbséget jelölnek ( $p < 0,05$ ). Ezenkívül feltüntetésre került még a két következő legnagyobb különbséget mutató (3 - 4. hal) termékenyülési értékek közötti  $p$  érték.



#### 4.1.2. Második kísérlet

##### 4.1.2.1. Spermaminőség

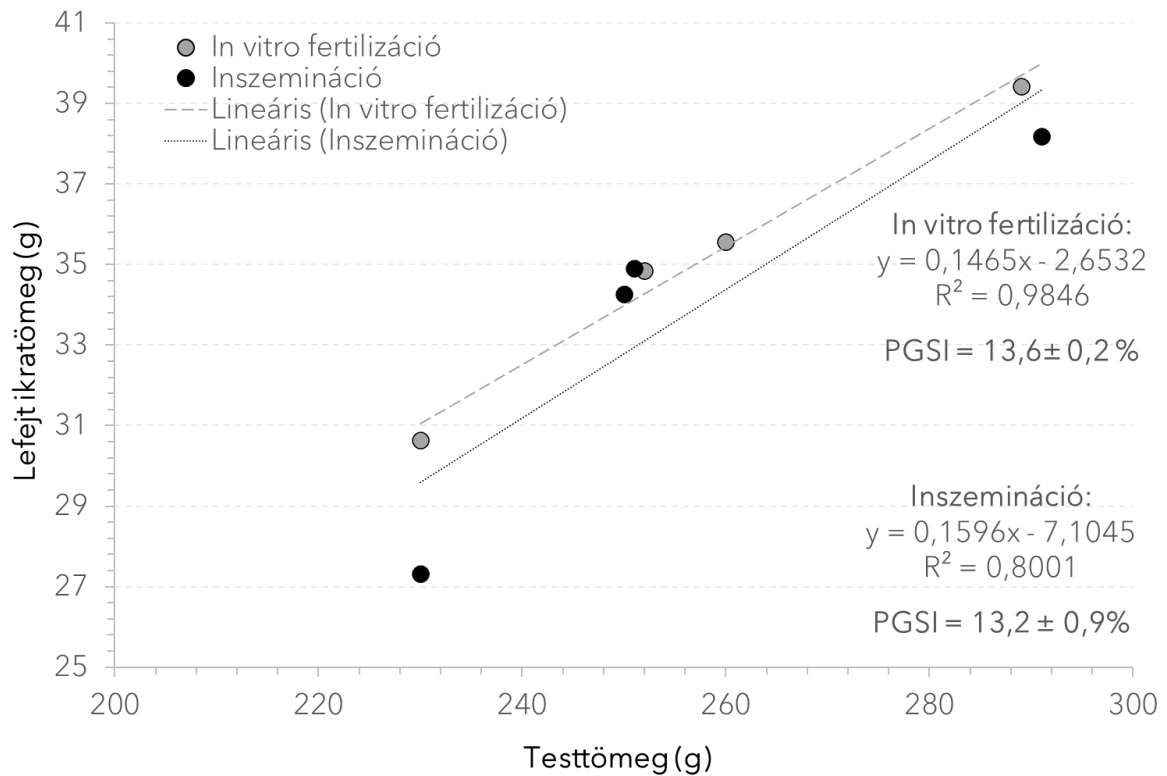
Habár a termékenyítéshez használt spermaadagok egy tejesből származtak, az inszeminációhoz kioperált bal herelebenyből származó sperma minősége mind sejtkoncentrációban ( $3,321 \pm 0,94 \times 10^9$ ), mind a mozgóképesség idejében ( $27,24 \pm 3,61$  sec) statisztikailag igazolható különbséget ( $p < 0,05$ ) mutatott az *in vitro* fertilizációhoz felhasznált herelebenyből gyűjtött spermamintához viszonyítva (sejtkoncentráció:  $5,15 \pm 0,732 \times 10^9$ , mozgási idő:  $22,14 \pm 3,81$  sec).

##### 4.1.2.2. Termékenyülési, kelési, és megmaradási arány

A kísérleti csoportok hal testtömegei (inszemináció:  $255 \pm 25,6$  g,  $n=4$ , *in vitro* fertilizáció:  $257,8 \pm 24,4$  g,  $n=4$ ), valamint a PGSI értékei (18. ábra) között nem volt statisztikailag igazolható különbség (kétmintás  $t$  próba,  $p < 0,05$ ).

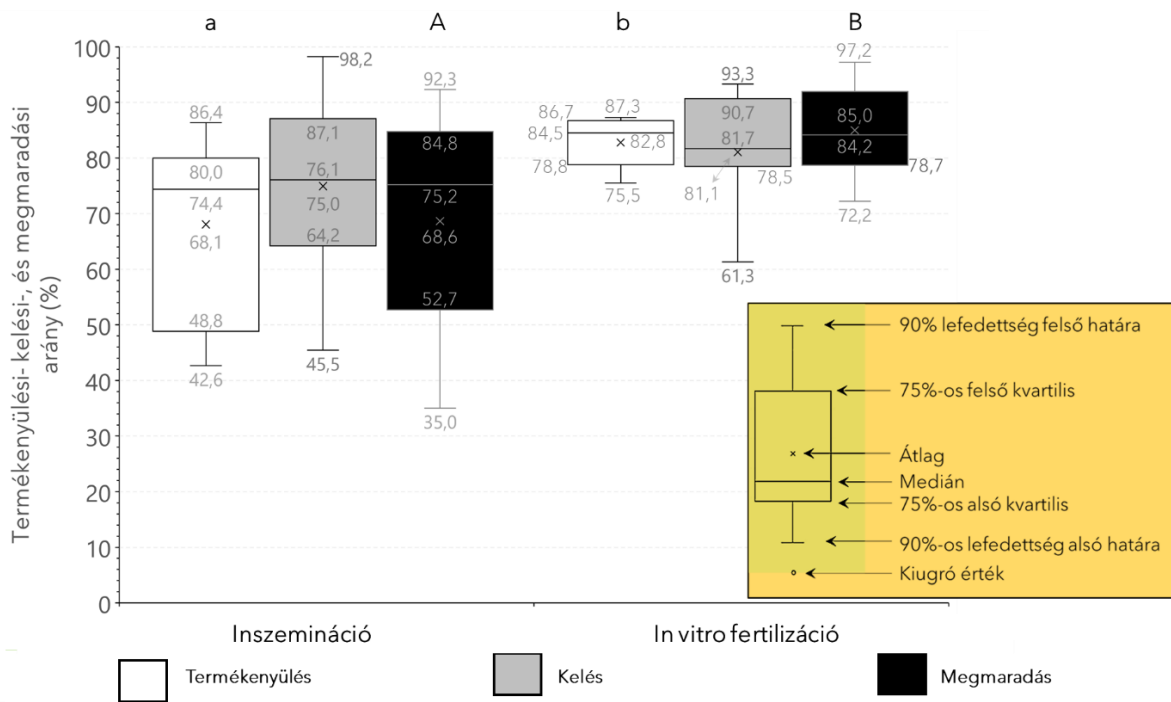


**18. ábra:** A kísérleti halak testtömeg és fejt ikratömeg közötti összefüggések



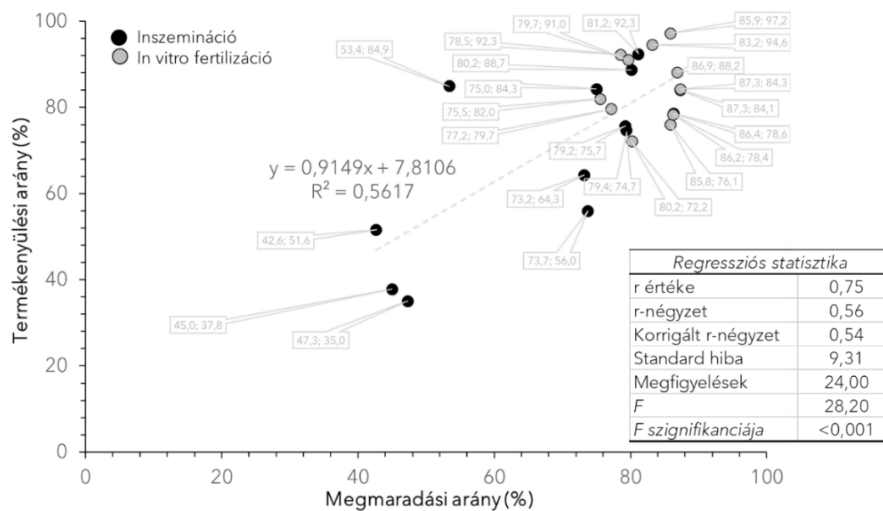
Az *in vitro* fertilizáció termékenyített ikratételek statisztikailag igazolhatóan ( $p < 0,05$ ) magasabb termékenyülési értéket és a keléstől számított 72. órában mért megmaradást értek el, mint az inszeminált csoportból származó tételekhez képest (19. ábra). A kelési arányokban nem volt igazolható különbség a két csoport értékei között ( $p > 0,05$ ). Az inszeminált csoportban mindhárom paramétert figyelembe véve (termékenyülési-, kelési-, megmaradási arány) az individuális különbségek a csoporton belül nagyobbak voltak, mint az *in vitro* fertilizáció kezelt halainál.

