Szent István Egyetem

A MÉLYHŰTÉS OKOZTA KÁROSODÁSOK VIZSGÁLATA 3 HALFAJ SPERMIUMAIN

Doktori értekezés tézisei

Miskolczi Edit

GÖDÖLLŐ

2007

A Doktori Iskola:

Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományág:

Mezőgazdaságtudomány

Alprogram:

Halbiológia és halgazdálkodás

Doktori program vezetője:

Dr. Horváth László
Egyetemi tanár, MTA doktora
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság-és
Környezettudományi Kar,
Halgazdálkodási Tanszék

Témavezető:

Dr. Urbányi Béla
Egyetemi docens, tanszékvezető
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság-és
Környezettudományi Kar,
Halgazdálkodási Tanszék

A programvezető aláírása

A témavezető aláírása

1. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK

Az édesvízi haltermelés több évszázados múltra tekint vissza Magyarországon a kedvező földrajzi és klimatikus viszonyoknak köszönhetően. Hazánk ökológiai adottságai és a rendelkezésre álló technológiai ismertek megfelelő alapot nyújtanak ahhoz, hogy az ágazat az elkövetkező években nagyobb szerepet töltsön be a magyar agrárgazdaság egészében. Mivel az édesvízi halászat az Európai Unió által is preferált, azonban a halastavak száma limitált az ország területén, ezért szükséges a termelés mennyiségi és minőségi növeléséhez a mesterséges termékenyítés adaptálása a keltetőházi gyakorlatba.

A gazdasági állatok jelentős részénél az ipari méretű tartás elképzelhetetlen lenne mesterséges termékenyítés nélkül, melyhez például a szarvasmarha esetében szinte kizárólag mélyhűtött ivarterméket használnak. A mélyhűtött sperma használata lehetőséget ad arra, hogy csak a legjobb tulajdonságokra szelektált apaállatok örökítőanyagát vigyék tovább az utódok, így jelentős a genetikai előrehaladás.

Hasonlón egyéb haszonállatokhoz, a halaknál is nagy gazdasági előnnyel járna legalább az egyik ivarsejt hosszú távú tárolása mélyhűtéssel nem csupán laboratóriumi, hanem ipari méretekben is a genetikai anyag károsodásának kiküszöbölésével. Ez megoldást jelenthet nemcsak nagy értékű tenyészállományok megőrzésére, hanem ezzel a módszerrel egy esetleges járvány (pl.: koi herpeszvírus) vagy természetvédelmi katasztrófa (pl.: tiszai ciánszennyezés) után is reprodukálni lehet a kívánt tulajdonságokat.

A halfajok jórészénél már a kutatók rendelkezésére áll a megfelelő mélyhűtési protokoll, azonban ennek gyakorlati alkalmazása még csupán néhány halfaj esetében jelentős. Rövid időn belül várható, hogy egyre több faj esetében használnak majd a halgazdaságok mélyhűtött ivarterméket a szaporításhoz, így a kutatók feladata, hogy kidolgozzanak olyan módszereket, mellyel ezt elősegítik. A mélyhűtött ivartermék használatát követően a kutatók nagyarányú torz lárva fejlődéséről számoltak be, mely a fagyás során fellépő és a spermiumokra ható káros hatásoknak tudható be. A torz lárvák kialakulást okozó tényezők kiküszöbölésével és a nagyobb méretű műszalmák használatával jelentős lépéseket tehetünk afelé, hogy a mélyhűtés elterjedjen a halszaporítás napi gyakorlatában.

A fentiek alapján munkám során 3 halfajon (afrikai harcsa /*Clarias gariepinus*/, ponty /*Cyprinus carpio/*, rózsás díszmárna /*Barbus conchonius*/) vizsgálva kívánom összevetni a károsodás mértékét és formáit. A rózsás díszmárna elterjedt laboratóriumi modellfaj, rövid a generációs intervalluma, könnyen szaporítható, kezelhető, az eredmények gyorsan kiértékelhetőek. Az afrikai harcsa egyre növekvő gazdasági szereppel rendelkező trópusi eredetű haszonhal, amely könnyű szaporíthatósága, méretéhez képest kis helyigénye és ikrájának rövid inkubációs ideje miatt ideális laborállat is egyben. A ponty legjelentősebb gazdasági halfajunk, a tenyésztési és nemesítési technológiák (köztük az ivarsejtek mélyhűtése) adaptálása a haltenyésztésben ennél a halfajnál várható a legkorábban.

