

## Zárójelentés

### Kutatási előzmény

Az európai angolna a klasszikus értelemben vett túlzásigterelés áldozata. A folyamatos ivadákszükséglet túl halászatukhoz vezetett, ami mellett más emberi tényezők (élelhely vesztés, szennyezések, stb.) is veszélyeztetik állományukat. Az állományuk megerősítését nehezíti, hogy nincs kidolgozva a faj mesterséges szaporítása. **Az összes, Európában található angolna természetes ívásból származik. Az angolnanevelő telepeken csupán a természetből befogott üvegangolnák továbbnevelése folyik/folyt.** 2002 októberében a ICES (*Nemzetközi Tengerkutatási Tanács*) egyértelmű figyelmeztetést tett közzé, miszerint az angolna állomány biológiai értelemben nincs többé biztonságban. A WWF (*Természetvédelmi Világalap*) a 10 legveszélyeztetettebb faj között tartja számon, majd a szervezet nyomására felkerült a CITES (*Egyezmény a Veszélyeztetett Vadon Élő Állat- és Növényfajok Nemzetközi Kereskedelméről*) II. Függelékbe 2007-ben. Az angolnát az IUCN (*Természetvédelmi Világszövetség*) Vörös Listás fajként tartja számon 2008 óta a “critically endangered” kategóriában. A projekt elsődleges célja az európai angolna mesterséges szaporítása és lárwanevelése. Célkitűzésünk indoklását az adja, hogy

- az európai partokhoz érkező üvegangolnák mennyisége évről évre erősen csökken,
- sok egyéb tenyésztett halfajjal ellentétben, a nagyon sajtáságosan szaporodó európai angolna mesterséges szaporításának csak kezdeti próbálkozásai ismertek, míg lárwaneveléséről csak közvetett – japán angolna lárwanevelés – ismereteink vannak,
- a zárt rendszerű nevelő telepek számára fontos volna a biztonságos és parazitamentes (tehát nem természetes szaporulatból származó) üvegangolna ellátás.

Annak ellenére, hogy számos európai kutatónak sikerült ovulált ikrát nyerni (összefoglaló: Palstra és Thillart, 2009), csak három csoportnak sikerült európai angolna lárvét kikeltetnie. Azonban ezeket sem tudták hosszabb ideig életben tartani, mint 2-17 nap (Bezdenezhnykh and Prokhorchik 1984; Prokhorchik, 1986; Prokhorchik et al., 1987; Pedersen, 2004, 2005; Tomkiewicz and Jarlbæk, 2006). Fontos megemlíteni, hogy a dán kutatócsoportnak nem sikerült táplálni a lárvékat, így ettől a ponttól nincs további ismeretünk a lárvak táplálkozás-biológiájáról és további tartás-technológiájáról. Az európai angolnával szemben, az angolna genus másik fájának - japán angolna (*Anguilla japonica*) - mesterséges szaporítása és nevelése sokkal előbbre tart. Ohta et al. (1996, 1997) írták le azt a protokollt, amit általánosan használnak ma is mesterséges szaporításukkor. Tanaka et al (2003) sikerült először felnevelni japán angolna lárvét üvegangolna korig és az idei évben történt a legnagyobb áttörés, Ijiri et al (2011) beszámoltak arról, hogy a ciklust bezárva F2 utódnemzedéket sikerült előállítani.

**Ivarérettségi vizsgálatok balatoni angolnáknban:** A vizsgálatok célja az indukált ivarérelési kísérletekre kiválasztott anyahal állomány felmérése ivari érettség szempontjából. Cél volt horvátországi állomány megmintázásai is, azonban a részben kutatási előzményben is megfogalmazott angolna természetvédelmi státusának megváltozása (fokozottan védett kategóriába sorolták az angolnát 2008-ban), valamint a Horvát Minisztérium nem reagált a 2008-ban beadott engedélykérelmünkre a vizsgálatokat a balatoni populációra korlátoztuk.

A 2010-2011 évi mintázások során összesen 161 angolnát dolgoztunk fel (n=116 tihanyi fogás, n=45 siófoki csapdázott), populációbiológiai- (otholit csiszolatokból meghatározott életkor, növekedési, kondíció), ivarállapotot jelző ún. silvering paraméterek (szem index, mellúszó index, GSI, HSI,) és parazitáltsági (úszóhólyag *Anguillicoides crassus* féreg tartalom, úszóhólyag index) szempontok alapján értékeltük az állományt. Az eredményeket összevetettük a 2002-2003-ban ugyanazon módszerrel nyert saját adatsorommal (Durif et al., 2009, n=240).

**Baltoni angolnák populációbiológiai sajátosságai:** Tatrai és munkatársai 2000-ben vizsgálták a baltoni angolnaállomány korszerkezetét. Megállapításaik szerint a mintázott 470-820 mm testhosszúságú egyedek 85%-a az 520-680 mm-es mérettartományba tartozott, a leggyakoribb korcsoport pedig a 9+ (74%) volt, amely az 1991-es telepítésből származott. 2001-ben az 1991-es telepítésből származó egyedek arányát a vizsgálatot végzők 86%-nak, míg 2002-ben 97%-nak "találták" (Tatrai et al., 2002 és 2003). Ezzel szemben az általunk vizsgált halak más korösszetételt mutattak: 20-36 évesek voltak (átlag 24,4 év) és a 1991-es telepítésből mindössze 22,4% származott. Ismerve az utolsó, 1991 évi telepítés relatíve csekély mennyiségét (560-700 ezer db, forrástól függően), illetve az elmúlt években kifogott, illetve a tóban még feltételezhetően élő halak mennyiségét, Specziár (2010) már korábban felhívta a figyelmet a Tatrai et al. (2002, 2003) által közölt eredményekben rejlő ellentmondásokra. Feltehetően a jelenlegi, tökéletesített otolith csiszolási technikának köszönhetően, a jelenlegi igen öreg példányok életkora is az esetek többségében jól meghatározható volt.

A jelenlegi baltoni ezüst angolna állomány a legöregebb Európa más, a közelmúltban vizsgált állományával összevetve. Mindez azonban az állományok testhosszában egyáltalán nem tükröződik vissza (Durif et al., 2009). Tehát azonos testnagyságnál sokkal idősebbek a Balatonban található egyedek, mint más (Certes n=97, Gironde n=15, Loire n=408, Nive n=83, Rhin n=523, Ste Eulalie n=62;  $\Sigma=1188$ ) európai vizekben. A Balatonba betelepített angolnák átlagos növekedési üteme a testhosszt illetően mára teljesen lecsökkent (2002-2003=40,2±5,9/nap, 2010-2011=29,2±4,4/nap). A 2002-2003-as adatokhoz viszonyítva (BW=354,6±151,9) ugyanakkor a testtömegben növekedést tapasztaltunk (BW<sub>2010-2011</sub>=672,3±214,7). Ez összefüggésben lehet a folyamatos halászattal, ami azt eredményezte, hogy az angolnák egyedszámának csökkenésével párhuzamosan csökkenhetett a fajon belüli versengés, javulhatott a táplálék ellátottság.

**Silvering paraméterek (Ivari érettségre utaló paraméterek):** Szemben a 2002-2003-as megfigyelésekkel, a külső morfológiai és belső fiziológiai paraméterek közötti kapcsolatok 2010-2011-re minden esetben lazultak, az individuális különbségek sokkal nagyobb szórásban mutatkoztak. Például szemindex és az érettségi együttható (GSI) kapcsolata 2002-2003-ban  $r^2=0,56$ ,  $P<0,05$ ; 2010-2011  $r^2=0,24$ ,  $P<0,05$ ). Ez összességében azt jelzi, hogy a jelenlegi idős állománynál a külső paraméterek alapján sokkal kevésbé lehet becsülni az ivaréresi folyamatok fokára, mint az korábban, egy fiatalabb állománynál tudtunk. További lehetséges magyarázat a kapcsolatok gyengülésére a 2010. év csapadék bősége - ami maga után vonta a Sió-csatorna megnyitását, és így feltehetően az ezüst angolnák elvándorlását. 2010-ben a siófoki angolnacsapdával több, mint 200 tonna angolna került kifogásra, amely a legutolsó állománybecsléseket alapul véve (Specziár, 2010), az állomány 20-30%-os csökkenését jelenthette egyetlen év alatt. Minthogy a siófoki zsilip ezt megelőzően döntően zárva volt, az angolnák sokáig nem volt lehetőségük elvándorolni; vagyis az ivarilag érettebb egyedek relatíve feldúsulhattak a Balatonban. Ugyanakkor, a vándorlásra érett példányok 2010-2011-ben a hosszantartó vízeresztésnek köszönhetően vándorlásba kezdhettek és a tóban az arányuk lecsökkenhetett, a még éretlen, alacsonyabb szem indexszel, illetve GSI-vel rendelkező egyedek pedig a tóban maradtak, így az ezüst és a bronz angolnák aránya megváltozott a Balatonban. Fontos kihangsúlyozni, hogy a 2011-es csapdázott egyedeink esetében az ivari érettségre utaló paraméterek, mint például a szemindex (9±1,53%) és GSI (1,06±0,29%) magasabb értékeket mutattak, ami várt eredmény volt, hiszen itt az ezüst angolnák aránya messze meghaladta a parti kövezésen mintázott angolnáknak fellelhető vándorérett egyedek arányát. Mindemellett, a hosszú „bezártságnak” (mintegy 10 évig elúszásra nem volt lehetősége a halaknak) egyéb következményei is lehettek. Az eredmények szerint például, a 2002-2003-as mintázásokhoz viszonyítva a mellúszóindex átlaga erőteljesen megnövekedett, jelezve, hogy a vizsgált halak egyszerűen már vándoréretté válhattak (mellúszó hosszban nem tud