**19. ábra:** Termékenyülési, kelési, és túlélési értékek összefoglaló dobozdiagram és értékek. A különböző betűjelek az azonos paraméterek között mért statisztikailag igazolható különbséget jelölik ( $p < 0,05$ ).



Fontos megjegyezni, hogy kapcsolatot találtunk a termékenyülési értékek és a megmaradás között (közepesen erős kapcsolat:  $r = 0,75$ , 20. ábra). A két index számításában nem volt közös változó (lásd 3.6. fejezet). Tehát a termékenyülési érték a megmaradás variációjának 56%-át magyarázza a további 44%-ot más tényezők (további változók, például a mintavételi (ikraválogatás) különbségek, ikrainkubáció alatti eltérő környezeti feltételek stb.) eredményezték.

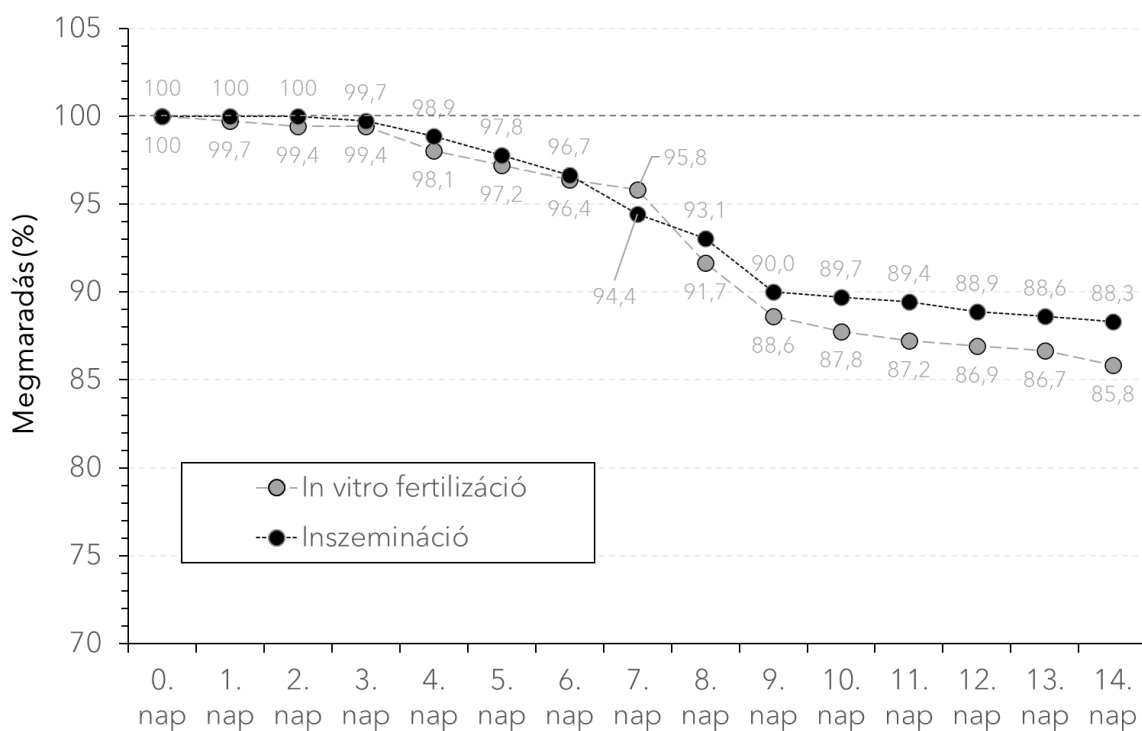
**20. ábra:** A termékenyülési- és megmaradási arány közötti összefüggés ugyanazon ikratételeket vizsgálva



### 4.1.2.3. Lárva-nevelés

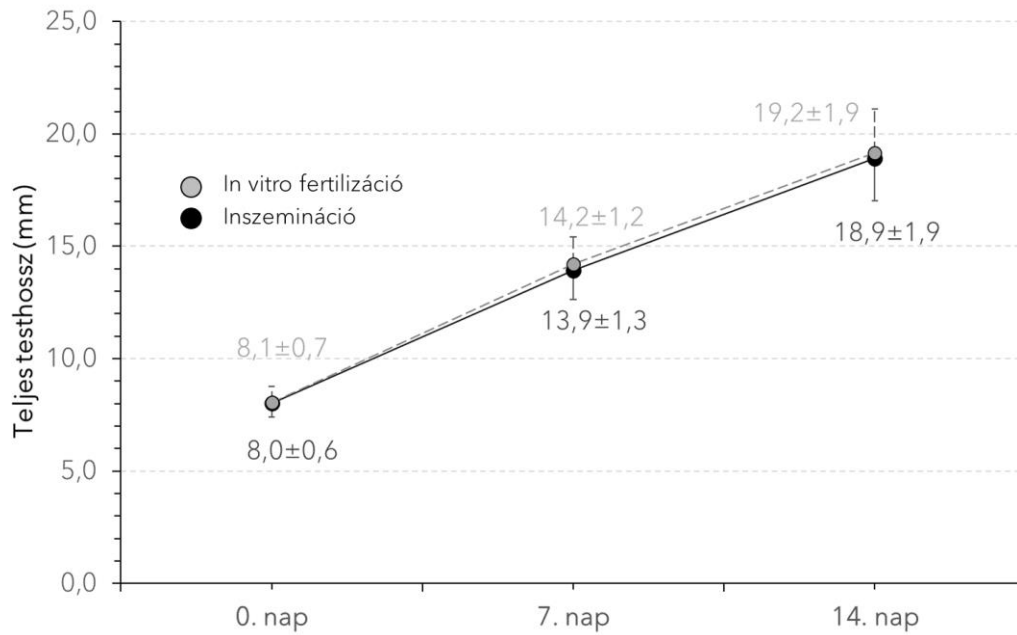
A 14. napig tartó lárva-nevelési kísérlet során a kísérletbe vont lárvák megmaradása mindkét csoportnál hasonló volt, az első egy hét után a 8.-9. napnál tapasztaltunk egy nagyobb mértékű elhullást. Az inszeminált csoport esetében a megmaradási értékek minimálisan meghaladták az IVF csoportét a kéthetes vizsgált időszakban, de közöttük statisztikailag igazolható különbség a két csoport között nem volt ( $p < 0,05$ ). A megmaradási értékeket a vizsgált időszakban a 21. ábra mutatja.