Mindhárom megnevezett halfajnál kísérletekkel tisztázni kell, hogy mi okozza a mélyhűtött spermával történő termékenyítések során tapasztalt torz embriók kelését.

Munkám céljai az alábbiak voltak:

1. Vizsgálni kívánom, hogy a különböző védőanyagok (krioprotektánsok) milyen hatással vannak a mélyhűtött hímivarsejtek termékenyítőképességére, továbbá a mélyhűtött sperma alkalmazásakor kikelt lárvák fejlődésére és a torzképződésre.
2. A mélyhűtési technológia üzemi méretű továbbfejlesztéseként tesztelem a nagyméretű műszalmák használatának lehetőségeit ponty és afrikai harcsa esetében, annak érdekében, hogy a keltetőházi gyakorlatban is rutinszerűen használhatóvá váljék a módszer.
3. Kísérletet teszek a rózsás díszmárna spermájának mélyhűtésére, mellyel eddig egyetlen kutató sem foglalkozott. Adaptálni kívánom a ponty fajon alkalmazott mélyhűtési módszereket, szükség esetén módosítani azokat.
4. A mélyhűtött sperma kelő lárvákra ható negatív hatásait direkt kromoszómavizsgálattal kívánom ellenőrizni, melyek során a kikelt egyedek kromoszómaszámát meghatározva keresek összefüggést a torzképződés és a hűtési technológia (alkalmazott védőanyag, hígító, illetve műszalma méret) között.
5. Gél elektroforézis alkalmazásával (Comet assay) választ szeretnék kapni, hogy a spermiumok DNS tartalma mennyire károsodott a

mélyhűtés során és ezáltal közvetett bizonyítékot nyerhetek a torzképződések magyarázatára.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Kísérletek afrikai harcsa fajon

Afrikai harcsa (*Clarius gariepinus*) fajon kromoszóma vizsgálatot végeztem mélyhűtött sperma használatát követően különböző hígítók, védőanyagok és műszalma méretek optimalizálására.

A kísérletekhez használt afrikai harcsa állományt a szarvasi Haltenyésztési Kutatóintézet és a százhalombattai Temperáltvizű Halszaporító és Kereskedelmi Kft. biztosította. A különböző genetikai állományú ikrás és tejes csoportokat elkülönítve tartottam. Hormonális indukciót követően a tejesek heréjének kioperálása majd kipréselése után a spermát minősítettem, majd 6% fruktóz hígítóval és 10% metanol vagy dimetil-szulfoxid (DMSO) védőanyagok hozzáadásával különböző méretű műszalmákban, folyékony nitrogén gőzében folyt a mélyhűtés. DMSO védőanyag használata során 10 perc equilibrációs idővel számoltam. Az ikrásoktól fejéssel nyertem ki az ivarterméket, a hormoninjekciót követően 12 órával, majd termékenyítést végeztem natív és a felolvasztott spermával. A különböző csoportokat azonos körülmények között keltettem ki, majd nemtáplálkozó lárva állapotban meghatároztam a kromoszómaszámukat.

Csoportonként 50-100 darab lárvát 0,05% kolchicin oldatban 3 órán át inkubáltam, majd 0,075M KCl oldatban 25 percig hipotonizáltam. A lárvákat 3:1 arányú metanol:ecetsav keverékében fixáltam, majd 50%-os ecetsav oldatban szuszpendáltam. A sejtszuszpenziót előmelegített tárgylemezre cseppentettem, majd megszárítottam. A festés 4%-os Giemsa oldatban 8 percig folyt. Az eredményt 1200-szoros nagyításon értékeltem ki, a jól terült metafázisoknál meghatároztam a kromoszómaszámot 755 darab lárva preparátumai alapján.

2.2. Kísérletek ponty fajon

2.2.1. Nagyméretű műszalmák alkalmazása

Tógazdasági nemespontyon (*Cyprinus carpio*) nagyméretű műszalmák (1,2 és 4 ml) használatának hatását vizsgáltam a torzképződésre és 5 féle hígító hatását teszteltem 2 féle védőanyaggal a termékenyítési és keltetési eredmények optimalizálása érdekében.

A kísérletekhez felhasznált állatokat és a keltetőrendszert a Haltermelők Országos Szövetségének Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdasága biztosította.