csökkenni), ám mivel migrálni sokáig nem tudtak, így a belső paraméterekben (pl. erőteljesebb gonádfejlődés) a vándorlásra érett halakra jellemző állapot már sok esetben nem érhető tetten (esetleg ezen tulajdonságok képesek visszarendeződni a vándorlás gátlódásakor?). A Balaton vízeresztéséből adódhat az a megfigyelésünk is, hogy szemben a 2002-2003-as adatokkal (Durif et al., 2009) a vándorérett halak aránya tavasszal volt a legmagasabb és nem összefügg. Vagyis, a vándorlásra érett halak aránya 2002-2003-ban, a vízeresztés hiányában éven belül is nöhetett, míg 2010-2011-ben pont fordítva, a folyamatos elvándorlásnak köszönhetően éven belül csökkent.

**Parazitáltsági állapot:** A 2010-2011-es mintázásoknál a 115 halból 60 egyedben (52,17%) találtuk meg az úszóhólyagüregben az *A. crassus*-t valamelyik fejlődési formában. 5 hal bélrendszerében pedig bélélősködő fonálférget, 1 halnál észleltünk az ún. *papillomatosis*-át, azaz a karfiolbetegséget, illetve 2 halnál voltak külső, illetve a belső szervekben elváltozások. Az *A. crassus*-al kapcsolatos vizsgálatunk eredményei jól egybe csengenek Székely (1994), Székely et al. (1991) és Molnár et al. (1991, 1994) korábbi vizsgálataival, s azt bizonyítják, hogy az angolnaállomány sűrűségének jelentős csökkenése (Specziár, 2010) ellenére az *A. crassus* fertőzöttség még mindig igen magas szintű a Balatonban. A fertőzés mértéke 1995-ben is a jelenlegihez hasonló, 50% volt a tihanyi régióban (Molnár, 1995). Sajnos kifejtett parazita jelenléte, illetve annak hiánya nem tükrözi a parazitáltság pontos állapotát, hiszen elképzelhető, hogy egy hal úszóhólyagjában nincs féreg, azonban a féreg biológiai ciklusából adódóan (a bélcsatorna falát átfúrva tör az úszóhólyag felé) valójában már egy fertőzött halról van szó. Emiatt alkalmaztuk az állomány fertőzöttségi fokának jellemzésére az úszóhólyag indexet. Ugyanis, az üres úszóhólyaggal rendelkező halak is mutatnak olyan jeleket, amelyek korábbi fertőzöttségre utalnak (megvastagodott fal, gyulladásozó góccok, stb.). Fontos megjegyezni, hogy a megvastagodott, gyulladt úszóhólyag nem képes ellátni funkcióját, tehát az ilyen hal betegnek tekinthető. Vizsgálatainkból kiderül, hogy e kritérium szerint a balatoni állomány jelenleg 100%-ban mondható fertőzöttnek, igaz, az egyedek állapota jelentősen eltérő e tekintetben. Az egyik nagyon fontos megfigyelésünk az volt, hogy a vándorérett halak fokozottabb mértékben mutattak érzékenységet erre a parazitára (úszóhólyagindex(ÚH)= $0,78 \pm 0,45$ ; csapdázott angolnák ÚH= $1,08 \pm 1,7$ ; mint a bronzangolnák (ÚH= $0,53 \pm 0,31$ ). Springer és Luchtenberg (1991), valamint Palstra et al. (2005), kísérletileg bizonyították, hogy a fertőzött halak úszási sebessége csökken egészséges társaikéhoz képest. Molnár (1993) kísérletei eredményei világosan mutatták, hogy a parazitákkal fertőzött és károsított angolnák a környezetből érkező stressz iránt fogékonyabbak, és ezért olyan hatásokra is elhullnak, melyet nem fertőzött, vagy kevésbé fertőzött társaik még elviselnének. Szaporodás szempontjából így könnyen belátható, hogy ebből a szempontból rendkívül kedvezőtlen a balatoni angolnaállomány helyzete. A halak egészségi állapotának minden bizonnyal nem használ előrehaladott koruk, illetve, hogy minden évben újra és újra átesnek *A. crassus* fertőzésen.

#### **(Nehéz)fém vizsgálat ivarérlelés alatt:**

**Előzmény:** Egy korábbi vizsgálat során mesterséges ivarérlelés után Balatonból származó angolnákból sikeresen nyertünk ovulált ikrát (Müller et al, 2001), az ezt követő, azonos protokoll szerint végrehajtott, kísérletek során azonban a halak elpusztultak még a várt ikranyerés előtt (Müller et al., 2003, 2004a; Müller 2008; jelenlegi kísérlet sorozatok – lásd később). Az elhullások okát kutatva megállapítottuk, hogy azok nem magyarázhatóak az angolna fajban gyakran előforduló *A. crassus* jelenlétével, mivel a korábbi sikeres kísérletben súlyosan fertőzött angolnákat is sikeresen lehetett lefejteni (Müller et al., 2001). A halak kórboncolása során azt találtuk, hogy makroszkóposan ép epehólyag ellenére nagy mennyiségű epefesték volt a hasüregben, ami az epeutak károsodására utalt. Ekkor terelődött a gyanú arra, hogy az angolnák jelentős mennyiségű peszticid és/vagy (nehéz)fémet

akkumuláltak a zsírraktáraikba édesvízi életciklusuk során (1991-ben volt az utolsó telepítés, így minimum 18 éves (2008-ban végeztük a vizsgálatokat), de inkább idősebb halakkal dolgoztunk), ami az indukált ivarérlelés során, a táplálékfelvétel hiánya, valamint a fokozott vitellogenézis miatt, mobilizálódva súlyos károsodást okozhatott több szervben, így a májban és/vagy az epehólyagban is. Emiatt az eredeti kutatási tervben megfogalmazott ivarérési protokoll fejlesztése helyett a nagymértékű, és további vizsgálatainkat gátló tényezőre, az elhullás pontos okára igyekeztünk fókuszálni. 12 balatoni angolna kontroll ( $K_{\text{testtömeg}}=860,83\pm 324,5$  g) és három hónapos mesterséges tengervízi környezetben ivarérlelésen átesett 9 ( $KEZ_{\text{testtömeg}}=1052,58\pm 408,79$  g) hal szerveinek (máj, izom, petefészek) (nehéz)fém tartalom változásait vetettük össze (Fe, Cu, Zn, Mn, Pb, Cd, Hg, As). Az indukált ivarérlelés során a szem megnövekedett ( $KEZ_{\text{I index}}=14,78\pm 2,96\%$ ) a petefészek erőteljes fejlődésnek indult ( $KEZ_{\text{GSI}}=12,03\pm 2,37\%$ ), valamint szignifikánsan ingazolható ( $p<0,05$ ) nagyobb máj index-szel ( $KEZ_{\text{HSI}}=1,57\pm 0,18\%$ ) rendelkeztek, mint a kontroll halak ( $K_{\text{Index}}=10,06\pm 3,17\%$ ;  $K_{\text{GSI}}=1,28\pm 0,16\%$ ;  $K_{\text{HSI}}=1,23\pm 0,32\%$ ). Az ivarélt halak a kezelés megkezdésétől számított 70.-115. nap között elhullottak. A kezelt halak testüregében minden esetben ép epehólyag ellenére epefestéket találtunk. Kezeletlen halak petefészket previtellogenikus – és kortikális alveolusok fázisában lévő oocyták jellemezték. Az legfejlettebb oocyták átmérője 50-130  $\mu\text{m}$  között változott, az oocyták között nagy mennyiségű zsírszövet is látható volt. A kezelt halak a kezelési csoportoktól függetlenül reagáltak a hormonkezelésre, az oocyták fejlettségét figyelembe véve a csoporton belül nagyobb individuális különbségek adódtak, mint a kezeléseik között. Jellemző képletek: korai vitellogenikus oocytáktól (oocytá átmérő 250-300  $\mu\text{m}$ ), a közép és késői vitellogenikus fázison ( $\varnothing$  300-350  $\mu\text{m}$ ) a vándorló nukleus fázisig ( $\varnothing$  400  $\mu\text{m}$ ) minden megtalálható volt. Zsírszövet nem volt az oocyták között.