**21. ábra:** Kezelési csoportonkénti megmaradás értékek változása a kísérlet 14 napja alatt

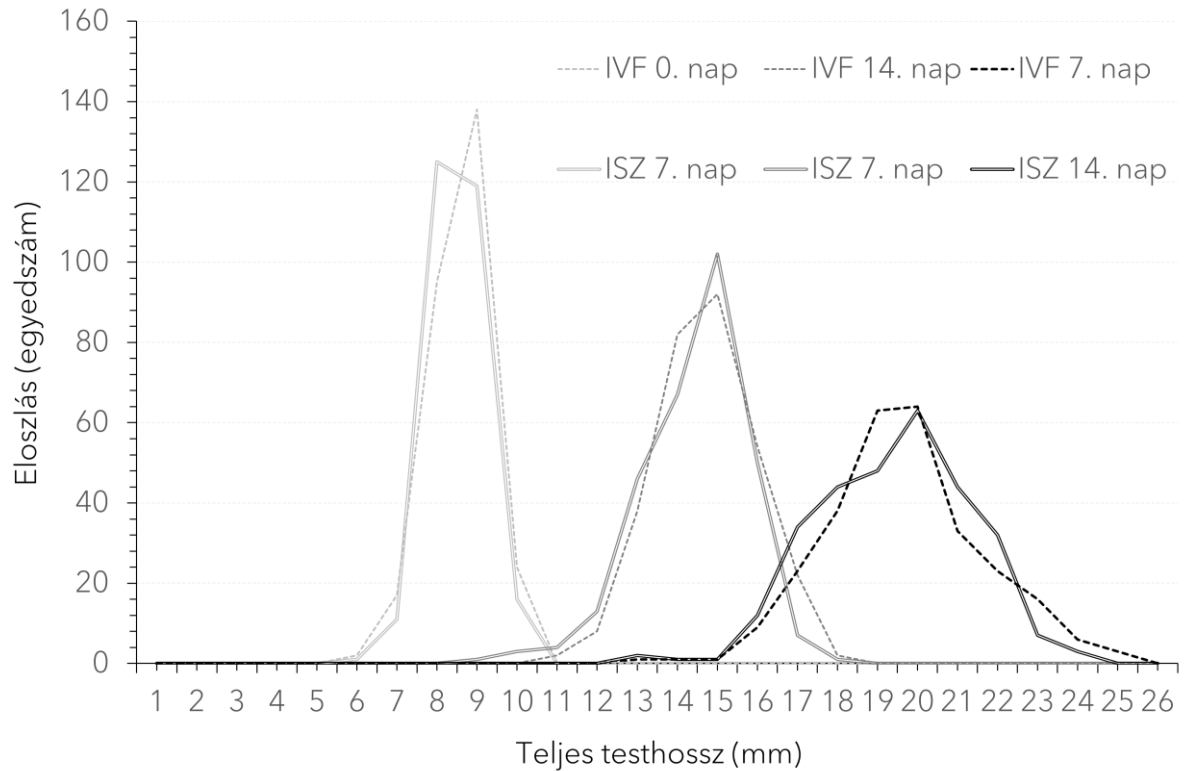


A növekedési vizsgálat során az első hetes és második hétben elért testhosszban nem volt statisztikailag igazolható különbség a két csoport között ( $p > 0,05$ , 22. ábra). Az kezelési csoportok közötti méret eloszlásban sem mutatkozott különbség (23. ábra.)

**22. ábra:** Összesített diagram és értékek az inszeminált és *in vitro* fertilizációval szaporított lárvák növekedő képességéről



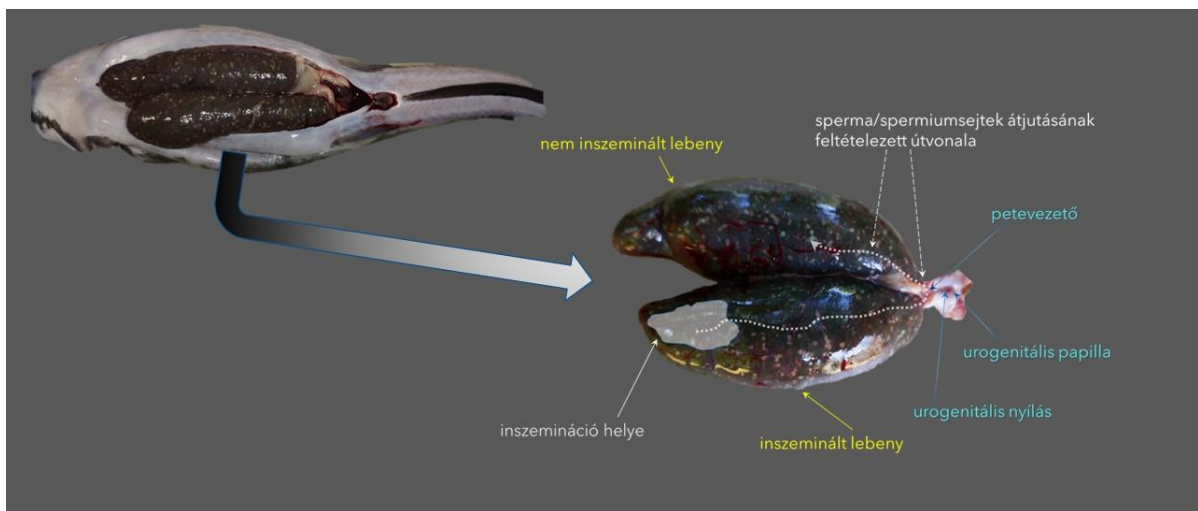
**23. ábra:** A kihelyezéskori (0. nap:), az egyhetes (7.nap), és a kéthetes (14. nap) testhosszok (mm) eloszlása. IVF: *in vitro* fertilizáció, ISZ: inszemináció.



## 4.2. Eredmények megvitatása

Minden kezelt hal ovulált és a belőlük nyert ikratételek termékenyültek. Tudomásunk szerint munkacsoportunk szaporított először közvetlenül *post mortem* kioperált petefészekből fejéssel afrikai harcsát. A kontroll csoportban átlagosan 44,8%-os volt a termékenyülési arány - nagy individuális különbségekkel - a nem inszeminált petefészeklebenyekből származó ikratételek esetében vízaktiváció hatására. A spermatárolási idő alatt átjutott a katéter segítségével feljuttatott sperma az inszeminált petefészeklebenyből, a nem kezelt lebenybe. A lebenyek átjárhatóságát feltehetőleg a közös petevezető (oviductus) tette lehetővé (24. ábra).

**24. ábra:** A sperma inszeminált lebenyből a nem kezelt lebenybe való átjutásának feltételezett útvonala



A mostani kísérleti eredmény egybevágott kutatócsoportunk korábbi megfigyelésével. Müller et al. (2018b) megfigyelése alapján afrikai harcsa esetében, ha az egyik petefészeklebenybe hormonkezelést alkalmaztak, míg a másikba inszemináltak, a termékenyülési arány kimondottan magas volt (80,5-94,9%). Tehát az akkori esetben is a spermaadag egy része (2 ml/ttkg kezeléssel) átjutott a nem inszeminált petefészeklebenybe. Fontos kiemelni, hogy a spermát alkotó szemínális plazma fokozatosan felszívódik a beérési idő alatt, ovulációkor makroszkópiusan már csak ikrát figyelhetünk meg, a spermiumsejtek fel vannak tapadva az ikrahéjra (Müller et al., 2020b). Érdekességként megemlíthető, hogy ponty és koi (*Cyprinus rubrofusculus*) halfajokban végzett inszemináció során egyik petefészeklebenybe feljuttatott sperma (1 ml sperma/ttkg) 41-45%-os termékenyülése közel fele volt a kontroll (*in vitro* fertilizáció) termékenyülési eredményekhez (85,8%) képest. Az adatok alapján ott nem tudott átjutni a sperma nem-kezelt petefészeklebenybe (Müller et al., 2018a).

Elképzelhetőnek tartjuk, hogy az általunk az inszeminációhoz testtömegkilogrammonként meghatározott sperma mennyisége (1 ml/ttkg) túlzott, korábbi kísérletsorozatok alapján a 0,5ml/ttkg arányokkal is magas fertilizációs ráták érhetőek el (Müller et al. 2020b). A módszer fejlesztésénél figyelembe kell venni a későbbiekben a különböző taxonómiai egységekbe tartozó halfajok anatómiai sajátosságait ebből a szempontból. Mivel a nem-kezelt petefészeklebenybe is került ismeretlen mennyiségben inszeminációból származó sperma, így - habár a két kezelés között nem volt termékenyülési értékben különbség – a termékenyülési arány kiszámítása után lezártuk a kísérletet és ebből a megfigyelésből adódóan a kísérleti tervezés egyes elemeit módosítottuk. Feltételezzük, hogy a sperma inszeminált egyedek esetében különös jelentőséggel bír a megfelelő fejési időpont megválasztása. Gyakorlati tapasztalataink alapján sokkal rövidebb az az időintervallum – az *in vitro* fertilizáció esetében ez több óra is lehet –, ahol várhatóan magas termékenyülési arányokkal lehet számolni. Úgy gondoljuk, hogy az ovulációhoz legközelebbi időpontban, valamint a kevert gamétaadag „szárazon” töltött idejének minimalizálásával jelentősen növelni lehet a termékenyülés sikerességét.