Az első kísérletsorozatban a tejesektől hormonális indukciót követően lefejtem az ivarterméket, minősítettem, majd nagyméretű műszalmákban mélyhűtöttem a mintákat glükóz hígtó és metanol védőanyag hozzáadását követően. Az ikrásoktól szintén hormonális kezelést követően, a keltetőházi gyakorlatnak megfelelően nyertem ki az ikrát.

Az ikrát az eddig irányadónak tekintett 10g ikra/0,5 ml spermával való termékenyítéshez képest, félszeres, egyszeres és másfélszeres mennyiségeket termékenyítettem. A ragadósság elvételét követően Zuger üvegekben történt a keltetés.

Kelés után az afrikai harcsánál leírt módon kromoszómavizsgálatot végeztem.

2.2.2. Különböző hígítók alkalmazása

A második kísérletsorozatban az optimális hígító-védőanyag kombinációt határoztam meg nemesponty fajon az alábbi módon.

Az előző kísérletnek megfelelően kinyertem az ivarterméket mindkét nem egyedeitől. A sperma mintákhoz fagyasztás előtt a következő hígítókat adtam: glükóz, fruktóz, szacharóz, KCl és pontyhígítót. Minden hígítót metanol illetve DMSO védőanyaggal is kombináltam. Egy adag spermához 1 adag védőanyagot és 8 adag hígítót adtam, így a végső hígítási arány 1:9 lett. Hűtés és felolvasztás után megtermékenyítettem az ikratételeket, majd vizsgáltam a termékenyülési és kelés után a keltetési eredményeket a különböző hígítók függvényében.

2.3. Kísérletek rózsás díszmárna fajon

Rózsás díszmárna (*Barbus conchinius*) faj hím ivartermékét sikeresen mélyhűtöttem, keltetési kísérletet végeztem és a felolvasztott sperma genomjának roncsolódását comet módszerrel detektáltam.

A tejeseket pipetta segítségével fejtem le, az ivarterméket glükóz vagy pontyhígítót tartalmazó csövekbe tettem. Motilitás vizsgálat után elvégeztem a mélyhűtést metanol és DMSO védőanyagokkal 0,25 ml-es műszalmákban, majd felolvasztás után megtermékenyítettem az ikratételeket. A felolvasztás utáni motilitás vizsgálat során nem volt szignifikáns különbség egyik hígító alkalmazásakor sem a két

védőanyag függvényében. A termékenyülés vizsgálatakor a ponty hígító-DMSO védőanyag adta a legmagasabb eredményt.

Comet módszerrel vizsgáltam a felolvasztott sperma genomjának roncsolódását.

A felolvasztott és natív spermamintákat motilitás vizsgálat után PBS-sel hígítottam és alacsony olvadáspontú agarózzal kevertem össze. Az így kapott mintát előzőleg normál olvadáspontú agarózzal bevont tárgylemezre cseppentettem. Miután fedőlemezt helyeztem rá, hűtött fémtálcára fektettem elősegítve a mintával kevert 2. gélréteg megszilárdulását. A fedőlemez eltávolítása után felvittem a tárgylemezre a 3. réteg gélt. Hűtött fémtálcára helyeztem 5 percre, majd eltávolítottam a fedőlemezt. A hűtés ideje alatt előkészítettem a lízisoldatot. Elsötétített helységben a tárgylemezeket üvegkádba fektettem, majd ráöntöttem a lízisoldatot. Egy óra elteltével a lemezeket kiemeltem a kádból, lecsepegtettem majd elhelyeztem őket egy vízszintes elektroforézis kádba. Miután felöntöttem a kádat az elektroforézis oldattal, 40 percig várakoztam a készülék beindítása előtt. Ez az idő a DNS lánc kicsavarodásához szükséges. A gép bekapcsolásakor a feszültséget 20 voltra, az áramerősséget pedig 300 mA-re állítottam. Az elektroforézis 24 percig tartott. Ezután a lemezeket kivettem a kádból, lecsepegtettem, és egy fémrácsra helyezem azokat, hogy semlegesítő oldattal öntsem le a felszínüket kétszer, ötperces időközzel.

A lecsepegtetett lemezekre 0,05 ml ethidium bromidos oldatot pipettáztam, és fedőlemezzel lefedtem. Mikroszkóp alatt fluoreszcens fényben vizsgáltam a keletkezett képet.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Afrikai harcsa fajon végzett vizsgálatok eredményei

A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek termékenyülése 62 és 83% között váltakozott, 83%-os kontroll termékenyülés mellett. A termékenyülés szempontjából nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség az egyes kezelések között sem a használt védőanyagok, sem az alkalmazott műszalmák méretei tekintetében.

