

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Müller Tamás

KAPOSVÁRI EGYETEM

2005

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KAPOSVÁRI EGYETEM
Állattudományi Kar
Hal és társállattenyésztési Tanszék

Doktori Iskola vezetője

Dr. Horn Péter

egyetemi tanár
az MTA rendes tagja

Programvezető és témavezető

Dr. Horn Péter

egyetemi tanár
az MTA rendes tagja

Témavezető

Dr. Bercsényi Miklós

egyetemi docens, Ph.D.

**AZ EURÓPAI ANGOLNA (*ANGUILLA ANGUILLA L.*)
SZAPORÍTÁSÁNAK LEHETSÉGES ÚTJAI**

Müller Tamás

KAPOSVÁR

2005

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉS

Az európai angolna a katadrom halak csoportjába tartozik, amely azt jelenti, hogy egy hosszantartó édesvízi életszakasz után a tengerbe vándorol szaporodni (Sargasso-tenger). Az angolna tenyésztéséről a szó szűkebb értelmében nem beszélhetünk, csak felneveléséről, hiszen még senkinek sem sikerült európai angolna lárvát - mesterséges szaporítást követően - felnevelni. Az angolna farmok ivadékszükségletüket természetes vízi fogásból nyerik. Azonban a vízszennyezés, az *Anguillicola crassus* fertőzöttség, valamint a kontinentális vizekbe bevándorló ivadék és az elvándorló ezüst angolnák túlhalászata miatt a világ angolna állományai csökkennek, melynek mértéke az európai angolna esetében oly súlyos, hogy ez a faj önerőből, segítség nélkül valószínűleg nem képes fennmaradni!

A disszertációm témája az angolna mesterséges szaporítás lehetőségének vizsgálata volt, figyelembevéve annak hazai vizeinkben végbemenő reprodukciós sajátosságait.

Vizsgálataink során a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1 - 2. kísérlet sorozat

Különböző származású (balatoni-, farm- és görög angolna) és parazitáltsági fokú (*Anguillicola crassus*-szal fertőzött és mentes állományok) nőivarú angolnák hormonálisan indukált ivarérelése különféle hormontartalmú anyagokkal (pontyhipofízis, pontyhipofízis + dopamin receptor antagonist, busahipofízis, szintetikus gonadotrop releasing hormon (GnRH-A)). A mesterséges ivarérelés tartás-technológiájának kidolgozása.

3. kísérlet

Hímivarú angolnák indukált ivarérelése és spermatermelésük hosszantartó fenntartása édesvízben, a lefejt sperma mennyiségének és minőségének vizsgálata. Célul tűztük ki, hogy a pontysperma mélyhűtési technológiáját kipróbáljuk angolna esetében is.

4. kísérlet

Édesvízben ivarérelt hím angolnák több-ciklusú felhasználása spermanyerésre, illetve a nyert spermiumok finomszerkezetének összevetése a szakirodalomban leírt "sósvízi" társaikkal.

5. kísérlet

Computer tomograph (CT) *in vitro* felhasználása az indukált ivarézés során végbemenő fiziológiai folyamatok (zsírraktárak, zsírmobilizáció, ivarszervek fejlődése) vizsgálatához hím angolnáknban.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Laboratóriumi kísérletek a Veszprémi Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar (1-4 kísérletek) és a Kaposvári Egyetem hal laboratóriumaiban (5. kísérlet) míg kiegészítő vizsgálatok a Szent István Egyetem Halgazdálkodási (3. kísérlet) valamint a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékén folytak (4. kísérlet).

1.-2. kísérletsorozat

A kísérleti állományokat különböző helyekről szereztük be:

- balatoni angolnákat a keszthelyi halászok elektromos hálóval történt fogásából válogattuk ki.
- farm angolnákat a körömi angolna telep nevelőkádjaiból kaptuk,
- görög angolnákat Ioanninából importáltuk.

A halakat 5 napos-2 hetes akklimatizáció után fokozatosan a tengeréhez hasonló sókoncentrációjú vízhez (3%) szoktattuk és a kísérlet alatt etetés nélkül tartottuk.

A felhasznált hormonokat és azok dózisait az 1. táblázat mutatja.