A második kísérletben – ahol már külön válogattunk ki inszeminációhoz és *in vitro* fertilizációhoz ikrásokat – szintén egy tejestől származó spermaadagokkal dolgoztunk. Az eredeti elgondolásunk az volt, hogy így közel azonos spermaminőség mellett objektívan tudjuk meghatározni a lárvák életképességét és a különböző genotípus háttérrel rendelkező tejesek nem módosítják az eredményt. Eredményeink alapján azonban a két herelebenyből származó különböző időpontban kinyert sperma minőségi jellemzői eltértek. A mozgóidő mérése a spermiumoknak nem előzménynélküli (Szabó, 2003), jelen esetben már itt is megmutatkozott a különbség. Ezt elsősorban a stresszfaktoroknak (bódítás, hasfal felnyitása, egyik here eltávolítása) tudjuk be főképpen, másfelől a kinyerés módja (here felvágása és sperma adagok kinyomása a két mintavételkor eltérhetett) is okozhatta részben.

Az inszeminált és *in vitro* fertilizáció során nyert PGSI értékek statisztikailag nem különböztek egymástól. A 8 hal együttes PGSI értékei ( $13,2 \pm 0,9\%$ ) köztes értékeként jelennek meg a más szerzők munkáiban leírtakhoz képest; Brzuska (2002): 13,5-15,3%, Quyen (2023) egyik kísérletében: 11,2-12,6%, míg a másik kísérletében: 13,7-15,1%.

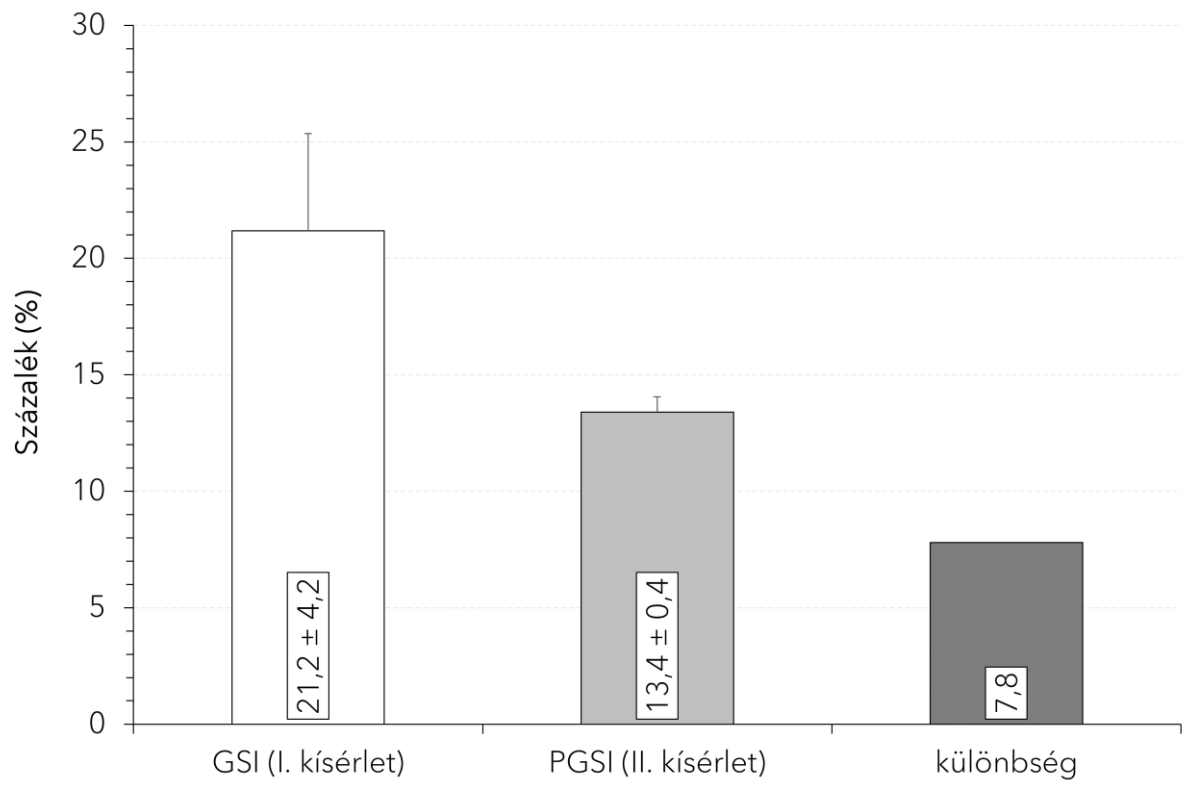
A második kísérlet során a termékenyülési és a kelési arányok között szoros összefüggést tapasztaltunk. Magasabb termékenyülési érték esetén általánosan magasabb kelési aránnyal számolhatunk, ahogyan ezt már más kutatócsoport is megfigyelte (Okomoda et al., 2023). Ez gyakorlati halszaporításnál fontos megfigyelés, hogy alacsonyabb termékenyülési aránynál a lárvák kelése és 72. óráig való megmaradása is rosszabb lesz.

A sperma inszeminált csoportnál hasonló termékenyülési értékeket kaptunk (1 kísérlet átlag: 64,8%, min-max: 38,1-92,5%, 2. kísérlet: átlag: 68,1%, min-max: 42,6-86,4%), mint Müller et al. (2018b) által pontyhipofízis szuszpenzió hormonkezeléssel és sperma inszeminációval kapott eredmények (átlag: 73,17%). Okomoda et al. (2023) Nigériában végzett munkájukban 24 órás sperma petefészkekbeli tárolási idő esetében, Ovaprim (20 mg sGnRH és 10 mg/ml domperidon (dopamin antagonistá vegyület)) hormonkezeléssel magasabb termékenyülési arányt értek el (93,0%). A jelentősebb különbséget okozhatta az eltérő anyahal állomány kondíciója, felkészítése. A mi rendszereinkben felkészített halak kis testtömeggel válnak ivaréretté (150-200g), a takarmányozásuk kizárólag kereskedelemben kapható keveréktakarmányokon alapul kiegészítő vitamin-, ásványi kiegészítés nélkül. Fontos kiemelni, hogy a gaméták termékenyülő képességében olyan előéleti feltételek is közrejátszanak, mint természetszerű takarmányozás és tartás, ami a gametogenezis harmonikus végbemenetelét biztosítja. Ezt azért tartjuk fontosnak kiemelni, mert a mi esetünkben az *in vitro* fertilizációval sem sikerült átlagban a jelen kísérletsorozatban Okomoda et al (2023) által leírt termékenyülési értékeket elérni (2. kísérlet átlag: 82,8%, min-max: 75,5-87,3%).

A lárwanevelés során a kizárólag dekapszulált artemia petén nevelt lárvák egyenletesen növekedtek mindkét csoportban. A kísérlet közben (1. hetes) és végén (2. hetes) növekedő képességben, a kezeléson belüli eloszlásban, valamint túlélési arányban nem találtunk különbséget. **Kísérletsorozatunk során nem igazoltuk, azt a korábbi megfigyelést (Quyen et al., 2022), hogy az inszemináció szaporítási módból származó utódok jobb megmaradással, vagy nagyobb növekedési eréllyel rendelkeztek volna, mint az *in vitro* módszerből származó ivadékok.** A kísérleteinket javított kísérleti beállítással tovább kívánjuk folytatni (például inszeminációt követő egyik petefészkelebeny elzárása, vagy az inszemináció és *in vitro* fertilizációhoz szükséges spermaminták azonos minőségbiztosítása stb.).

A két kísérlet során az ikratételeket két különböző módon nyertük ki. Az első kísérlet során kiműtöttük a petefészket, míg a második kísérlet esetében a bódított ikrásokból fejéssel nyertük ki az ikratételeket. A GSI és a PGSI értékek különbsége (25. ábra) rávilágít arra, hogy a nagyüzemi léptékű halszaporítások esetében is feltehetőleg a testtömeg néhány százalékának (kb. 2-3%) (GSI számítása esetében nem csak a tényleges ivartermék tömege viszonyított a testtömeghez, beletartozik a petefészkek kötőszöveti tok, csírahám, oogenezis korábbi állapotban lévő ivarsejtek, táplálószövet stb. tömege is) megfelelő ikra nem jut ki a külvilágba. Ennek kinyerésére kutatócsoportunk Prof. Horváth László útmutatása alapján kísérletsorozatokat tervezett, a kísérletek ebben az irányban jelenleg is tartanak.