A kelési eredmények 43 és 53 % között változtak, 59%-os kontroll kelés mellett. A kezelések között ebben az esetben sem volt értékelhető különbség.

A torz lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest 33 és 44% között alakult. A kontroll csoportban a torz lárvák aránya 28% volt. Az egyes kezelések között itt sem találtam statisztikailag értékelhető különbséget.

Attól függően, hogy a minták kromoszómaszáma több, vagy kevesebb, mint 84 db, megállapítottam triploidok, illetve tetraploidok jelenlétét. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy ezek az egyedek lehettek mozaikosak is, tehát olyan példányok, amelyek egyszerre tartalmaznak diploid és triploid, illetve tetraploid kromoszómagarnitúrájú sejteket is. Találtam ezen kívül a 0,25 M csoportban egy haploid-diploid mozaikos egyedet is.

A „Bizonytalan” csoportba soroltam a rosszul festődött vagy osztódást nem tartalmazó preparátumokat.

Eddig 755 db lárva preparátumát vizsgáltam át. Haploid lárvát (28 db kromoszóma) négy kezelésben találtam, a 0,25 illetve a 0,5 ml űrtartalmú műszalmák használata esetén.

3.2. Ponty fajon végzett vizsgálatok eredményei

3.2.1. Nagyméretű műszalmák használatának eredményei

A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek kelése 20 és 86% között váltakozott, 82%-os kontroll termékenyülés mellett. A legmagasabb kelési eredményeket 1,2 ml-es szalmák használata mellett a 0,5 ml-es szalmákra optimalizált 0,5 ml felolvasztott sperma/10g ikra arányhoz képest fél adag ikra használata mellett (86±12%) kaptam, míg

4 ml-es szalmák használatakor egész adag ikra termékenyítése adta a legjobb eredményt (65±18%).

Általánosságban elmondható, hogy mind a használt műszalmák mérete (p=0,0186), mind az ikra mennyisége (p=0,0093) statisztikailag szignifikáns hatást gyakorolt a kelési eredményekre.

A különböző ikramennyiségeket összehasonlítva változó mennyiségű torz lárva kelését tapasztaltam. Meglepő módon a kontroll csoportban találtam a legtöbb torz lárvát (15±9%). A mélyhűtött spermával termékenyített csoportok közül 4 ml-es műszalmák használatakor és egész adag ikra termékenyítésekor kaptam a legtöbb torz lárvát (13±7%). Egyedül a 4 ml-es szalma és dupla adag ikra kombinációjánál nem találtam torz kelésű lárvát, azonban ennél a csoportnál a kelési eredmények eleve gyengék voltak.

A felhasznált ikra mennyisége szignifikáns hatást gyakorolt a torzak arányára (P=0.0032) a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kelt lárvák esetében azonban a felhasznált szalma mérete nem volt szignifikáns hatással rá.

Végül vizsgáltam a torz fejlődésű lárvák kromoszómaszámának alakulását és összesen több mint 260 lárvát dolgoztam fel.

3.2.2. Különböző hígítók alkalmazásának eredményei

A tejes egyedek oltását követően minden alkalommal mind az öt egyed megfelelő mennyiségű (5-15 ml) spermát adott. Az ikrások úgyszintén kivétel nélkül reagáltak a hormonális indukcióra.

A friss sperma motilitása a kontrollnál 84±7% volt n=15 ismétlésszámnál. A legmagasabb felolvasztás utáni motilitást (63±9% n=9) a glükóz hígító és a metanol, mint védőanyag adta. Statisztikailag nem volt kimutatható különbség a kontroll és a metanol-glükóz kombinációja között. A többi hígító alkalmazása metanollal nem adott ilyen magas motilitási értéket. Azonban elmondható, hogy a metanolos minták általában jobbnak bizonyultak, mint amikor DMSO-t használtam védőanyagként.

A legjobb termékenyülést 4-8 sejtes állapotban, 74±15%-ot (kontroll értéke 84±13%) n=12 ismétlés számnál a metanol védőanyag és glükóz hígító adta. Statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam a kontroll és a fruktózos és glükózos minták között metanol védőanyag használata mellett. Azonban az kijelenthető, hogy amikor

metanolt használtam védőanyagként mindig jobb eredményeket kaptam, mint a DMSO alkalmazása esetén.