Az ivari érettséget külső (szem index), illetve belső (gonad-szomatikus index) fenotípusos bélyegek segítségével követtük nyomon. A petefészek citológiai érését szövettani minták alapján vizsgáltuk. A mintákat 8%-os formalin oldatban rögzítettük, majd ezekből 7 µm-es metszeteket készítettünk, és azokat haematoxin-eozinnal festettük. A petefészek oocita állapotait a szakirodalomban használt osztályozás szerint minősítettük. Az ikrát adó angolnáknban megszámláltuk az úszóhólyagban található *Anguillicola crassus* egyedszámot.

3.-4. kísérlet sorozat

Édesvízben tartott hím angolnákat human chorion gonadotropin (hCG) injekcióval (100 Nemzetközi Egység (NE)/hal/hét, illetve 250 NE/hal/hét)

kezeltünk. A spermatermelés megindulása után a heti injekciót követő 24. órában a halakból a hasfal masszírozásával a spermát lefejtük. Mértük a testtömeg változást, a lefejt sperma mennyiséget és minőséget (8., 9., 10. héten). A jónak minősített sperma adagokkal mélyfagyasztási kísérletet hajtottunk végre egy pontyra kifejlesztett protokoll szerint.

A 15 héten keresztül spermatermelésre ösztökélt halak egy csoportját (250 NE hCG/hét /kezelés, n=3) még 10 hétig tartottuk, majd a halak ivarszerveiből hisztológiai metszeteket készítettünk. Ezeket összevetettük ivarilag éretlen, valamint a spermiáció csúcsán lévő halak heréinek szövettani képeivel

5. kísérlet

Tíz hím angolnát ivarérésre készítettünk heti 250 NE hCG kezeléssel 6 hét alatt. A hormon injekciókat követő 2. napon computer tomograph-os vizsgálatnak vetettük alá a halakat. Képelemző módszerrel vizsgáltuk a zsírraktárak elhelyezkedését a testben. Nyomon követtük a zsírfelhasználás ütemét, a zsír mobilizációját, illetve a here volumetrikus megnövekedését, fejlődését. Hisztológiai úton ellenőriztük a filé zsírdepóinak elhelyezkedését.

3. EREDMÉNYEK

Eredményeimet az alábbiakban foglalom össze.

1-2. kísérlet sorozat

- Sikerült ikrát nyerni mesterséges tengervíz felhasználása mellett és
 - *Anguillicola crassus* fertőzöttség ellenére is.
- Az ovuláció kiváltására alkalmazott dupla mennyiségű pontyhipofízis és Ovopel (GnRH-A+dopamin receptor antagonistá vegyület) nem minden esetben eredményezett sikeres ikranyerést.
- busa hipofízis - hasonlóan a pontyhipofízishez - eredményes ivarérlelő hatású
- Ovurelin (GnRH-A) 0.1 és 10 µg /hal / hét kezelés a 81 napos kísérlet alatt nem váltott ki petefészek-fejlődést.
- Hisztológiai térképet készítettem a petefészek fejlődéséről.

1. Táblázat, az 1. és 2. kísérleti ciklus eredményei

n	Csop.	kezelés	állomány	idő (nap)	szem index	GSI	megjegyzés
3	1.	Negatív kontroll	Balaton	81	7,03±1,47	0,82±0,75	Nem volt petefészek fejlődés
3		Pozitív kontroll (1ml 0.65% NaCl/hal/kezelés)			5,17±0,75	1,07±0,32	
4		5 mg SCP/hal/kezelés			8,25±1,82	5,90±4,46	Erőteljes petefészek fejlődés
4		10mg CP+ 2mg D/hal/kezelés		72±8	12,70±1,68	37,33±12,45	2 ikrafejés* 1 spontán ikra szórás*
3	2.	Negatív kontroll	Balaton	81	11,27±2,40	0,84±0,04	Nem volt petefészek fejlődés
3		0.1µg GnRH-A/hal/kezelés			7,83±2,24	0,88±0,05	
5		10 µg GnRH-A/hal/kezelés			7,68±3,26	0,78±0,40	
5	3.	15mg CP/testtömeg/kezelés	Farm	132±16	13,1±1,70	13,93±7,37	1 ikrafejés*
3	4.	15mg CP/testtömeg/kezelés	Görögország	72±5	15,4±2,09	26,17±5,61	Pre-ovulációs állapot elérése*
5	5.	15mg CP/testtömeg + 2 mg D /kezelés	Balaton	111±6	13,89±1,08	12,15±4,87	Erőteljes petefészek fejlődés

Jelölések: SCP = busahipofízis, CP = pontyhipofízis, D = dopamin receptor antagonistá, *az ovuláció kiváltására 20 milligramm pontyhipofízist és 10µg Ovopel-t (GnRH-A + dopamin receptor antagonistá) alkalmaztunk. Az ikrafejéseket a döntő adagot követő 24-36 órában végeztük.