**25. ábra:** Az első kísérlet esetében kapott GSI értékek átlaga, a második kísérlet során kapott PGSI értékek átlaga, illetve a két index átlagaiban kapott különbségek





## 5. Következtetések és javaslatok

Munkáink alapján az alábbi következtetéseket és javaslatokat fogalmazhatjuk meg:

- Az első kísérlet során a sperma átjutott az inszeminált petefészeklebenyből a nem kezelt lebenybe, amelynek feltételezett útvonala a közös petevezető volt. Feltételezzük, hogy a here kiműtésének időpontja – tehát a hím hormonkezelésétől eltelt idő – nagymértékben befolyásolja a sperma minőségét és állagát is. Hormonkezelés hatására a sperma ösztérfogata – a szemínális plazma térfogatával párhuzamosan - növekszik, azonban a relatív sejtkoncentráció így csökken. Előzetesen nem hormonkezelt hímtől származó sperma (töményebb sperma) és egyéb technológiai beavatkozások (pl.: petefészeklebeny lezárása) együttes alkalmazásával valószínűleg megakadályozható a sperma petefészeklebenyek közötti átjutása.
- A második kísérlet során a termékenyülési és a kelési arányok között szoros összefüggést tapasztaltunk. Ez a keltetőházi gyakorlatba is beültethető fontos felismerés lehet, hiszen alacsonyabb termékenyülési arányok mellett prognosztizálható a kelésgyenge ivadék, ami hosszútávon bevételkiesést okozhat. A magas termékenyülési értékek lehetőségét az anyahalak felkészítése nagymértékben meghatározhatja.
- Eredményeink alapján az inszeminációhoz testtömegkilogrammonként használt sperma mennyisége halfajonként nagyon eltérő lehet (pontynál 1 ml/ttkg, afrikai harcsa esetében a 0,5 ml/ttkg is elengedőnek bizonyult). Feltételezzük, hogy a különböző halfajok ivarszerveinek felépítése is meghatározhatja, hogy a sperma bizonyos dózisoknál képes-e vagy nem átjutni a petefészeklebenyek között. Ezáltal javasolható további kísérletsorozatok tervezése az inszemináció során a célzott petefészeklebeny-kezelés során felhasznált spermamennyiség beállításához különböző halfajok esetében.
- Kísérletsorozatunk során nem sikerült igazolni, hogy az inszeminációs szaporításból származó utódok életképessége és növekedési erélye felülmúlná az *in vitro* fertilizációból származó egyedekét. Javasolható a kísérleti beállítások finomhangolása; beleértve a különböző technológiai elemek módosítását, a kísérlet nagyüzemi léptékben (nagyobb ismétlésszám, nagyobb egyedszám) való lefolytatását is.

## 6. Összefoglalás

A MATE kutatói egy új halszaporítási módszert fejlesztettek ki, melynek alapja, hogy a spermium sejtek biológiai aktivitásukat megtartva hosszabb ideig „tárolhatóak” petefészekben indukált szaporítás (szaporodás) előtt külső megtermékenyítésű halfajokban. Íváskor (ovulációkor) a gaméták együtt ürülnek, és vízakiváltáskor bekövetkezik az ivarsejtegyesülés, termékenyülés (Müller et al., 2018a, Kucska et al., 2022, Okomoda et al., 2023). Ebből kiindulva a petefészek inszemináció módszere egyszerű; a programozott íváásra felkészített és bódított ikrások petefészeklebenszékébe fecskendőn rögzített szonda vagy katéter segítségével juttatjuk az előzőleg gyűjtött és minőségellenőrzésen átesett, egy vagy több hím-től származó, kevert sperma adagot/adagokat (Müller et al., 2020a). A módszer fejlesztése során véletlenül rájöttek arra, hogy afrikai harcsa esetében a 10 órás petefészekbeli tartózkodást követő spermiumokból származó utódok életképessége statisztikailag igazolható módon ( $p < 0,05$ ) meghaladta a hagyományos termékenyülésből származó utódokét (ikra és spermagyűjtést követő azonnali termékenyítés). Elképzelhető, hogy a spermiumok petefészek körülmények közötti tárolási idő alatt olyan szelekciós folyamatok zajlanak le (például sperma kompatibilitás, spermium kompetíció), amelynek során életerősebb ivadékokat nyerhetünk. A kérdés pontos megválaszolásához újabb kísérletsorozatokra van szükség, melynek jelenlegi munkánk is a részét képezi. Jelen kísérletünkben célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az újszerű inszeminációs szaporításból és az *in vitro* termékenyítésből (IVF) származó afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) utódok életképességét és növekedési tulajdonságait.

Két kísérletet folytattunk le. Az első kísérlet során egy afrikai harcsa hím-től (testtömeg: 4008 g) származó spermával (egyik lebeny kiműtése az inszemináció idejében, másik lebeny kiműtése közvetlenül a termékenyítés előtt) inszemináltuk 1 ml/testtömegkilogramm (ttkg) arányokkal a kísérletbe vont ikrások ( $n=5, 340,4 \pm 86,05$  g) egyik petefészeklebenszékébe, valamint az inszeminációval egyidejűleg hormonkezeltünk (1 Ovopel pellet/ttkg). A beérési időt (12 h) követően a túlaltatott ikrásokból kiműtött petefészekből az inszeminált lebenszékéből származó ikratételeket vízakiváltással termékenyítettük, míg a másik lebenszékéből származó ikratételeket a frissen műtött herelebenszékéből származó spermával termékenyítettük (*in vitro* fertilizáció). A spermium sejtek lebenszék közötti átjutását a nem kezelt lebenszékéből (nincs sperma) származó ikratételek vízakiváltásával külön csoportként ellenőriztük. A kísérlet során meghatároztuk a termékenyülési értékeket a két különböző eljárással létrehozott embriók esetében (átlag: *in vitro*

fertilizáció: 71,4%, sperma inszemináció: 64,8%), a kontroll csoportban lévő ikratételek is termékenyülést mutattak.

A második kísérlet során ismételten az inszeminációból és az *in vitro* termékenyítésből származó utódokat vizsgáltuk. Egy hímtől (testtömeg: 3990 g) származó ivartermékkel dolgoztunk. A hormonkezelések és az inszeminációk előtt a hímből kiműtöttük az egyik herelebenyt, majd a műtét helyét összevartuk. Az ikrásokat (n=8, 256,6±23,16 g) csoporttól függetlenül 1 Ovopel pellet/ttkg intramuszkulárisan hormonkezeltük. Az inszeminált csoport (n=4) esetében a hormonkezeléssel egyidejűleg a halakat 1 ml sperma/ttkg inszemináltuk a hím kiműtött herelebenyéből származó spermával a jobb oldali lebenybe. A beérési idők letelte előtt a hímet elöltük, és kiműtöttük a másik herelebenyt is (*in vitro* fertilizáció csoporthoz). Ovulációkor a halakat lefejtük, az IVF csoport (n=4) esetében az ikratételeket a frissen kiműtött lebenyből származó spermával termékenyítettük, míg az inszeminált csoport esetében további sperma hozzáadása nélkül vízaktivációval termékenyítettünk. A kísérlet során meghatároztuk a termékenyülési értékeket, a kelési arányokat, valamint a 72. órában mért megmaradást is. A stabilan táplálkozó lárvákat anyahalanként 3 db óriás petricsészébe (átmérő×magasság: 140×20 mm) helyeztük (30 db egyed / petricsésze), és ezt követően 2 hétig neveltük őket. Az *in vitro* fertilizáció termékenyített ikratételek statisztikailag igazolhatóan magasabb termékenyülési értéket, és 72. órában mért megmaradást értek el, mint az inszeminált csoportból származó tételek. Az inszeminált csoport esetében a megmaradási értékek minimálisan meghaladták az IVF csoportét a kéthetes vizsgált időszakban, de közöttük statisztikailag igazolható különbség a két csoport között nem volt ( $p < 0,05$ ). A növekedési vizsgálat során az első hét végén és második hét végén elért testhosszban nem volt statisztikailag igazolható különbség a két csoport között ( $p < 0,05$ ). A kezelési csoportok közötti méret eloszlásban sem mutatkozott különbség.

Kísérletsorozatunk során nem igazoltuk, azt a korábbi megfigyelést, hogy az inszemináció szaporítási módból származó utódok jobb megmaradással, vagy nagyobb növekedési eréllyel rendelkeztek volna, mint az *in vitro* módszerből származó ivadékok. A kísérleteinket javított kísérleti beállítással tovább kívánjuk folytatni (például inszeminációt követő egyik petefészeklebeny elzárása, vagy az inszemináció és *in vitro* fertilizációhoz szükséges spermaminták azonos minőségbiztosítása stb.).