A legjobb kelési eredményt (67±17%, n=9) ismét a glükóz, mint hígító és metanol, mint védőanyag kombinációjánál kaptam. Itt a kontroll eredménye 69±14% volt. Az eredmények statisztikai feldolgozását követően hasonló megállapítást tehettem, mint a termékenyítési eredmények esetében. Itt sem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll, és a fruktóz-metanol, glükóz-metanol kombinációk között. A metanolos mintákkal kapott eredmények ebben az esetben is felülmúlják DMSO használata során kapottakat.

A kikelt lárvák között nem találtam torz fejlődésű egyedeket.

3.3. Rózsás díszmárna fajon végzett vizsgálatok eredményei

A tejesek fejésekor nyert sperma mennyisége elegendő volt, átlagosan 0,01 ml-t sikerült az egyedektől kinyernem. A sperma sűrűsége $1{,}928 \pm 0{,}223 \times 10^{10}$ db/ml volt (n=9). A lefejt spermát két különböző hígítóval hígítottam, glükóz és pontyhígítóval. Az egyes hígítókra nézve a frissen fejt hímivarsejtek motilitása nem mutatott szignifikáns különbséget, a glükóz hígítóban a friss sperma motilitása 53±27 % volt, míg a pontyhígítóban 58±24 % értéket kaptam.

A sperma felolvasztása után végzett vizsgálatoknál nem tapasztaltam jelentős ingadozást a kiindulási és a felolvasztás utáni motilitás értékek között. Akadtak ugyan olyan minták, melyek kiindulási motilitása nem haladta meg a 20%-ot, ám ezt az értéket megőrizték a fagyasztás során is és így a felolvasztás után ugyanolyan motilitási értéket kaptam, mint a kiindulásnál.

A felolvasztás utáni motilitás vizsgálatoknál azt tapasztaltam, hogy a pontyhígítóval kezelt minta esetén volt a legmagasabb a hímivarsejtek motilitási értéke. Ha az egyes hígítókat hasonlítottam össze a hozzájuk adott védőanyagok függvényében, azt tapasztaltam, hogy a felolvasztás utáni maximális motilitást (39±18 %, n=26) a pontyhígító és a DMSO, mint védőanyag adta. A leggyengébb motilitást ponty hígító és metanol védőanyag esetén kaptam (27±13%, n=30). A glükóz hígítóval kezelt mintáink kiegyenlítettebbnek nevezhetők: glükóz hígító és DMSO védőanyag esetén 36±16% motilitást tapasztaltam, n=26 mintaszám mellett, míg glükóz hígító és metanol védőanyag alkalmazásakor a motilitási érték 32±14% lett, n=30 mintaszám mellett. Statisztikailag szignifikáns különbség, $p<0{,}05$ szignifikancia szintnél nem volt

kimutatható egyik hígító alkalmazásakor sem a két védőanyag függvényében.

A legjobb termékenyülési érték, amit mélyhűtött sperma felolvasztása után, 4-8 sejtes állapotban vizsgálva, pontyhígító és DMSO védőanyag mellett kaptam 38±5% lett, n=3 ismétlésnél 79%-os kontroll termékenyüléssel szemben.

A legjobb kelési eredmény 10±7% lett (n=3), míg a kontroll csoport 77%-a kelt ki.

Comet módszer alkalmazásakor friss sperma vizsgálatakor nem észleltem V. fokozatú, azaz maximálisan roncsolt sejteket a kezeletlen csoportban, míg a hidrogén-peroxiddal roncsolt csoportban szinte csak IV. és V. fokozatú sejteket találtam. A metanol védőanyag használata mellett a teljesen ép, I. kategóriájú sejtek magas arányban fordultak elő (47%), azonban DMSO alkalmazásánál csak 5,2%-ban találtam ilyen sejteket. A felolvasztott spermaminták vizsgálatakor metanol használata mellett 27,5% volt a maximális károsodást mutató sejtek aránya, míg DMSO használatát követően ez az arány többszörös volt (69,2%).

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Afrikai harcsa és ponty esetében a mélyhűtött/felolvasztott sperma üzemi szintű alkalmazást lehetővé tevő módszer kidolgozása nagyméretű műszalma alkalmazásával.

- Afrikai harcsa és ponty fajokban a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kis mennyiségben haploid egyedek kelésének regisztrálása.

- Rózsás díszmárna spermájának sikeres mélyhűtése.