A vizsgált fémek közül a vas és kadmium esetében lehetett egyértelmű petefészki felhalmozódásról beszélni. Mivel a vas az eritrociták fontos eleme és a fejlődő, megnövekvő petefészekben a vérér törzsek mennyisége és hossza is többszöröse, mint ivarilag éretlen állapotban, így ennek az elemnek a nagymértékű felhalmozódása normális fiziológiai folyamatnak tekinthető. Azonban a Cd (és Pb) esetében egyértelműen egy káros remobilizációs folyamatról van szó, így a következőkben ennek hatására fókuszáltunk és próbáltunk magyarázatot találni a megfigyelt jelenségre.

A vízből és táplálékláncban feldúsuló erősen toxikus  $\text{Cd}^{2+}$  az emésztő traktusból szívódik fel. A  $\text{Cd}^{2+}$  nagy része a májba jut ( $K_{\text{máj}}: 1,11\pm 0,13$   $\mu\text{g/g}$ ), ahol főleg metallothioneinhez (MT) kötődik. A májból folyamatosan kerül ismét a Cd, immár Cd-MT komplex formájában a szisztémás vérkeringésbe és ennek révén különböző szervekben ( $K_{\text{filé}}: 0,92\pm 0,22$   $\mu\text{g/g}$ ;  $K_{\text{petefészek}}=1,14\pm 0,19$   $\mu\text{g/g}$ ) felhalmozódik, más része viszont a vesében kiválasztódik, de a proximális tubulusban részben reabszorbeálódik. Az indukált ivarérlelés időszaka alatt, amikor a halak nem táplálkoztak a filé  $\text{Cd}^{2+}$  tartalma lecsökkent, ( $KEZ_{\text{filé}}=0,67\pm 0,51$   $\mu\text{g/g}$ ), ami feltehetően arra vezethető vissza, hogy a hátizom zsírraktárai részben mobilizálódtak. Egy másik ivarérlelési kísérletben elvégzett felmérésünk szerint 14 hét alatt az ivarélt halak filéjének kiindulási volumetrikus nagysága átlagosan 21,4% mértékben csökkent. Ez a változás elsősorban a filé zsírtartalmának csökkenését jelenti, mivel egy 8,9% GSI értékkel jellemezhető hal filéjének zsírtartalma 8,8%-kal csökkent (Müller et al., 2004a). A volumetrikus nagyság csökkenésének hátterében másfelől az izomrostok átmérőjének csökkenése is állhat (Pankhurst, 1980). A szisztémás vérkeringésen, majd a májon keresztül ( $KEZ_{\text{máj}}=0,57\pm 0,54$   $\mu\text{g/g}$ ) re-mobilizálódó  $\text{Cd}^{2+}$  súlyosan károsíthatja az epevezeték, feltevésünk szerint emiatt figyelhettük meg a kórboncolás során épnek mutató epehólyag ellenére is nagy mennyiségű epefesték akkumulációt a hasüregben. A hasüregbe jutó epesavas sók emulgeálják a zsírokat, ezzel súlyos membránkárosodásokat idézve elő, ami következményesen a hasüregben gyulladós folyamatokat, majd végül

általános szepszist idézett elő. Ezzel párhuzamosan a **petefészek abszolút Cd<sup>2+</sup> tartalma nagy arányban megnőtt (12 szeresére! 53,51 µg/hal)**, ami a kadmium citotoxikus hatása miatt közvetlen gaméta károsodást is okozhatott. Következésképpen megállapítható, hogy az amúgy is idős balatoni nőivarú angolnák (minimum 18 évesek - 2008-as gyűjtés) indukált ivarérlelése során a Cd<sup>2+</sup> újra felhalmozódhat a petefészekben, ezzel "önmérgezést" idézve elő, ami azt is előrevetíti, hogy a hazai (balatoni) angolnák mesterséges szaporítására az esély nagyon kicsi! A magas életkor, és ebből adódóan a (nehéz)fémek feldúsulása a halak szervezetében a természetes elvándorlás során is re-mobilizálódhat és az úszóhólyag parazita fertőzöttségével társulva nagyon jelentős mértékben károsíthatja az anyahalak szervezetét. Pierron et al. (2008) a GSI értékét, a kondíció faktort és a petefészek oocita fejlettségi állapotot vizsgálták normál és 'Cd előkezelt' angolnák 22 hétig tartó mesterséges ivarérlelése során (az ivarérlelés előtt egy csoportot 30 napig jelentős mennyiségű - 15 µg · L<sup>-1</sup> - Cd-ot tartalmazó vízben tartották). Eredményeik részben alátámasztják saját vizsgálataink eredményeit, mely szerint a petefészekben és a májban a Cd tartalom megnövekedett, az izomban azonban vizsgálatukban, saját eredményeinkkel ellentétben, szintén szignifikánsan igazolható mértékben nőtt a Cd<sup>2+</sup> tartalom! Az eltérés oka minden bizonnyal az előkezelés során felhalmozódó Cd<sup>2+</sup> mennyiség eltérő módon történő Cd re-mobilizációja lehet. A balatoni angolnákban ugyanis a több évtizednyi folyamatos akkumulációt követően indult meg a Cd re-mobilizáció és annak abszolút mennyisége is bizonyosan lényegesen nagyobb volt a balatoni angolnákban. Pierron et al (2008) hivatkozott vizsgálatukban az ivarérettséget elért halak petefészek mintáiban atretikus oocytákat is megfigyeltek (GSI átlag 33,32%). Saját vizsgálatunk során a legnagyobb GSI-vel rendelkező halban (KEZ<sub>GSI</sub> =14,99%) vándorló nukleusz stádiumú oocytákat találtunk, a citoplazmában a vitellogenin összeolvadásával párhuzamosan. Érdekes megfigyelésünk volt, hogy ebben a stádiumban az oocyták alig érték el a 400 µm átmérőt, míg más vizsgálatok során a hisztológiai képről mérve ennél jóval nagyobb méretűnek (860 µm - Chiba et al., 1994; 800 µm - Asturiano et al., 2002) adódtak a hasonló fejlettségű sejtek. Geraldine Fazio szóbeli közlése szerint *A. crassus*-szal fertőzött hímek ivarérése hamarabb bekövetkezik, mint parazitamentes társaiké. Feltételezhető, hogy a Cd a nőivarú halakban a hímekhez hasonlóan olyan hatásként jelentkezett, ami szintén gyorsította az ivarérést, ami a gaméták nem megfelelő fejlődését okozhatja.

***A balatoni angolna állomány populációbiológiai-, ivarérettségi-, és egészségügyi eredményei azt mutatják, hogy a vándorlásában akadályozott, túlkoros balatoni angolna (20-37 életév) szaporodó képessége lecsökkent. Az indukált ivarérlelés során vizsgált (nehéz)fém mobilizáció és remobilizáció eredmények figyelembevételével arra a következtetésre jutottunk, hogy az angolna ivaréréssel járó intenzív fiziológiai folyamatok jelentette megterhelést nem képesek túlélni, a balatoni angolnaállomány konzerváció biológiai értéke ma már elenyésző.***

**Ivarérési kísérletek.** Párhuzamosan futó 10 hormonálisan indukált ivarérlelési kísérletét hajtottuk végre 2008 és 2011 között az Attalai Hal Kft telepen (Dr. Horváth László Professzor Úr segítségével) és SZIE Halgazdálkodási Tanszéken.

A főbb eredmények összefoglalása:

- A világon először sikerült vitellogenikus oocytafejlődést beindítani édesvízben ivarérlelt angolnákban. A 12 hetes kísérlet alatt 10 mg/testtömeg kg pontyhipofízissal/hét (10PH) kezelt halak 8-13,9%-os GSI-t értek el (n=7), az oociták a közép és késői vitellogenikus fázisba léptek. Eredmények részletesebben: Horváth, Székely, Cs., Boczonádi, Zs., Bercsényi, M., Urbányi, B., Müller, T. (2011). *Induced oogenesis of the European eel (Anguilla anguilla L.) in freshwater condition. Acta Biologica Hungarica 62(4), 485-488.*

Fontos megfigyelésünk az volt, hogy a tengervíz sókoncentrációjának hiánya nem

limitálja az exogén hormonhatásra (hetenkénti pontyhipofízis kezelésre) bekövetkező oogenezist, ezért édesvízben is lehet petefejlődést kiváltani az európai angolnánál, megfelelő parazitaellenes baktérium és vírusfertőzést megelőző kezelések mellett. Következtetésünk szerint a tengervízre jellemző 32-38 %-es ionkoncentráció a katadróm európai angolna esetében nem tartozik a faj gametogenezisét szabályozó alaptényezők közé, mivel édesvízben is szignifikáns oocitafejlődés provokálható. A kísérleteket megismételtük több esetben Attalán, illetve a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén, de nem tudtunk jobb eredményt elérni annak ellenére, hogy a kísérlet során a halakat preventive fürdettük mebendazol tartalmú Vermox-szal (n=30). A sikertelenség okát a balatoni halak életük során felhalmozott és az ivarérelés során remobilizálódó (nehéz)fém és/vagy klórozott szénhidrogén okozta önmérgezésben látjuk, amit korábban kísérletes eredményekkel is bizonyítottuk. Mindenképpen törekszünk az édesvízi ivarérelési kísérleteket a jövőben megismételni nem balatonból származó angolnák esetében.