## 7. Irodalomjegyzék

- Akpadja C. R., Szabó T., Radics F., Barth T., Horváth L., (1996): Különböző GnRH vegyületek hatása az afrikai harcsa, *Clarias gariepinus* (Burchell) ovulációjára és a lefejt ikra minőségére. *Halászat* 88(4), 169-172.
- Amoah, K., Adu-Asiamah, P., Dong, X.-H., Ampofo-Yeboah, A., Abarike, E.D. (2020): A 80 comparative study on the hatchability and survival rate of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), induced with catfish's pituitary gland hormone from farmed and wild sources. *Aquaculture International* 28, 2221–2234.
- Bernáth G. (2016): *A halsperma minősítési rendszerének gazdasági célú fejlesztése*. [PhD-értekezés] Gödöllő: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola. DOI: 10.14751/SZIE.2016.014
- Bernáth, G., Csorbai, B., Nagy, B., Csókás, E., Molnár, J., Bartucz, T., Láng, L. Z., Gyurcsák, M., Hegyi, Á., Kobolák, J., Griffiths, J. D., Ferincz, Á., Urbányi, B., Bokor, Z. (2023): The investigation of post-thaw chilled storage and the applicability of large-scale cryopreservation in chub (*Squalius cephalus*) sperm. *Cryobiology*, 104588.
- Bodur T., Szabó T., Sevgili H., Aydın Í., Kurtoğlu A., Urbányi B., Müller T. (2019): Tengeri süllő (*Dicentrarchus labrax*) szaporítási kísérletek Törökországban. In: *Halászati Tudományos Tanácskozás – Abstract Book.*, Szarvas: Halászati Kutatóintézet, p. 56-57.
- Bokor Z. (2009): *A harcsa (Silurus glanis) és a süllő (Sander lucioperca) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata gyakorlati szempontok alapján*. [PhD-értekezés] Gödöllő: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola. (elérés: [https://archive2020.szie.hu/file/tti/archivum/Bokor\\_phd.pdf](https://archive2020.szie.hu/file/tti/archivum/Bokor_phd.pdf))
- Brzuska E. R., Ráczkevi J., Adamek J., Radics F. (1999): Különböző hormonkezelések hatásának előzetes vizsgálata az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus* (Burchell)) ovulációjára, a termékenyülésre, illetve az embriók és a lárvák életképességére. *Halászat* 92(2), 88-92.
- Brzuska, E. (2002): Artificial spawning of African catfish, *Clarias gariepinus*: stimulation of ovulation using carp pituitary or Ovopel. *Journal of Applied Aquaculture* 12, 13–22.
- Brzuska, E. (2004a): Artificial propagation of African catfish (*Clarias gariepinus*): The application of a single dose of pellets containing D-Ala6,Pro 9NET-mGnRH and dopamine inhibitor metoclopramide. *Czech Journal of Animal Science* 48, 181–190.
- Brzuska, E. (2011): Stimulation of ovulation in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) following treatment with carp pituitary homogenate, ovopel or dagin. *Polish Journal of Natural Sciences* 26, 121–137.
- Brzuska, E., Adamek, J., Stupka, Z., Bekh, V. (2004): The application of [D-Tle6,ProNHEt9]mGnRH (Lecirelin) with the dopaminergic inhibitor metoclopramide to stimulate ovulation in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Czech Journal of Animal Science* 49, 297–306.
- De Leeuw, R., Goos, H.J.T., Richter, C.J.J., Eding, E.H. (1985): Pimozide-LHRHa-induced breeding of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture* 44, 295–302.
- Demska-Zakes, K., Zakes, Z. (2002): Controlled spawning of pikeperch, *Stizostedion lucioperca*, in lake cages. *Czech Journal of Animal Science* 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. *Aquaculture Research* 47, 3052–3060.

- El-Hawarry, W.N., Abd El-Rahman, S.H., Shourbela, R.M. (2016): Breeding response and larval quality of African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) using different hormones/hormonal analogues with dopamine antagonist. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 42, 231–239.
- FAO (2021): *Fisheries & Aquaculture - Cultured Aquatic Species Information Programme - Clarias gariepinus (Burchell, 1822)*. Rome: FAO.
- FAO (2022): *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome: FAO.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO (2023): *The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural–urban continuum*. Rome: FAO.
- Fernández, J., Caballero, A. (2001): Comparison of management strategies for conservation with regard to population fitness. *Conservation Genetics* 2, 121–131.
- Fuller, M.R., Doyle, M.W. (2018): Gene flow simulations demonstrate resistance of long-lived species to genetic erosion from habitat fragmentation. *Conservation Genetics* 19, 1439–1448.
- Gazsi Gy., Berta I., Ivánovics B., Ruffilli L., Szabó T., Urbányi B., Horváth L., Müller T. (2019): Külső megtermékenyítésű zebradánió (*Danio rerio*) ivatása tejes jelenléte nélkül. In: *XLIII. Halászati Tudományos Tanácskozás – Abstract Book*. Szarvas: Halászati Kutatóintézet, p. 92-93.
- Gazsi, Gy., Butts, I.A., Zadmajid, Ivánovics, B., V., Ruffili, L., Urbányi, B., Csenki, Zs., Müller, T. (2021b): Ovarian inseminated sperm impacts spawning success in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) even in the absence of a male stimulus. *Theriogenology* 172, 315-321.
- Gazsi, Gy., Ivánovics, B., Berta, I., Szabó, T., Zarski, D., Kucska, B., Urbányi, B., Horváth, L., Müller, F., Müller, T. (2021a): 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.
- Harka Á., Sallai Z. (2004): Halaink és elterjedésük. In: Harka Á., Sallai Z. (szerk.): *Magyarország halfaunája*. Szarvas: Nimfea Természetvédelmi Egyesület, p. 222-223.
- Horváth Á. (2001): *Halgaméták mélyhűtési módszereinek továbbfejlesztése*. [PhD-értekezés] Gödöllő: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola.
- 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.
- Horváth, Á., Urbányi, B. (2000): The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Research* 31(3), 317–324.
- Horváth J. I. (2023): Halszaporítási technológia fejlesztés (indukált ivatás hím jelenléte nélkül süllő fajban). In: Sütő Z. (szerk.): *36. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Agrártudományi Szekció Programfüzet*. Kaposvár: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, p. 26.
- Horváth L., Magyary I. (2007): A haszonhalak szaporítása. In: Hancz Cs. (szerk.): *Haltenyésztés (egyetemi jegyzet)*. Kaposvár: Kaposvári Egyetem, p. 80-113.
- 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*. Budapest: FAO.