- Rózsás díszmárnán comet assay segítségével kimutatásra került, hogy a metanol védőanyag alkalmazásával hűtött sperma genomja kevésbé károsodik, mint a DMSO jelenlétében hűtött mintáké.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 Következtetések

Afrikai harcsa faj esetében 755 darab lárva preparátumai alapján megállapítottam, hogy sem a termékenyülés, sem a kelési százalék tekintetében nem mutatható ki szignifikáns különbség a használt védőanyagok, illetve hígítók és az alkalmazott műszalmák terén.

Megállapítottam, hogy a rendellenes fejlődés oka a lárvák többségénél nagyrészt nem genetikai eredetű, és nem a mélyhűtésre vezethető vissza.

Megfigyeltem, hogy szoros összefüggés mutatható ki a morfológiai és a citogenetikai rendellenességek között, hiszen az általam megvizsgált abnormális kromoszómagarnitúrával rendelkező összes egyed genotípusosan is torz volt.

Megállapítottam **ponty faj**on, hogy az eddig megvizsgált 260 db lárva preparátum legnagyobb része diploid volt, tehát a torz lárvák többsége normális kromoszómaszerelvénnyel rendelkezik.

Megállapítottam, hogy mind a használt műszalmák mérete, mind az ikra mennyisége hatást gyakorolt a kelési eredményekre.

Megállapítottam, hogy a felhasznált ikra mennyisége hatást gyakorolt a torzak arányára, azonban a felhasznált szalma mérete nem.

Az eddig pontyféléknél mellőzött metanollal magasabb és kiegyenlítettebb motilitási, termékenyülési és kelési eredményeket értem el, mint az elterjedten használt DMSO-val.

A hígítók közül a cukoralapúak, leginkább a glükóz bizonyult megfelelőnek ennél a halfajnál. A cukoralapú hígítóknál tapasztalt agglutináció nem befolyásolja a kelési eredményeket.

Megállapítottam, hogy **rózsás díszmárna** spermájának hűtése sikeres volt, mind metanol, mind DMSO védőanyag használata során.

Megállapítottam, hogy hígítóként glükóz és pontyhígító is használható.

Megállapítottam a termékenyülés vizsgálatakor, hogy a ponty hígító-DMSO védőanyag adta a legmagasabb eredményt.

Megállapítottam Comet módszer alkalmazásával, hogy a metanol védőanyag használata mellett magasabb a nem roncsolódott sejtek aránya, mint DMSO alkalmazásakor.

5.2. Javaslatok

A vizsgálataim során kapott eredmények alapján jövőben zajló kísérletekben és üzemi tesztelések során a következőket tartom fontosnak figyelembe venni.

Javaslom afrikai harcsa faj esetében a keltetési körülmények optimalizálását, így kiküszöbölve a fenotípusosan torz lárvák magas arányát a kontroll csoportban, elősegítve így a genetikusan torz lárvák kiszűrését.

Javaslom afrikai harcsa és ponty fajok mélyhűtött spermájának használatát szaporítás céljára.

Javaslom ponty faj esetében a cukoralapú hígítók használatát metanol védőanyag kombinálásával.

Javaslom rózsás díszmárna esetében a széleskörű mélyhűtési kísérletek elvégzését, egyéb hígítók használata mellett.

Javaslom rózsás díszmárna esetében a keltetési körülmények optimalizálását a magasabb kelési százalék elérése céljából.

Javaslom a Comet módszer használatát más halfajok spermájának minősítésére is, megtalálva segítségével az optimális hűtőmédiumot.

6. PUBLIKÁCIÓK

6.1 Értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

Közlemények nemzetközi folyóiratokban:

Á. Horváth, **E. Miskolczi**, B. Urbányi. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquatic Living Resources, 16: 457-460.

E. Miskolczi, Á. Horváth, Sz. Mihálffy, E. Patakiné Várkonyi, B. Urbányi, 2005. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. Aquaculture, 247: 119-125.

B. Urbányi, T. Szabó, **E. Miskolczi,** Sz. Mihálffy, K. Vranovics**,** Á. Horváth, 2006. Cryopreservation of sperm of four European cyprinid species. Journal of Applied Ichtiology, 22: 201-204.