- Sósvízi ivarérelési kísérletben a kezelési és fiziológiai stressz (exogén GtH vérhormon csúcs) csökkentésére alkalmazott - csukában eredményesen használt - "carbopol 971P polimer" retard hatású vivőanyaggal kevert hormonal kezeltünk két csoportot és egy másikat retard hatású vivőanyag nélkül (kontroll), de azonos hormondózissal. A kísérleti halak balatoni fogásból származtak.

- 1.csoport – heti egyszeri kezelés (10 mg pontyhipofízis/testtömeg kg 1 ml carbopolban elkeverve), n=5

- 2. csoport –kétheti kezelés (10 mg pontyhipofízis/testtömeg kg 1 ml carbopolban elkeverve), n=5

- 3 csoport - heti egyszeri kezelés (10 mg pontyhipofízis/ testtömeg kg), n=5

A kezelés eredménytelen volt; halak belső szerveiben összenövés keletkeztek, gyulladással góccok jelezték, hogy a carbopol nem szívódott fel, a halak a kísérlet kezdetétől hozzávetőlegesen 2 hónap alatt elpusztultak. A petefészkek nem indult fejlődésnek (heti carbopol-os kezelés+10PH GSI (GSIá)=1,15±1,12%, kétheti carbopol+10PH GSI=1,71±0,69, kontroll 10PH GSI=2,12±1,5a csoportok oocytái nyugalmi állapotban maradtak..

- Dr. Horváth László Professzor Úr saját fogásából 8 Berekből származó angolnát adott a Tanszék részére ivarérelési kísérletre. A berki angolnák nem voltak *A. crassus*-szal fertőzve, így nagy reményeket fűztünk az indukált ivarérelésük sikerességéhez.

Kezelés:

- 1. csoport - 10 mg pontyhipofízis / testtömeg kg/hét, n=4

- 2.csoport - 10 mg pontyhipofízis + 2mg dopamin D1 receptor antagonist [Motilium™, Janssen Pharmaceutica Co., Beerse, Belgium], n=4

Előrehaladottabb ivarérelést sikerült elérni 2,5 hónap alatt: 10PH GSI=8,05±1,96%; 10PH+2mg Dopamin receptor antagonist kezelés GSI=7,6±1,15%. A 8 hal úszóhólyag indexe = 0,49±0,26%; az *A. crassus* fertőzöttség hiányában alacsonyabb volt, mint hasonló stadiumban lévő balatoni társaikké, bár meg kell jegyezni, hogy hatalmas individuális különbséget mutattak (2010-2011 felmérés, n=37, ÚH=0,78±0,45%; csapdázott 2011, n=43 ÚH=1,08±1,7%). Mivel a halak ismeretlen okokból elpusztultak, így nem tudjuk kizárni azt a feltételezést, hogy hasonlóan a balatoni társakéhoz a hosszú életkor alatt jelentős, biológiai tűrőképességet meghaladó szennyező anyag felhalmozódás - nehézfémek, PCB, stb. - és újraeloszlás okozta a pusztulásukat.

- Velencei tóból származó angolnák esetében a heti 2 alkalommal 6. illetve 3 mg/ testtömeg kezelése szintén csak előrehaladottabb ivarérelést siker csak elérni 3 hónap alatt (6PH GSI=5,86±1,02%, n=5; 3PH GSI=5,85±1,01% n=6). Fontos megjegyezni, hogy a Velencei tóba 1972-ben volt utoljára telepítés, tehát minimum 38 éves halakkal dolgoztunk (az életkor meghatározást még nem végeztük el)! . A három sósvízi csoportot összevetve a

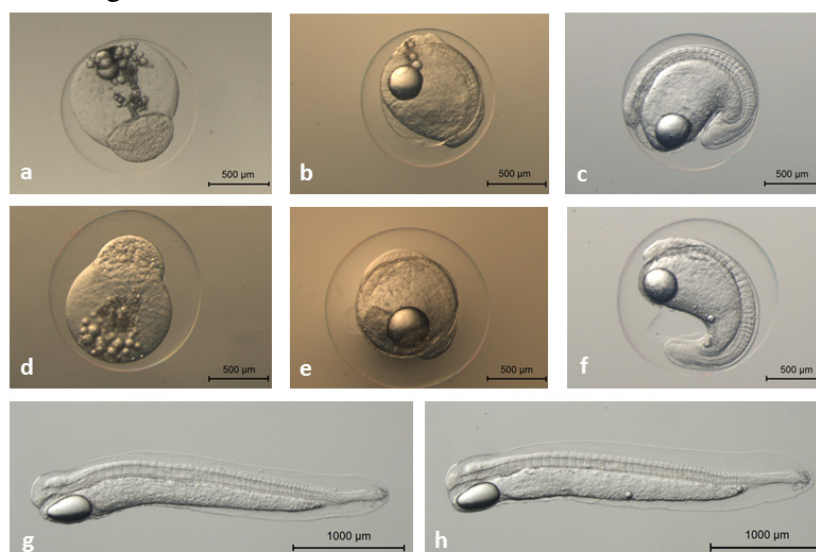
velencei angolnák esetében mértünk a legnagyobb úszóhólyag indexet, ami szoros kapcsolatban van az *A. crassus* fertőzöttségükkel is.

### Hibridizációs kísérlet japán angolna ikrás és európai angolna hím között mélyhűtött spermaminták felhasználásával

Az édesvízi ivarérelés a nyert sperma mennyiségi (sperma térfogat, spermiumszám), minőségi (mozgóképesség) és finomszerkezeti tulajdonságai (elektronmikroszkópos vizsgálat) alapján nem különbözik a sós vízben leírtakhoz képest (Müller et al., 2005). Termékenyítési teszt hiányában azonban ez idáig nem volt alátámasztva egyértelműen, hogy az édesvízi érlelés felválthatja-e a sósvíz használatát. Több spermamélyhűtési protokoll ismert angolna esetében (Asturiano, 2008 összefoglaló munkája), azonban ez idáig eredményes termékenyítési tesztről nincs publikáció. A sperma mélyhűtés sikerességét eddig közvetett információk alapján becsülték meg (motilitás, progresszív motilitás, mozgóképesség ideje, stb.). A kísérletünkben 2 kérdésre kerestük a választ egy időben:

- édesvízi ivarérelés akadály-e a mesterséges szaporításnak hím angolnák esetében?
- felolvasztott sperma alkalmas-e termékenyítésre?

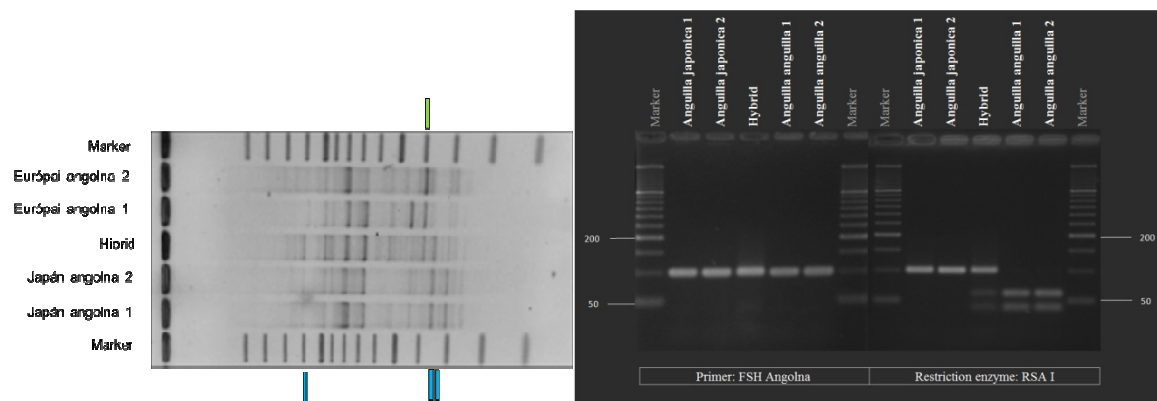
AZ OTKA PD pályázat keretén belül lehetőségem nyílt résztvenni japán angolna indukált szaporítási kísérletben Japánban, illetve általunk mélyhűtött európai angolna sperma minták termékenyítési tesztelésére. A kísérleteket a Hokkaido Egyetemen hajtottuk végre, ahol a világon először sikerült angolnát szaporítani és jelenleg is a világ vezető Intézete ezen a területen. Ohta et al. (1996) protokoll alapján történt az ikrások ivarérelése és indukált ovulációja. A termékenyítést ún. száraz termékenyítési eljárással végeztük. 1 g ikra mintát a műszalmányi spermával vagy a lefejt japán angolna spermával (angolna Ringerben hígított sperma –kontroll tételek) összekevertük és mesterséges tengervízzel aktiváltuk. Az egy ikrából származó ikratételeket 3 ismétlésben termékenyítettük és nagyszámú ikra ellenére (~1600 ikra / petri csésze) mindössze 3 kontroll és 3 hibrid lárva indult fejlődésnek és kelt ki. Az eredmények azt mutatják, hogy habár 50 éve sikeresen szaporítanak angolnát Japánban, még így sem lehet garantálni minden szaporítási ciklusban a jó minőségű ikratermelést. (A kísérleteket jelenleg ismétlem meg a Tokyoi Egyetemen és 10-15%-os kelési eredményeket érünk már el, ami statisztikailag nem különbözik a mélyhűtött japán angolna sperma termékenyítőképeségétől). A hibrid és japán angolna embrió és lárvagenezise között nem tapasztaltunk különbséget.



Japán (a, b, c, g) és japán×európai hibrid angolna (d, e, f, h) embriófejlődésének néhány állomása és kelő lárváik. Termékenyítéstől eltelt idő órában – h) balról jobbra: 1h: blastula állapot (high stage), 15.30 h: ~10 szomitás állapot, 22.30 h: 30 szomitás állapot, 34 h:

## *lárvakelés*

A genetikai vizsgálatokat két helyen a Pannon Egyetem Georgikon Karán, illetve a Szent István Egyetem Mezőgazdaságtudományi Karán végezték el. A hibridizáció tényét startcodon-célzó ún. start codon target polymorphism (SCoT) markerekkel tesztelték. Állati minta esetében ezt a módszert most alkalmazták először a világon. Az apai illetve anyai polimorf fragmentek keresését a Collard és Mackill (2009) által közölt primerekkel és PCR profillal végezték. A gélelektroforézis eredményei alapján 4 olyan fragmentet (3 anyából = japán angolna és egy apából = európai angolna származó fragment) találtak, amelyek a hibridekben is kimutathatók voltak. Az európai angolna és a japán angolna hibridizációjának igazolását a két faj FSH génjében található pontmutációra alapozva is elvégezték (PCR-RFLP). Az erre a faj elkülönítő bélyegre tervezett molekuláris genetikai markerrel egyértelműen igazolták a hibrid egyedben mind az apai mind pedig az anyai allélek egyidejű jelenlétét (az ebből készült publikáció elbírálás alatt van).



*Balra -A hibrid utódok genetikai igazolása SCoT analízissel. A hibridizációt alátámasztó polimorfizmusok: zöld jel: apai eredetű fragment, kék jel: anyai eredetű fragmentek. Jobbra -PCR-RFLP analízis japán angolna, hibrid és európai angolnában. PCR termék FSH Angolna F és FSH Angolna R primerek (balra) és a töredék fragmentek a restriktív enzim (RSA I) hatására jobbra. Marker= 50 bázispár molekula súly marker (Fermentas, EU).*

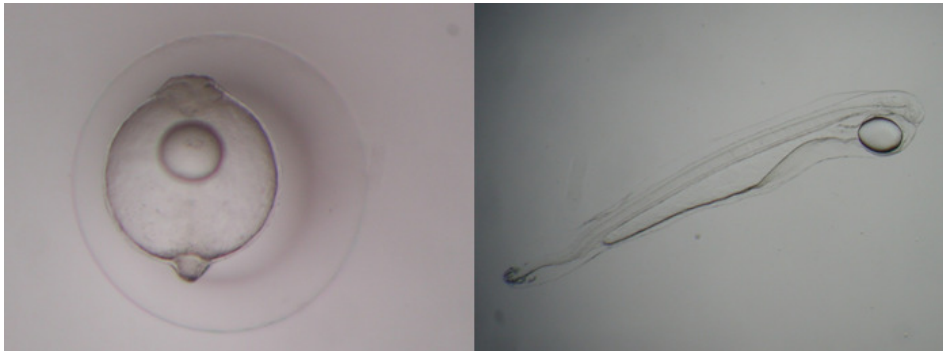
***Általunk kifejlesztett és leírt spermamélyhűtési technológia (módosított Tanaka hígító és metanol védőanyag használata, Müller et al., 2004; Szabó et al., 2005) segítségével először nekünk sikerült mélyhűtött sperma felhasználásával eredményes termékenyítési tesztet végrehajtani, lárvát nyerni. Az eredmény értékét növeli, hogy a tejeseket édesvízben ivaréreltük, valamint az, hogy a minták 2005-ben mélyhűtött spermákból származtak (hosszútávú tárolás).***

### **CASA (Computer Assisted Semen Analysis) hímivarsejt minőség ellenőrzés**

A módszer lényege, hogy a sperma vizsgálatára használt mikroszkóphoz kamerát csatlakoztatnak, és annak a jeleit 1 másodpercen keresztül rögzítjük. A rögzítés a számítógép merev lemezére történik olyan módon, hogy először a kamera által közvetített analóg képet egy digitalizáló kártya segítségével digitális jelekké alakítja, hogy a számítógép számára értelmezhető legyen. Mért és vizsgált paraméterek: íves vonalú mozgás sebessége (VCL) (időegység alatt ténylegesen megtett íves vonalú út), egyenes vonalú mozgás sebessége (VSL) (a spermafej egyenes vonalú mozgásának kezdő és a végpontja közötti távolsága alapján), VAP megtett út átlagsebessége, sejtszám, motilitás, progresszív motilitás (tényleges, haladó mozgással rendelkező sejtek aránya). Sperma minősítést 2003, 2005, 2007, 2011 évben mélyhűtött mintákban végeztük el. A legfontosabb megfigyelésünk az volt, hogy a



hosszan tartó mélyhűtés során az azonos pool-ban kezelt spermaminták felolvasztása után vizsgált minőségében nagy egyedi különbségek mutatkoztak (progresszív motilitás 0-76%). Ennek okait nem kutattuk, de elképzelhető, hogy a folyékony N<sub>2</sub> tartályban a kaniszterekben lévő spermaminták némely esetben nem egyenletesen voltak folyékony N<sub>2</sub>-ben. Elképzelhető, hogy az évek során az elpárolgó N<sub>2</sub> némely esetben csak a gőzében lepte el a mintákat (-80 °C), ami okozhatta egyes minták részleges károsodását, gyengébb motilitását. Fontos kihangsúlyozni, hogy 2011. november 30. és december 10. között a Tokyo University of Agriculture, Aquatic Biology tanszékén (Abashiri, Hokkaido) hibridizációs kísérleteket hajtottunk jelenleg is, így a nagy individuális különbségekkel rendelkező műszalmák termékenyítő képességét fel fogjuk tudni mérni (Az előbb említett összes évjáratból tesztelünk mintákat). A termékenyítési kísérletekből nyert információk fontos elemei lesznek a CASA géppel végrehajtott spermaminősítés és a tényleges termékenyítési képesség különbségeiben a feltáráshoz.



*Mélyhűtött sperma felhasználásával létrehozott hibridek (*Anguilla japonica* × *A. anguilla*)*

### **Intra- és interspecifikus oocita transzplantáció**

**Intraspecifikus oocita transzplantáció:** Az OTKA tématerv megfogalmazása idejében csatlakoztam a tanszéki oocita transzplantációval foglalkozó kutatócsoporthoz (kutatásvezető Dr. Csenki Zsolt), előkísérleti eredményeik alapján reményt látva, hogy angolna esetében interspecifikus oocitátranszplantáció is megoldható. Kísérleteink célkitűzése volt, hogy fiatal donor (I.-III. stádiumú, a szikfelhalmozás előtti, de még jól látható sejtmaggal rendelkező) oocyták "nevelő"-anyába juttatása után, nyomonkövetni hogy hogyan viselkednek a recipiens petefészekben, illetve nyerhetők-e belőlük ovulált, termékenyítésre alkalmas donor genetikai állományú ikrák. Ezzel párhuzamosan célként fogalmaztuk meg angolna oocyták beültetését könnyen tartható halak petefészkébe vizsgálva az oocyták megtapadását, túlélését és a fejlődésüket.

A fajon belüli, zebradánió intraspecifikus transzplantációt sikeresen végrehajtottuk. Az átültetést a transzgenikus markerrel ( $\beta$ -aktin YFP) nyomon követve megállapítható, hogy a transzplantált donorsejtek egy része már az első napokban felszívódott, míg másrésztük beépült a recipiens anya petefészkébe. A bejuttatott, ép oocyták száma az első két napon csökken jelentősen. Amelyek az 5.-6. napon még jelen voltak a recipiens petefészekben, azok tovább fejlődtek, és legalább a 4. fejlődési fázisig jutottak. Az ellenőrzések során összesen négy YFP aktivitást mutató embriót találtunk, amelyek két különböző recipiens anyától származtak. Az egyik recipiens anya utódai között két transzgenikus egyedet találtunk a transzplantációt követő harmadik héten. A másik anya utódai közül szintén kettő mutatta a transzgen jelenlétét, viszont itt egy embrió a harmadik, egy a negyedik szaporításból származott. A transzplantált follikulusból származó ivadék a kontrollként használt transzgenikus ivadékhöz hasonlóan sárgás-zöld fényben izzott fluoreszcens megvilágításban, azokon a területeken, amelyek a transzgen megnyilvánult. Hasonló izzás a recipiens anya saját follikulusaiból származó utódjánál nem volt megfigyelhető. Az összes donor follikulusból származó ivadék a korának megfelelő, normál fejlődést mutatott a vizsgálati idő

alatt. Eredmények részletesebben: Csenki, Zs., Zaucker, A., Kovács, B., Lefler, K.K., Hegyi, Á., Müller, T., Kovács, R., Hadzhiev, J., Urbányi, B., Váradi, L., Müller, F. (2010). *Intraovarian transplantation of early stage follicles results in viable offspring and provides tool for manipulation of maternal effect gene products in zebrafish. International Journal of Developmental Biology 54: 585-589. doi: 10.1387/ijdb.082786zc . URL (szabadon letölthető: <http://www.ijdb.ehu.es/web/contents.php?vol=52&issue=Next>*

A cikkben is kitértünk arra, hogy gyakorlati alkalmazását az intraspecifikus transzplantációnak éppen az angolna esetében látjuk (4. oldal): „*Besides developmental biology applications, oocyte transplantation (similarly to primordial germ cell transplantation (Okutsu et al., 2006)) may assist in developing tools for animal husbandry applications such as oocyte cryopreservation for rare strains / species, as well as for the in vitro reproduction of farmed fishes with problematic induction of sexual maturation (e.g. Anguilla sp.)*.”

### **Interspecifikus oocyta transzplantáció**

Angolna donor és zebradánió recipiens fajjal három esetben (2008-2009), míg angolna donor és afrikai harcsa recipiens fajjal egy alkalommal (2009-2010) próbáltuk meg az oocitabeültetéseket. A donor hal minden esetben Balatonból származó angolna volt (n=5, 209-560 g). A zebradánióhoz képest több jelentős különbség volt a petefészkek szerkezetében, ami az oocyták kinyerését hátráltatta. Egyfelől az ivarilag éretlen angolna petefészkében nagy mennyiségű zsírszövet raktározódik, ami akadályozta az oociták szétválását egymástól. A zebradánióhoz képest az angolnából kinyert oocyták jóval kisebbek voltak, alkalmatlanok bizonyos jelöléses injektálási technika alkalmazásához. Zebradánió recipienssek esetében az első kísérlet sorozatkor megpróbáltuk a lehető legtöbb oocytát bejutatni a petefészkébe. Egy menetben maximum 150-150 kb 80-100 µm nagyságú oocytát sikerült a jobb és a bal petefészkekbe bejutatni egy speciális, előzőleg átalakított pipetta hegy segítségével. Az első kísérletsorozatban a beültetést követő 24h-ként a recipiens zebradánióból 3-at elöltünk egy héten keresztül és alkalmazott szövettani metszetek segítségével próbáltuk megtalálni egy-egy beépült oocitát. Sorozatmetszésre akkor nem nyílt lehetőségünk. Egyetlen oocytát sem sikerült találnunk, ami az angolnából származott volna. Fontos megemlíteni, hogy az angolna oocita (previtellogenikus, kortikális vakuólomok fázis) morfológiailag jól elkülöníthető a zebradánió hasonló fejlettségű sejtjeitől. Egyetlen „másodlagos” eredményt sikerült elérnünk – a zebradániók késői vitellogenikus fázisában lévő oocyták fejlődését lehetett nyomkövetni a napi minták feldolgozása során.

A második kísérletsorozatban a beültetést hasonlóan hajtottuk végre, de ekkor az oocita felderítésre sorozatmetszést alkalmaztunk. A gonádonkénti 7-10 metszés még mindig kevésnek bizonyult az angolna oocyták felfedezésére.

A harmadik kísérletsorozatban a beültetést hasonlóan végrehajtottuk, majd a zebradániókat 4-6 hetente ikrázásra készítettük. Reméltük, hogy egy-egy oocita beépül egy ovulált follikulumba, majd a megtapadás után akár fejlődésnek is indulhat, illetve a végső érést elérve ikraként ovulálhat. 5 szaporítás után sem sikerült megfigyelniük „angolna ikrát”. Az intraspecifikus hibridizáció alkalmazásával is a beépülés alacsony %-on maradt, így valószínűsítettük, hogy zebradánió esetében a nagy törzsfajlás különbség miatt is az angolna oocyták nem tapadtak meg még kezdeti stádiumban sem. Próbálkoztunk jelölő festék beinjektálásával is, de az angolna legfejlettebb oocita mérete (~100-150 µm) sem érte el azt a nagyságot, amit érdemben jelölni tudtunk volna.

Afrikai harcsa esetében egy előkísérleti munkát próbáltunk reprodukálni. Egyéves afrikai harcsa ikrásokat (n=6, átlaghossz: 15 cm) használtunk fel, amiket nem engedünk nagyra nőni irányított takarmányozással, hogy ivarérettségüket kezelhető nagyságban érjék el. Az első szaporításuk után katéter segítségével egy hal petefészkébe egy angolna macerált, de nem szétválogatott petefészkek darabjait (petefészki zsírszövettel együtt), oocitáit ültettük be. Ezt követően a kísérleti halakat egyedileg tartottuk 15 literes belső szűrővel felszerelt

akváriumokban és a beültetést követő első hónapban, majd a harmadik hónapban indukált szaporítási eljárással ismételtelen lefejtük. A lefejt ikra ellenőrzése után minden esetben ismét egy-egy angolna petefészkek darabjait és oocitáit transzplantáltuk katéter segítségével, majd az utolsó beültetést követő 6 hónapig csak tartottuk a recipiens halakat. Az utolsó szaporításkor 2010 február 5. a lefejt ikratételeket ismételtelen átvizsgáltuk, de angolna ikrát nem találtunk.

***Kutatócsoportunknak sikerült először sikeres intraspecifikus oocyta transzplantációt végrehajtani zebradánióban, melyből életképes utódok keltek ki, azonban angolna donor faj esetében az általunk kísérletbe vont zebradánió és afrikai harcsa nem volt megfelelő recipiens. Fontos kihangsúlyozni, hogy azonos fajok közti oocyta transzplantáció sem mindig sikeres, illetve hatékonysága autoimmun folyamatok miatt alacsony.***

### ***Kecsege ivarérlelési kísérlet***

Az első évben felismerve, hogy a balatonból (és később, berekből, velencéből) származó angolnákkal nem vagyok képes a project fő célkitűzését elérni témamódosítási kérelmet nyújtottam be, hogy a munkatervtől eltérően más fajban is alkalmazhassam azokat a módszereket, amiket angolnában használunk fel.

Célul tűztem ki a japán angolnában sikeresen alkalmazott hormonálisan indukált ivarérlelés protokoll adaptálását a kecségére, vizsgálva a gonádokban végbemenő változásokat, faji és egyedi jellegzetességeket (hisztológiai nyomkövetés, valamint egyes halakban vérplazmából kimutatható ivari hormon szintméréssel). A célkitűzés alapja az volt, hogy ha a tokfélék ivari érését gyorsítani lehet, úgy nem szükséges akár 15 évet is várni ivari érésük eléréséhez, hanem korábban lehet leszorítani őket, a nyert ivadékot természetvédelmi halasításra lehet felhasználni. A tokfélék modelhala a kecsége, kis testmérete, viszonylag gyors ivarérése, és a többi diadrómus tokfélétől eltérő kizárólag édesvízi életciklusa miatt.

A kísérleti halakat intenzív nevelési rendszerből származó halak közül választottunk ki 2009 áprilisában. 33 egy éves kecségét válogattunk ki és szállítottunk a SzIE Halgazdálkodási Tanszékre. 2 hónapos akklimatizációt követően kezdtük meg az ivarérlelési kísérletet. 7 egyedet leöltünk (kiinduló állapot) és testparamétereik mellett, lemértük a gonád tömeget, valamint gonád mintákat további hisztológiai vizsgálatra fixáltunk. A fennmaradó halakat (átlag testtömeg: 240 g) két csoportra bontottuk. A csoport (kontroll) egyedeinek jobb mellúszóját csonkoltuk és a kísérlet során nem kezeltük (n=11). B csoport (kezelt) halait nem jelöltük, a halakat 5 mg / egyed pontyhipofízis dózissal kezeltük (n=16). A kísérlet időtartama 20 hét volt (20 kezelés) és kontroll és kezelt halakat leöltük, testparamétereik felvétele után, gonád tömeget mértünk, illetve gonád mintákat fixáltunk hisztológiai vizsgálatokhoz.

A kísérlet végén egy hal oocitája fejlődésnek indult (vitellogenikus fázis = 1008  $\mu$ m sejtátmérő), míg a nem kezelt (n=11) és további kezelték (n=15) között nem tudunk statisztikailag igazolható különbséget kimutatni (195  $\mu$ m átlag egyedi legnagyobb sejtátmérők)). Másodlagos eredményként azt figyeltük meg, hogy a 1,5-2 éves halakban a hímek ivarilag éretlenek maradtak, míg a meglepően nagyszámú hermafroditák (n=7, 20%!) kezeléstől függetlenül (kiindulási kontroll, kontroll, kezelt) érett spermiumokkal teli hereszövevel rendelkeztek "normal méretű (~140-170  $\mu$ m) oocyták mellett. Vérhormon szintek alapján (tesztoszteron-hermafrodita, ösztrogén-hímek) az ivarok nagy biztonsággal elkülöníthetőek.

## Pályázathoz köthető publikációs aktivitás

### Könyvfejezet

Durif, C., van Ginneken, V., Dufour, S., Müller, T., Elie, P. (2009). *Seasonal evolution and individual differences in silvering eels from different locations.*, In: Spawning migration of the European eel. (eds. van den Thillart, G., Dufour, S., Rankin, C.) pp: 13-38. Springer Science + Business Media B.V. p. 480. ISBN: 1402090943, 2009

### Folyóirat

- Müller, T. (2008). Eel progress (A Hungarian researcher reports on recent progress in the artificial induction of sexual maturation and propagation of European eels), *Hatchery International* 9(6), 24-25
- Csenki, Zs., Zaucker, A., Kovács, B., Lefler, K.K., Hegyi, Á., Müller, T., Kovács, R., Hadzhiev, J., Urbányi, B., Váradi, L., Müller, F. (2010). Intraovarian transplantation of early stage follicles results in viable offspring and provides tool for manipulation of maternal effect gene products in zebrafish. *International Journal of Developmental Biology* 54: 585-589. doi: 10.1387/ijdb.082786zc
- Horváth, Székely, Cs., Boczonádi, Zs., Bercsényi, M., Urbányi, B., Müller, T. (2011). Induced oogenesis of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in freshwater condition. *Acta Biologica Hungarica* 62(4), 485-488. DOI: 10.1556/ABiol.62.2011.4.13
- Müller T., Molnár T., Szabó A., Yamaha E., Járasi É.Zs., Bercsényi M., Specziár A., Urbányi, B., Romvári R. (2012). In vivo tracking of testes development and related changes in external morphological traits in European eel *Anguilla anguilla* (L.) by using computer tomography, *Acta Biologica Hungarica*, 2012 (in press).
- 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. (2011): Artificial hybridisation of eel species by using cryopreserved sperm from freshwater reared males (*Anguilla japonica* ♀ × *A. anguilla* ♂). *Aquaculture* (beküldve)
- Müller, T., Wágner, L., Urbányi, B., Husvéth, F., Boczonádi, Z., Farkas, A., Specziár, A., Lefler K.K., Mézes M.: Effects of metal content of eels from Lake Balaton on the induced sexual maturation. (előkészületben)
- Boczonádi, Zs., Durif, C., Elie, P., Ács, B., Specziár, A., Bercsényi, M., Székely, Cs., Müller, T. Seasonal and demographic characteristics of a landlocked population of eels, Lake Balaton, Hungary (előkészületben)
- Kucska, B., Boczonádi, Zs., Horváth, Á., Mészáros, E., Feledi, P., Hegyi, Á., Trenovszki, M., Urbányi, B., Müller, T.: Artificial induction of sexual maturation of Sterlet. (előkészületben)

### Proceeding, absztrakt

- 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. (2011): Artificial hybridisation of eel species by using cryopreserved sperm from freshwater reared males (*Anguilla japonica* ♀ × *A. anguilla* ♂). 3 International Workshop on the Biology of Fish Gametes September 7-9, Budapest, Hungary, abstract book pp:160-161. ISBN:978-963-88019-7-5
- Müller, T., Székely, Cs., Boczonádi, Zs., Bercsényi, M., Urbányi, B., Horváth, L. (2011). Induced oogenesis of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in freshwater condition, EAS 2011, Rhodos, Greece, 2011. October 18-24. abstract no.: 2011
- Müller, T., Wágner, L., Urbányi, B., Husvéth, F., Boczonádi, Z., Specziár, A., Lefler K.K., Mézes M. (2009) Effects of metal content of eels from Lake Balaton on the induced sexual maturation., Second International Workshop on Biology of Fish Gametes.

- September 9-11th 2009. Valencia, Spain. (abstract book, pp. 118-119)., 2009
- Boczonádi, Zs., Horváth, Á., Mészáros, E., Hegyi, Á., Kucska, B., Trenovszki, M., Urbányi, B., Müller, T. (2010). Paradox findings in spermiogenesis of hermaphroditic Sterlet (*Acipenser ruthenus*)., 11th International Symposium on Spermatology. June 24-29., Okinawa, Japán. P01-36, p.56., 2010
- Boczonádi, Z., Lefler, K.K., Urbányi, B., Müller, T. (2009). Balatoni angolnák hormonálisan indukált ivarérlelése. XXXIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, július 2-3. (abstract book, p. 48)., 2009
- Boczonádi, Zs., Horváth, Á., Mészáros, E., Hegyi, Á., Kucska, B., Müllerné T.M., Urbányi, B., Müller, T. (2010). Hermafrodita kecsgek előfordulása és gonádfejlődésük sajátosságai intenzív nevelésben., XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás. Szarvas, 2010. május 12-13. (abstract book, p. 21), 2010
- 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.(2011). Angolnafajok hibridizációja (*Anguilla japonica*♀× *A. anguilla*♂), XXXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2011. május 25-26, abstarct book p 43., 2011
- Ács, B., Specziár, A., Boczonádi, Zs., Urbányi, B., Müller, T. (2011). A Balatoni angolna állomány állapota, biológiai hatása és jövője, XXXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2011. május 25-26, abstarct book p 19., 2011

### **Tudományos utánpótlás képzés a projekt keretein belül**

#### *Phd hallgatók:*

Boczonádi Zsolt PhD hallgató (levelező 2008-2009, nappali 2009-2012) „A magyarországi angolna populáció konzervációbiológiai értékének feltárása” témából írja dolgozatát (Dr. Specziár András társ-témavezető-MTA BLKI).

Szücs Szidóni Klára PhD hallgató doktori cselekményeit Dr. Marian Bura témavezetésével kezdte meg a Temesvári Egyetemen (Universitatea de Stiinta Agricole si Medicina Veterinara a Banatului din Timisoara (*Agricultural and Veterinary University of the Banat in Timisoara - U.A.S.V.M.B.T.*) kecsge fajjal 2009-ben. 2010-2011 között 10 hónapot töltött el Tanszékünkön és társ-témavezetőként felügyeletem mellett hisztológiai vizsgálatokra alapozott, különböző előéletű és korú kecsgek gonádfejlődését követte nyomon, felhasználva a kutatási zárójelentésben is szereplő munkát. 2011. szeptember 8-án *”Research on monitoring and body development of gonadal evolution of sterlets (*Acipenser ruthenus*) reared in intensive recirculated water system”* címmel *Summa Cum Laude* minősítéssel sikerült megvédeni dolgozatát.

#### *BSc hallgató:*

Szakedolgozati témavezetéssel Ács Bernadett III, évf, természetvédő BSc hallgató együtt dolgozott velünk (társ-témavezető: Dr. Specziár András, MTA BLKI) a balatoni angolna állomány felmérésében és „A balatoni angolna állomány állapota, biológiai hatása és jövője” címmel megírt és előadott Diákköri Tudományos Konferenciákon:

I. helyezést ért el 2010-ben (Halgazdálkodási szekció)

<http://w3.mkk.szie.hu/erdeklodoknek/tdk-november-24-oktatasi-szUNET>

I.helyezést ért el 2011-ben (Természetvédelmi és Vadgazdálkodási Szekció)

Szakedolgozatát ebben a témában védte meg 2011. novemberében, MS,c,-s hallgatóként angolnával kíván továbbra is dolgozni,

## Együttműködő partnerek

Az angolna mesterségesen indukált ivarérelés és szaporítás során a SZIE MKK, KTI, Halgazdálkodási Tsz és RET munkatársain kívül következő Intézményekkel működtem együtt:

- Hokkaido University, Japán (mélyhűtött sperma minták tesztelése, hibridizáció)
- Tokyo University of Agriculture, Japán (mélyhűtött sperma minták tesztelése, hibridizáció)
- Spanyolország
- Institute of Marine Research (balatoni angolnák silvering folyamatainak nyomonkövetése)
- Pannon Egyetem Georgikon Kar (nehézfém vizsgálatok, ivarérelés)
- MTA ÁOKI (édesvízi ivarérelés)
- MTA BLKI (angolna beszerzés, balatoni angolnák silvering folyamatainak nyomonkövetése)
- HAKI (kecsege ivarérelés)
- Attalai Hal Kft (angolna beszerzés, ivarérelés, nehézfémterhelés csökkentés)

## Irodalomjegyzék

- Asturiano J. F., Pérez L., Tomás A., Zegrari S., Espinós F. J., Jover M. (2002). Inducción hormonal de la maduración gonadal y la puesta en hembras de anguila europea *Anguilla anguilla* L., 1758: cambios morfológicos y desarrollo oocitario. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4), 127-137
- Asturiano, J.F., 2008, Different protocols for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm, in Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P, (Eds,) Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp, 415-420,
- Bezdenzhnykh, V.A., Prokhorchik, G.A. (1984). Period of oocyte maturation and assessment of egg quality of eel, *Anguilla anguilla* (*Anguillidae*), under stimulation of maturation with gonadotropic hormones. Voprosy Ikhtologii 5, 814-821 (in Russian).
- Burgerhout, E., Brittijn, S, A., Kurwie, T., Decker, P., Dirks, R, P., Palstra, A., Spaink, H,P., Van den Thillar, T, G., 011, First artificial hybrid of the eel species *Anguilla australis* and *Anguilla anguilla*, BMC Developmental Biology, 11:16doi:10,1186/1471-213X-11-16
- Chiba, H., K. Iwatsuki, K. Hayami, A. Hara y K. Yamauchi. (1994). Changes in serum steroid hormones and vitellogenin levels in cultured female European eels *Anguilla anguilla* during artificially induced ovarian development. Journal of the World Aquaculture Society 25 (4): 553-560.
- Collard, B. C. Y., Mackill, D. J. (2009). Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. Plant Mol Biol Rep 27: 86-93
- Durif, C., van Ginneken, V., Dufour, S., Müller, T., Elie, P. (2009): Seasonal evolution and individual differences in silvering eels from different locations. In: van den THILLART, G., DUFOUR, S., RANKIN, C. (eds), Spawning migration of the European eel, pp: 13-38.
- Ijiri, S., Tsukamoto, K., Chow, S., Kurogi, H., Adachi, S., Tanaka, H. (2011). Controlled reproduction in the Japanese eel (*Anguilla japonica*), past and present. Aquaculture Europe, 36(2): 13-17
- Molnár, K. (1995). A balatoni angolna parazitológiai vizsgálata. Halászat 88, 64-68.
- Molnár, K., Székely, C. and Baska, F. (1991). Mass mortality of eel in Lake Balaton due to *Anguillicola crassus* infection. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11, 211.
- Molnár, K., Székely, C., Perényi, M. (1994). Dynamics of *Anguillicola crassus* (Nematota, Dracunculoidea) infection in eels of Lake Balaton, Hungary. Folia Parasitologica 41 (3),

- 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 World The Aquaculture Society, 35(2), 225-231,
- Müller, T. (2008). Eel progress (A Hungarian researcher reports on recent progress in the artificial induction of sexual maturation and propagation of European eels), Hatchery International 9(6), 24-25
- 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.
- 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. (in Hungarian with English summary).
- Müller, T., Molnár, T., Szabó, A., Romvári, R., Hancz, C., Bercsényi, M., Horn, P. (2004a) Tracking the hormonally-induced female eel maturation by means of computer tomography. Acta Veterinaria Hungarica 52(2), 235-243.
- 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., 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.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Iinuma, N., Hirose, K., 1997, Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, Fish Physiology and Biochemistry, 17, 163-169,
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K. (1996). Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17 alfa-20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Aquaculture 139, 291-301.
- Okamura, A., Zhang, H., Utoh, T., Akazawa, A., Yamada, Y., Horie, N., Mikawa, N., Tanaka, S., Oka, H.P. (2004). Artificial hybrid between *Anguilla anguilla* and *A. japonica*. Journal of Fish Biology 64, 1450-1454.
- Palstra, A., Cohen, EGH., Niemantsverdriet, P.R.W. , van Ginneken, V.J.T. , van den Thillart G.E.E.J.M. ( 2005). Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. Aquaculture 249, 533-547.
- Palstra, A., Van den Thillart, G. (2009). Artificial maturation and propagation of European eel. In: Van den Thillart, G., Dufour, S., Rankin, C. (eds) Spawning migration of the European eel. Springer Sci+Bussiness Media B, New York Inc., pp. 309-331.
- Pankhurst, NW. (1980). Changes in body musculature with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.) Journal of Fish Biology 21, 417-428
- Pankhurst, NW. (1982). Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). Journal of Fish Biology 21(2), 161-175.
- Pedersen, B., H. (2003). Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. Aquaculture 224, 323-338.
- Pedersen, B.H. (2004). Fertilisation of eggs, rate of embrionic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. Aquaculture 237, 461-473.

- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Baloche, S., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Massabuau, J.C. (2008). How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ Sci Technol.* 42(12):4607-12.x
- Prokhorchik, G. A. (1986). Postembryonic development of European eel, *Anguilla anguilla*, under experimental conditions. *Voprosy Ikhtiologii* 26(5), 802-807. (in Russian)
- Prokhorchik, G. A., Petukhov, V. B. and Petrikov, A. M. (1987). Embryonic development of European eel, *Anguilla anguilla*, under experimental conditions. *Voprosy Ikhtiologii* 27(1), 124-131. (in Russian)
- Sebert, M.E., Weltzien, F.A., Molsan, Ch., Pasqualini, C., 2008. Dopaminergic systems in the European Eel: characterization, brain distribution and potential role in migration and reproduction. *Hydrobiologia* 602, 27-46.
- Specziár, A. (2010). A Balaton halfaunája: a halállomány összetétele, az egyes halfajok életkörülményei és a halállomány korszerű hasznosításának feltételrendszere. *Acta Biologica Debrecina Supplementum Oecologica Hungarica* 23, 7-185. HU ISSN 0236-8684
- Sprengel, G., Lüchtenberg, H. (1991). Infection by endoparasites reduces maximum swimming speed of European smelt *Osmerus eperlanus* and European eel, *Anguilla anguilla*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 11, 31-35.
- 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,
- Székely, C., Láng, M., Csaba, G. (1991): First occurrence of *Anguillicola crassus* in Hungary. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.*, 11: (4): 162-163.
- Székely, Cs. (1994): Paratenic hosts for the parasitic nematode *Anguillicola crassus* in Lake Balaton, Hungary. *Dis. Aquat. Org.* : 11-20.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T., Nomura, K., 2003, The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture, *Fish Physiology and Biochemistry*, 28 (1-4), 493-497,
- Tátrai, I., Paulovits, G., Józsa, V., Szabó, I. (2003): Betelepített halfajok állománya a Balatonban. In: MAHUNKA, S., BANCZEROWSKI, J. (szerk.), A Balaton kutatásának 2002. évi eredményei. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, pp: 140-148.
- Tátrai, I., Paulovits, G., Szabó, I. (2002): Betelepített halfajok állománya a Balatonban. In: MAHUNKA, S., BANCZEROWSKI, J. (szerk.), A Balaton kutatásának 2001. évi eredményei. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, pp: 149-159.
- Tátrai, I., Paulovits, G., Szabó, I. (2001): Betelepített halfajok állománya a Balatonban. In: MAHUNKA, S., BANCZEROWSKI, J. (szerk.), A Balaton kutatásának 2000. évi eredményei. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, pp: 149-157.
- Technical Annex (2001): Estimation of the Reproduction Capacity of European Eel (EELREP), Leuven University.
- Tomkiewicz, J., Jarlbæk, H. (2006). Danish eel researchers set two world records. <http://www.dfu.min.dk/dfu/dfuvis.asp?id=634>
- Virág, Á. (1997): A Balaton múltja és jelene. Egri Nyomda Kft. Eger.
- Walbot, V., Warren, C., 1988: Regulation of Mu element copy number in maize line with an active or inactive mutator transposable element system, *Mol, Gen, Genet* (21) 27-34.