- Horváth L., Urbányi B. (2000a): Tenyésztési alapok. In: Horváth L. (szerk.): *Halbiológia és haltenyésztés*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, p. 214-248.
- Inyang, N.M., Hettiarachchi, M. (1994): Efficacy of human chorionic gonadotropin (hCG) and crude pituitary extract of fish and frog in oocyte maturation and ovulation in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 and *Clarias anguillaris* L., 1762. *Journal of Aquaculture and Fisheries Management* 25, 245–258.
- 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.
- Kime, D.E., Tveiten, H. (2002): Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology* 61, 1549–1559.
- Kiss G. (2023): *Statisztikai jelentések – Lehalászás jelentés*. Budapest: NAIK Agrárgazdasági Kutatóintézet.
- Kovács, É., Müller, T., Márián, T., Krasznai, Z., Urbányi, B., & Horváth, Á. (2010): Quality of cryopreserved African catfish sperm following post-thaw storage. *Journal of Applied Ichthyology* 26(5), 737-741.
- Kucharczyk, D., Kucharczyk, D.J., Nowosad, J., Omirzhanova, N. (2019a): Optimization of artificial insemination outcomes of African catfish (*Clarias gariepinus*) with differing hatchery conditions. *Animal Reproduction Science* 211, 106222.
- Kucska, B., Quyen, N. N., Szabó, T., Gebremichael, A., Alebachew, G. W., Bógó, B., Horváth, L., Csorbai, B., Urbányi, B., Kucharczyk, D., Keszte, Sz., Müller, T. (2022): The effects of different hormone administration methods on propagation successes in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture Reports* 26, 101311.
- Lukácsik B. M., Kiss G., György Á. I., Lengyel P., Csörgits G. (2021): Magyarország tógazdasági és intenzív üzemi haltermelése 2020-ban. *Halászat* 114, 87–96.
- Marimuthu, K., Sathiyasilan, N., Rahman, M.A., Arshad, A., Raj, M.G., Arockiaraj, J. (2015): Induced ovulation and spawning of African catfish *Clarias gariepinus* (Bloch) using ovaprim. *Journal of Environment and Biotechnology Research* 1, 2–9.
- Miskolczi, E., Mihálffy, S., Várkonyi, E. P., Urbányi, B., & Horváth, Á. (2005): Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 247(1-4), 119-125.
- Molnár, J., Csorbai, B., Bernáth, G., Várkonyi, L., Urbányi, B., Bokor, Z. (2019): Optimizing fish structure in angling ponds focusing on white fish. *Acta Agraria Debreceniensis* (1), 33-36.
- Mordenti, O., Casalini, A., Mandelli, M., Di Biase, A. (2014): A closed recirculating aquaculture system for artificial seed production of the European eel (*Anguilla anguilla*): Technology development for spontaneous spawning and eggs incubation. *Aquaculture Engineering* 58, 88–94.
- Müller T. (2014): *Veszélyeztetett lápi halak megóvása (lápi póc, réticsík, széles kárász)*. Gödöllő: Vármédia Print Kft.
- Müller, T. (2022): Keltetőházi halszaporítási gyakorlattól eltérő új-és újszerű módszertani eljárások. [MTA doktori értekezés] Gödöllő. (elérés: <http://real-d.mtak.hu/1430/>)
- 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. (2020b): 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, 735-109.
- 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., Guti, 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. (2020a): A magyar halzaporítás technológiai kutatások sarokkövei és egy új indukált szaporítási mód bemutatása = Milestones of Hungarian Fish Reproduction Technology Research and Introduction of a New Induced Reproduction Method. *Állattenyésztés és takarmányozás* 69(3), 305-316.
- 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.
- Nasiadka, A., Clark, M. D. (2012): Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR Journal* 53(2), 161-168.
- Ndimele, P.E., Owodeinde, F.G. (2012): Comparative reproductive and growth performance of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its hybrid induced with synthetic hormone and pituitary gland of *Clarias gariepinus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12, 619–626.
- 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. *Journal of Applied Ichthyology* 28, 914–915.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Inuma, N., Hirose, K. (1997): Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 163-169.
- 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. *Ecology of Freshwater Fish* 23(1), 95-110.
- Okomoda, V. T., Amighty, R. O., Bem, T. M., Amaantimin, J., Nurizzati, I., Koh, I. C. C., Abol-Munafi, A. B., Ikhwanuddin, M. (2023): Ovarian lavage method as an alternative route for hormonal administration and short-term sperm storage in *Clarias gariepinus*. *Theriogenology* 198, 203-209.
- Okomoda, V.T., Tiamiyu, L.O., Kwaghger, D. (2017b): Spawning performance of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) induced with ethanol preserved and fresh catfish pituitary extract. *Zygote* 25, 376–382.
- Péteri A., Horváth L., Radics F., Puppáné B. F. (1989): Az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) tenyésztése. *Halászat* 82(3), 86-91.
- Péteri, A., Mouth-Poulsen, T., Kovács, É., Tóth, I., Woynarovich, A. (2015): *African catfish (Clarias gariepinus, Burchell 1822) production with special reference to temperate zones*. Budapest: FAO.

- Quyén, N. N. (2023): *Natural spawning behaviour and induced spawning by using the novel fish propagation method of African catfish (Clarias gariepinus)*. [PhD dissertation] Gödöllő: Doctoral School for Animal Husbandry Science.  
(elérés: [https://uni-mate.hu/documents/20123/336900/Disseration\\_Quyen.pdf/272b2021-af34-8b0e-f45f-98efbb7de29c?t=1678371414850](https://uni-mate.hu/documents/20123/336900/Disseration_Quyen.pdf/272b2021-af34-8b0e-f45f-98efbb7de29c?t=1678371414850))
- Quyén, N. N., Alebachew, G. W., Kucska, B., Kovács, G., Halasi-Kovács, B., Ferincz, Á., Staszny, Á., Horváth, L., Urbányi, B., Müller, T. (2022): Model experiment for practical application of inseminated sperm method for production of interspecific hybrids (*Clarias gariepinus* × *Heterobranchus longifilis*). *Aquaculture Reports* 27, 101418.
- Quyén N. N., Varga Á., Tãm N. T., Horváth J., Urbányi B., Müller T. (2023): Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) indukált szaporítása alternatív hormonkezeléssel (előzetes eredmények), In: Fazekas Gy. (szerk.): *Halászatfejlesztés 38*. Szarvas: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halászati Kutató Központ, p. 157-160.
- Radics F. (1990): Az afrikai harcsa szaporításának és nevelésének hazai tapasztalatai. *Halászat* 83(4), 125-128.
- Richter, C.J.J., Eding, E.H., Goos, H.J.T., De Leeuw, R., Scott, A.P., Van Oordt, P.G.W.J. (1987a): The effect of pimozone/LHRHa and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone on plasma steroid levels and ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 63, 157–168.
- Rónyai A., Kakuk Cs., Kondacs J. (2008): Egy újabb szintetikus gonadotrop-releasing hormon, a Gonazon alkalmazhatósága a ponty (*Cyprinus carpio* L.) és az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus* Burchell) szaporításában. *Halászat* 101(2), 78-82.
- Salami, A.A., Fagbenro, O.A., Edibite, L., Fagbemiro, S.O. (1994): Induced Spawning of the African Catfish *Clarias gariepinus* Using Non-Piscine Pituitary Extracts. *Journal of World Aquaculture Society* 25, 166–168.
- 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.
- Sharaf, S.M. (2012): Effect of GnRHa, pimozone and Ovaprim on ovulation and plasma sex steroid hormones in African catfish *Clarias gariepinus*. *Theriogenology* 77, 1709–1716.
- Srimai, W., Koonawootrittriron, S., Chaivichoo, P., Manee-aphai, W., Phu-onnim, A., Koolboon, U., Na-Nakorn, U. (2020): Selection response and genetic parameters for growth in North 93 African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture* 518, 734843.
- Szabó G. (2003): Angolnasperma mélyhűtése különböző hígítók és védőanyagok felhasználásával. [Diplomadolgozat] Gödöllő: Szent István Egyetem.
- Tamás G., Csorbai B., Kovács É., Németh I., Horváth L. (2006): A süllő (*Sander lucioperca*) szaporítási technológiájának továbbfejlesztése. *Halászat* 99, 157-170.
- Ude, E.F., Ugwu, L.L.C., Mgbenka, B.O. (2005): Homestead Artificial Propagation, Growth And Morphometric Characteristics Of The African Catfish (*Clarias gariepinus*, Pisces: Clariidae). *Animal Research International* 2(3), 377–381.
- Urbányi, B., Horváth, Á., Varga, Z., Horváth, L., Magyar, I., Radics, F. (1999): Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture Research* 30, 145–151.



- Varga Á., Kucska B., Horváth J., Boros A., Varju-Katona M., Szabó T., Ljubobratovic U., Urbányi B., Müller T. (2022): A süllő ovulációjának ponty hipofízissel történő indukálásával kapcsolatos megfigyeléseink, valamint az inszeminált ikrások ikraszórása és termékenyülése. In: Brlás-Molnár Zsuzsanna (szerk.): *Halászatfejlesztés 39.* Szarvas: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halászati Kutató Központ, p. 73-75.
- Varju-Katona M., Doszpoly A., Bógó B., Horváth J., Tóth A., Urbányi B., Müller T. (2021): Intenzív rendszerben nevelt fekete törpeharcsa (*Ameirus melas*) indukált szaporítása (Előzetes megfigyelések). In: Fazekas Gy. (szerk.): *Halászatfejlesztés 38.* Szarvas: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halászati Kutató Központ, p. 97-99.
- 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*. *Marine 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.
- Woodworth, L.M., Montgomery, M.E., Briscoe, D.A., Frankham, R. (2002): Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. *Conservation Genetics* 3, 277–288.
- Woynarovich E. (1999): Hogyan került az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) Magyarországra? *Halászat* 89(1), 30.
- Zidan, S.R.S., Saleh, H.H.E., Semaida, A.I., Abou-Zied, R.M., Allam, S.M. (2020): Effect of different doses of human chorionic gonadotropin (hCG) hormone on stripping response and reproductive performance of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 24, 225–242.