Előadások:

Mihálffy Sz**.**, **Miskolczi E**., Patakiné Várkonyi E., Urbányi B., Horváth Á. 2003. Lárvakori torzulások vizsgálata afrikai harcsán (*Clarias gariepinus)* mélyhűtött sperma alkalmazását követően. XXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 30. Szarvas

Vranovics K., Horváth Á., **Miskolczi E**., Urbányi B. 2003. Pontysperma mélyhűtése különböző hígítók és védőanyagok felhasználásával. XXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 15. Szarvas

B. Urbányi, **E. Miskolczi**, Sz. Mihálffy, E. Patakiné Várkonyi, Á. Horváth 2003. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. World Aquaculture 2003, Salvador, Brazília, 2003. május 19-23. Összefoglaló: 800.

E. Miskolczi, Á. Horváth, Sz. Mihálffy, E. Patakiné Várkonyi, B. Urbányi, 2003. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm.

VIII Genetics in Aquaculture, Puerto Varas, Chile, 2003. november 9-15. Összefoglaló: 46.

Miskolczi E., Urbányi B., Ősz K., A. Devaux, Horváth Á. 2004. A „comet assay", mint a genetikai károsodások kimutatásának új módszere. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 11. Szarvas

Mihálffy Sz**.**, **Miskolczi E**., Patakiné Várkonyi E., Urbányi B., Horváth Á. 2003. Lárvakori torzulások vizsgálata afrikai harcsán (*Clarias gariepinus)* mélyhűtött sperma alkalmazását követően. XXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 30. Szarvas

Poszterek:

Vranovics K., Ősz K., **Miskolczi E**., Urbányi B., Horváth Á. 2004. Rózsás díszmárna (*Barbus conchonius*) spermájának mélyhűtése. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 25. Szarvas

E. Miskolczi, B. Urbányi Á. Horváth, 2005. Cryopreservation of common carp sperm, Aquaculture America 2005, New Orleans, Louisiana, USA. Összefoglaló: 275.

6.2 Egyéb publikációk

Közlemények nemzetközi folyóiratokban:

Miskolczi E., Mihálffy Sz**.**, Patakiné Várkonyi E., Urbányi B., Horváth Á. 2002. Lárvakori torzulások vizsgálata mélyhűtött sperma alkalmazása során. Halászatfejlesztés, 27: 127-134.

Előadások:

Miskolczi E. 2000. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével. Egyetemi Tudományos Diákköri Konferencia, Környezetvédelmi szekció, első helyezés, Gödöllő

Váradi, L. Decker, K., Tóth, B. és **Miskolczi, E**. 2000. Gyomhalak a magyar haltenyésztésben. A tiszai ciánszennyezés hatása az egyes halfajokra. II. Halászati Szakmai Napok, SzIE, Gödöllő

Miskolczi E., Tóth B. és Váradi L. 2000. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével. II. Halászati Szakmai Napok, SzIE, Gödöllő

Miskolczi E. 2001. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Környezetvédelmi szekció 3. helyezés, Sopron

Miskolczi E., Tóth B., Váradi L. 2001. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével. XXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 16. Szarvas

Miskolczi E., Urbányi B., Ősz K., A. Devaux, Horváth Á. 2004. A „comet assay", mint a genetikai károsodások kimutatásának új módszere. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 11. Szarvas

Poszterek:

Mihálffy Sz., **Miskolczi E**., Urbányi B., Horváth Á. 2004. Hazai folyóvízi pontyfélék hímivarsejtjeinek mélyhűtése. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 27. Szarvas

Vranovics K., Ősz K., **Miskolczi E**., Urbányi B., Horváth Á. 2004. Rózsás díszmárna (*Barbus conchonius*) spermájának mélyhűtése. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 25. Szarvas

Mihálffy Sz., **Miskolczi E**., Urbányi B., Horváth Á. 2004. Hazai folyóvízi pontyfélék hímivarsejtjeinek mélyhűtése. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Összefoglaló: 27. Szarvas

E. Miskolczi, B.Urbanyi, T. Szabó, Sz. Mihalffy, K. Vranovics, Á. Horváth 2004. Cryopreservation of sperm of different cyprinid species. IV. Student Conference on Conservation Science in Cambridge, United Kingdom, 2004. március 24-26. Összefoglaló: 17.

Sz. Mihálffy, B. Urbányi, T. Szabó, **E. Miskolczi,** K. Vranovics**,** Á. Horváth, 2005. Cryopreservation of sperm of four European cyprinid species, Aquaculture America 2005. New Orleans, Louisiana, USA. Összefoglaló: 282.