3- 4. kísérlet

Megállapítottam, hogy:

- Az édesvízben ivarérelt hímeket – ellentétben a legtöbb pontyfélével - hosszú idejű (13-15 hét) spermatermelésre lehet készíteni heti hCG kezeléssel.
- Édesvízben, hasonlóan a sósvízi kísérleti eredményekhez, az angolnák túlélnek a hosszantartó hormonkezelést.
- Édesvízben tartott hímek spermájának a morfológiai és fiziológiai bélyegei (jellemző alaktani bélyegek, mozgóképesség, mennyiség) hasonlóak a sósvízben tartott halak spermájának paramétereire,
- A pontysperma mélyhűtési technológiája eredményesen alkalmazható az angolna sperma mélyhűtésére is.
- Hisztológiai térképet készítettem a here és csírasejtjeinek fejlődéséről, illetve visszafejlődéséről.

4. kísérlet

- Sikerült a hormonálisan indukált ivarérelés során bekövetkező néhány változás (elsősorban a gonádfejlődés, illetve a zsírmobilizáció) *in vivo* nyomon követése computer tomograph segítségével.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A balatoni angolna állomány erősen fertőzött *A. crassus*-szal, melynek pontos hatását az ivarérelésre nem sikerült eddig feltárni. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy habár ez a léghólyag parazita kártétele nagyban befolyásolhatja az ívási helyre jutást, azonban laboratóriumi körülmények között nem tudja megakadályozni a mesterséges ivarérelést.

Az ikrások elhelyezésére kialakított átluggatott, és hálókkaal zárt PVC csövek jól beváltak azok stresszmentes tartására.

A felhasznált hormonok/kombinációk közül a pontyhipofízis, a pontyhipofízis és dopamin receptor antagonistá vegyület, illetve a busahipofízis eredményesen használható heti kétszeri, illetve egyszeri adagban is angolnák ivari érésének kiváltására.

A dupla mennyiségű pontyhipofízis + GnRH-A + receptor antagonistá vegyület keverék ovulációra való hatását nem sikerült egyértelműen tisztázni, mivel ez bár az első kísérleti ciklusban eredményes ovulációt indukált, ezzel szemben a görög angolnák esetében ovuláció nélküli elhullást okozott.

A balatoni angolnaállományban a hímek aránya 1% alatt van (saját megfigyelés), így hímeket Magyarországon biztonssággal csak angolna telepekről szerezhetünk be. Mivel a telepi angolnák mind kopoltyúféreggel fertőzöttek, esetükben a kopoltyúférgesség elleni kezelés elengedhetetlen technológiai lépés.

Hímek számára a leírt hCG kezelés eredményes ivarérelő hatású. Az édesvízi ivarérelés a sperma mennyiségi (fejt adag, spermiumszám), minőségi (mozgóképesség) és ultrastrukturális tulajdonságai alapján nem különbözik a sósvízben leírtaktól. Termékenyítési teszt hiányában azonban nem jelenthető ki egyértelműen, hogy az édesvízi érlelés felválthatja a sósvíz használatát. A pontysperma mélyhűtésére leírt hígító (módosított Kurokura hígító) és védőanyag (metanol), illetve módszer (Horváth és Urbányi, 1999) alkalmas angolnasperma mélyhűtésére is.

A computer tomograph alkalmas eszköz az ivarérelés során bekövetkező néhány változás, mint zsírmobilizáció, vagy here növekedés *in vivo* nyomon követésére. Ennek használatából arra következtettem, hogy az érés során a hasüregi zsír felhasználódott a here szöveti fejlődése energia igényének fedezésére, illetve a filé zsírdepói az éhezés ellenére megnövekedtek. Ezt a speciális tartási körülményeknek tudtuk be (mozgás aktivitás hiánya). A CT-vel

folytatott kísérletekből arra is következtettem, hogy ez az eszköz jó segítség lehet a szaporítási kísérletek állományának kiválasztásában, hiszen megadja élő állapotban a zsírraktárak volumetrikus nagyságát, illetve az ivarszervek méret szerinti fejlettségét.

ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

- Kísérleti eredményeim alapján megállapítottam, hogy az angolnák hormonálisan indukált ivarérelése megoldható mesterséges tengervízben is (kereskedelem kapható közönséges sóval beállítható sókoncentráció).
- Megállapítottam, hogy ovuláció kiváltására alkalmazott dupla mennyiségű pontyhipofízis és Ovopel (GnRH-A+dopamin receptor antagonistá vegyület) nem minden esetben eredményezett sikeres ikranyerést.
- busa hipofízis eredményes ivarérelő hatású
- Az eredetileg pontysperma mélyhűtésére kidolgozott védőanyag (metanol), hígító (módosított Kurokura hígító) és módszer alkalmas angolnasperma mélyhűtésre.
- A computer tomograph *in vivo* alkalmazásával feltártuk a zsírraktárak elhelyezkedését és az indukált ivarérelés során bekövetkező mobilizációjukat, valamint a here szöveti fejlődését.

6. JAVASLATOK

Az európai angolna mesterséges szaporításának még nincsen kidolgozott technológiája. A táplálkozó lárvaszakaszról pedig csak kevés és kizárólag vadonfogott egyedekből származó információink vannak. Ezt figyelembevéve gyakorlati felhasználási javaslatokat csak jövőben lehet tenni.

A természetes vizekben, az őszi idényben megnövekszik a vándorló életmódra áttérő, ivarilag felkészültebb egyedek aránya, ezért javaslom a kísérleti anyahal állomány szeptemberi-novemberi fogásokból történő kiválasztását. Az ezüst angolnák ivarszerve jól fejlett, és az indukált ivaréreléshez szükséges idő is rövidebb. Fontos megjegyezni, hogy az angolna reprodukciós sajátosságából adódóan nincsen egy határozott életkor, mikor ezüst angolna fázisba lépnek, valamint előregedett populációkban – mint, amilyen a balatoni állomány is - nincs szoros kapcsolat a testnagyság és az életkor között. Az életkor és a növekedési ütem között fordított arányosság áll fenn. A vándorlásának a megkezdése az ívóhely felé elsősorban nem a kor, hanem a testtömeg függvénye. Az elmúlt 5 év tapasztalatai azt mutatják, hogy Balatonból évről évre nehezebb alkalmas anyahal állományt beszerezni.

A ponty hipofízis mellett a busa hipofízis is eredményes ivarérelő hormon. Javaslom a busahipofízis emelt dózisú használatát (10 mg/hal/ heti kétszeri kezelés), vagy a kísérleti adag hosszabb idejű használatát pre-ovulációs állapot eléréséhez. A busa populáció a Balatonban nagy és a belőlük kiemelhető hipofízis nagyobb (7-10 mg / hal), mint a ponty agyalapimirigye.

A jövőben az ún. Ohta protokollt javaslom használni (17-hydroxyprogesterone vagy 17,20 β -dihidroxí-4-pregnen-3-one) termékenyítőképes ikra nyeréséhez. Japán és európai eredmények alapján ez a MIS hormon nagy biztonsággal indukál ovulációt.

GnRH analógok és GnRH analóg+dopaminerg vegyületek alkalmazását eredményeim, illetve a szakirodalomban elért eredmények alapján nem javaslom használni az európai angolna hormonálisan indukált ivarérelési kísérletekben.

Javaslom az édesvízben ivarérelt halak spermája mélyhűtési médiumainak (módosított Kurokura hígító, glükóz, mesterséges angolna (japán és európai plazma...stb), védőanyagainak (DMSO, metanol) és azok kombinációinak tesztelését, egy egységes angolna sperma mélyhűtési protokoll leírásához.

Javaslom a CT-t szelekciós eszközként alkalmazni a kísérleti állomány kiválasztásában. Ha az ikrások zsírtartalékai nem elégségesek, akkor nem alkalmasak a hosszantartó ivarérelési kísérletekre. A kevés testzsír a sikertelen kísérletet jelzi.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Folyóiratban megjelent magyar nyelvű szakkikkek

Müller, T., Binder, T., Váradi, B., Bercsényi, M. (2001): Az európai angolna (*Anguilla anguilla* L.) hormonálisan indukált ivarérelése és sikeres ikranyerése. Halászat 94 (3), 115-118

Folyóiratban megjelent angol nyelvű szakkikkek

Müller, T., Binder, T., Váradi, B., Horn, P., Bercsényi, M. (2002). Artificial induction of sexual maturation in the European males (*Anguilla anguilla* L.) (Preliminary results). *Acta Agraria Kaposváriensis* 6(1), 53-57.

Müller, T., Váradi, B., Horn, P., Bercsényi, M. (2003): Effects of various hormones on the sexual maturity of European eel (*Anguilla anguilla* L.) females from farm and lakes. *Acta Biologica Hungarica*, 54 (3-4) 313-322.

Müller, T., Urbányi, B., Váradi, B., Binder, T., Horn, P., Bercsényi, M., Horváth, Á. (2004). Cryopreservation of sperm of farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of The World Aquaculture Society* 35(2), 225-231.

Müller, T., Molnár, T., Szabó, A., Romvári, R., Hancz, C., Bercsényi, M., Horn, P. (2004) Tracking the hormonally-induced female eel maturation by means of computer tomography. *Acta Veterinaria Hungarica* 52(2), 235-243.

Müller, T., Romvári, R., Bercsényi, M., Hancz, C., Molnár, T., Szabó, A., Repa, I., Horn, P. (2004). Following the artificially induced eel maturation process by means of *in vivo* CT scanning. *Journal of The World Aquaculture Society* 35(2), 217-224.

Müller, T., Baska, F., Váradi, B., Horn, P., Bercsényi, M. (2005). Testis histology in artificially matured European eel (*Anguilla anguilla* L.) at the end of sexual maturation and spermatozoa ultrastructure in freshwater rearing. *Acta Biologica Hungarica* 56 (1), 169-172.

Szabó, G., **Müller, T.,** Urbányi, B., Bercsényi, M., Kucska, B., Horváth, Á. (2005) Cryopreservation of eel sperm. *Acta Biologica Hungarica* 56(1-2), 173-175.

Ismeretterjesztő publikációk

Müller, T. (2002): Angolnaszaporítás. *Lombikban a Sargasso-tenger. Élet és Tudomány* LVII (51/52):1642-1644.

Konferencia kiadványokban megjelent közlemények magyar nyelven

Müller, T. (1999): Az európai angolna (*Anguilla anguilla*) hormonálisan indukált ivarérelésének hagyományos és alternatív utjai. XXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Agrártudományi szekció, Gyöngyös, március 29-31. TDK dolgozat (PATE Georgikon MgTud-i Kar, Keszthely), (Kézirat).

Müller, T. (1999): Az európai angolna (*Anguilla anguilla*) hormonálisan indukált ivarérelésének hagyományos és alternatív utjai. XXIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, május 26-27 (Abstract book p.56 /Halászatfejlesztés, Vol. 22., pp. 106-116).

Müller, T. (2000): Az európai angolna (*Anguilla anguilla*) hormonálisan indukált ivarérelésének hagyományos és alternatív utjai. Diploma (VE Georgikon MgTud-i Kar, Keszthely), (Kézirat).

Müller, T., Binder, T., Tóth A. (2001): Hormonálisan indukált ivarérelés és ikranyerés az európai angolnában (*Anguilla anguilla* L.). VII. Ifjúsági Tudományos Fórum. Keszthely, március 29. CD kiadvány pp.1-5.

Müller, T., Binder, T., Tóth, A., Bercsényi, M. (2001): Az európai angolna (*Anguilla anguilla*) hormonálisan indukált ivarérelése és sikeres ikranyerése. XXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, május 16-17 (Abstract book p.51 /Halászatfejlesztés, Vol. 23., pp. 112-119).

Müller, T., Binder, T., Váradi, B., Bercsényi, M (2002): Hormonálisan indukált ivarérelés és spermanyerés európai angolna (*Anguilla anguilla* L.) hímekben. XXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, május 8-9 (Abstract book, p. 56).

Konferencia kiadványokban megjelent közlemények angol nyelven

Müller, T., Binder, T., Tóth, A., Bercsényi, M. (2001): Induced maturation and succesful eggs release in the European eel (*Anguilla anguilla*). Ramowy plan seminarium „Wylęgarnia 2001”, 14-15/March, Golysz, Poland. (Wylęgarnia 2001-2002 Wydawnictwo Instytutu Rybactwa, Olsztyn-Kortowo, pp. 103-104).

Müller, T., Binder, T., Váradi, B., Bercsényi, M (2002): Some characteristics of reproduction of Europeean eel. Ramowy plan seminarium „Wylęgarnia 2002”, 14-15/March, Golysz, Poland. (Wylęgarnia 2001-2002 Wydawnictwo Instytutu

Rybactwa, Olsztyn-Kortowo, p. 105.).