## 8. Táblázatok és ábrák jegyzéke

- 1. táblázat:** A hagyományos ivatás és inszemináció szaporítási módszerek közötti elméleti összevetés külső megtermékenyítésű halfajok esetén (Forrás: Müller, 2022 nyomán) (10. oldal)
- 2. táblázat:** Mentett állományok szaporításával és kitelepítésével foglalkozó módszerek összevetése (irányított szaporítás = ivató ketrecek alkalmazása) (Forrás: Müller, 2022 nyomán) (11. oldal)
- 3. táblázat:** Különböző hormonkészítmények alkalmazása afrikai harcsa ikrásokban (Forrás: Quyen, 2023 nyomán módosítva) (14. oldal)
  
- 1. ábra:** Az afrikai harcsa (fotó: Dr. Ferincz Árpád) (12. oldal)
- 2. ábra:** A hazai intenzív termelés és az afrikai harcsa termelésének változásai a 2018-2022-es időszakban (Forrás: Kiss, 2023) (13. oldal)
- 3. ábra:** Az általunk nevelt- és kísérletbe vont afrikai harcsa ikrások (saját fotó) (16. oldal)
- 4. ábra:** Az első kísérlet folyamatábrája (17. oldal)
- 5. ábra:** Balra: a műtét helyén összevarrt hím, jobbra: sperma gyűjtés (saját fotók) (18. oldal)
- 6. ábra:** Balra: intramuszkuláris hormonkezelés, jobbra: inszemináció, célzott petefészkelebeny-kezelés (saját fotók) (18. oldal)
- 7. ábra:** A kísérletek során használt tartóketrecek (saját fotó) (19. oldal)
- 8. ábra:** Here másik lebenyének kiműtése (saját fotó) (19. oldal)
- 9. ábra:** Fenti sor, balra: kiműtött petefészek, jobbra: petefészek tömegének meghatározása (saját fotók), alsó sor: petefészkelebenyből ikrakinyerés (fotók: Varga Ádám) (20. oldal)
- 10. ábra:** A második kísérlet folyamatábrája (22. oldal)
- 11. ábra:** Balra: ikrás testtömegének meghatározása, középen: ikrás egyed fejése, jobbra: ikrakiadagolás előkészített petricsészébe termékenyítési tesztekhez (saját fotók) (24. oldal)
- 12. ábra:** Ikrainkubáció (saját fotó) (24. oldal)
- 13. ábra:** A csepegtető rendszer egyik tálcája a lárvanevelés közben (saját fotó) (25. oldal)
- 14. ábra:** Sejtkoncentráció meghatározása Bürker-típusú sejtszámláló kamrákban (fotó: Dr. Müller Tamás) (26. oldal)
- 15. ábra:** Balra: Hanna 83303 többparaméteres fotométer, jobbra: Hanna 98194 kombinált mérőműszer (fotók: Varga Ádám) (27. oldal)
- 16. ábra:** Az első kísérlet összesített termékenyülési értékei dobozdiagramban és a hozzá tartozó értékekben kifejezve. Az ábra jobb oldalán a dobozdiagram magyarázó ábrája látható. A különböző betűjelek a statisztikailag igazolható értékeket jelölik  $p < 0,05$  szinten. (29. oldal)
- 17. ábra:** Összesített termékenyülési értékek a kísérletbe vont ikrások és kezelési csoportok alapján. A különböző betűjelek (5. hal) statisztikailag igazolható különbséget jelölnek ( $p < 0,05$ ). Ezenkívül feltüntetésre került még a két következő legnagyobb különbséget mutató (3 - 4. hal) termékenyülési értékek közötti  $p$  érték. (30. oldal)
- 18. ábra:** A kísérleti halak testtömeg és fejt ikratömeg közötti összefüggések (31. oldal)
- 19. ábra:** Termékenyülési, kelési, és túlélési értékek összefoglaló dobozdiagram és értékek. A különböző betűjelek az azonos paraméterek között mért statisztikailag igazolható különbséget jelölik ( $p < 0,05$ ). (32. oldal)
- 20. ábra:** A termékenyülési- és megmaradási arány közötti összefüggés ugyanazon ikratételeket vizsgálva (32. oldal)
- 21. ábra:** Kezelési csoportonkénti megmaradás értékek változása a kísérlet 14 napja alatt (33. oldal)
- 22. ábra:** Összesített diagram és értékek az inszeminált és *in vitro* fertilizációval szaporított lárvak növekedő képességéről (34. oldal)
- 23. ábra:** A kihelyezéskori (0. nap:), az egyhetes (7.nap), és a kéthetes (14. nap) testhosszok (mm) eloszlása. IVF: *in vitro* fertilizáció, ISZ: inszemináció. (34. oldal)
- 24. ábra:** A sperma inszeminált lebenyből a nem kezelt lebenybe való átjutásának feltételezett útvonala (35. oldal)
- 25. ábra:** Az első kísérlet esetében kapott GSI értékek átlaga, a második kísérlet során kapott PGSI értékek átlaga, illetve a két index átlagaiban kapott különbségek (38. oldal)
- 26. ábra:** Vízhinőség paramétereit mérik (fotó: Varga Ádám) (50. oldal)
- 27. ábra:** Hanna kombinált mérőműszeres vízminőség mérés (fotó: Varga Ádám) (50. oldal)
- 28. ábra:** Hormoninjekciók előkészítése (saját fotó) (50. oldal)
- 29. ábra:** Fejlődő embriók (saját fotó) (50. oldal)
- 30. ábra:** Az ikrainkubációhoz és lárvaneveléshez használt csepegtető rendszerek (50. oldal)
- 31. ábra:** Lárvákat etetek (fotó: Varga Ádám) (50. oldal)

## **9. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, Prof. Dr. Müller Tamás egyetemi tanárnak és Varga Ádám Phd. hallgatónak, akik időt és energiát nem sajnálva mindig segítettek munkámat. Hálával tartozom Láng Levente Zetének, aki nagymértékben segítette munkánkat a tejesek beszerzésével és szállításával kapcsolatban. A tejesek rendelkezésünkre bocsájtását köszönjük a Bajcshal Kft.-nek. Munkánkat az NKFI Alap (NKFI\_K\_135824) és a 2020-1.2.4 TÉT Ipari TR (2021-00015) támogatta. A dolgozat a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

## 10. Melléklet

**26. ábra:** Vízminőség paramétereket mérek (fotó: Varga Ádám)



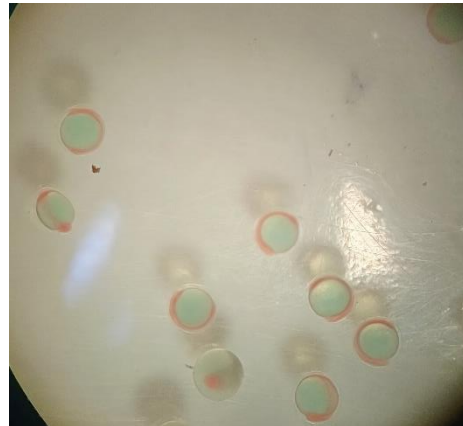
**27. ábra:** Hanna kombinált mérőműszeres vízminőség mérés (fotó: Varga Ádám)



**28. ábra:** Hormoninjekciók előkészítése (saját fotó)



**29. ábra:** Fejlődő embriók (saját fotó)



**30. ábra:** Az ikrainkubációhoz és lárwaneveléshez használt csepegtető rendszerek



**31. ábra:** Lárvékat etetek (fotó: Varga Ádám)



# 11. Nyilatkozatok

## NYILATKOZAT

### a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió<sup>1</sup> nyilvános hozzáféréseről és eredetiségéről

A hallgató neve: Horváth József István  
A Hallgató Neptun kódja: B6LMT3  
A dolgozat címe: Afrikai harcra (*Clarias gariepinus*) halfajban alkalmazott újszerű halszaporítási módszer hatása a lárvák életképességére  
A megjelenés éve: 2023  
A konzulens intézetének neve: Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet  
A konzulens tanszékének a neve: Természetesvízi Halökológiai 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.

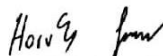
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

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

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitóri 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 repozitóri rendszerében.

Kelt: 2023 év 11 hó 02 nap



Hallgató aláírása

<sup>1</sup> A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törölendő.

## NYILATKOZAT

Horváth József István (név) (hallgató Neptun azonosítója: B6LMT3) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre **javaslom / nem javaslom**<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>2</sup>

Kelt: 2023 év november hó 3 nap



\_\_\_\_\_  
belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendó.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendó.

## NYILATKOZAT

Horváth József István (név) (hallgató Neptun azonosítója: B6LMT3) 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<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>2</sup>

Kelt: 2023 év november hó 2 nap

  
belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendó.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendó.