

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és

Környezettudományi Kar

Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet

Halgazdálkodási Tanszék

*A barramundi (Lates calcarifer) indukált ivarváltásának vizsgálata szövettani
módszerekkel*

Készítette: Kása Eszter

Évfolyam: Mezőgazdasági Biotechnológus MSc., II. évfolyam

Belső konzulens:

Dr. Horváth Ákos, tudományos főmunkatárs

Dr. Szabó Tamás, egyetemi docens

Szentes Katalin, PhD hallgató

Gödöllő

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	3
2. Szakirodalmi áttekintés	4
2.1. A barramundi bemutatása	4
2.1.1. Elterjedése, élőhelye	4
2.1.2. Külső megjelenése	5
2.2. A barramundi biológiai sajátosságai	5
2.3. A barramundi szaporodásbiológiai sajátosságai	5
2.3.1. Reprodukciós szakaszok	7
2.4. Ivar kialakulása	7
2.4.1. Tejesek ivarérési szakaszai	8
2.4.2. Az ivar átfordulása	8
2.4.3. Ikrások ivarérési szakaszai	10
2.5. Az ivarszervek jellemzői	11
2.5.1. A here jellemzői	11
2.5.2. A petefészek jellemzői	11
2.6. Az ivarérés befolyásolásának lehetőségei	11
2.6.1. Ivarérés befolyásolása a környezeti tényezők megváltoztatásán keresztül	11
2.6.2. Ivarérés befolyásolása a víz sókoncentrációjának növelésével	11
2.6.3. Ivarérés befolyásolása LHRH-analógokkal	12
2.6.4. Ivarérés befolyásolása hipofizálással	12
3. Anyag és módszer	14
3.1. Kísérleti egyedek és tartási körülmények	14
3.2. Kísérleti beállítások	15
3.2.1. Hormonkezelés hatását vizsgáló kísérlet beállítása	15
3.2.2. Sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérlet beállítása	16

3.3. Mintavételek.....	18
3.3.1. Hormonkezelés hatását vizsgáló kísérlet mintavételei.....	18
3.3.2. Sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérlet mintavételei	19
3.4. Szövettani vizsgálatok.....	20
4. Eredmények	22
4.1. Hormonkezelés hatását vizsgáló kísérlet eredményei.....	22
4.2. Sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérlet eredményei	32
5. Értékelés és következtetések	39
6. Összefoglalás	40
7. Köszönetnyilvánítás	41
8. Nyilatkozat	42
9. Irodalomjegyzék.....	43

1. Bevezetés és célkitűzések

A barramundi ivadék hazai keltetőházi előállításának a szaporodásbiológiai sajátosságok miatt még nem megoldott. A külföldi ivadék utánpótlás beszerzésének kiküszöbölésével jelentős költségtényezőket takaríthatnának meg, ezáltal a gazdasági haszon mértéke is nőne. Az anyahalak nevelésének magas a költségvonzata, mivel a spontán ivarváltás bekövetkeztéig hosszú ideig kell az egyedeket tartani és takarmányozni. Ennek a problémának a megoldása érdekében folytatunk olyan vizsgálatokat, melyeknek célja a halfaj szaporodásbiológiájának, az ivarérettség és ivarváltás folyamatának részletes megismerése, valamint ezek tervszerű befolyásolása mesterséges módszerekkel (hormonális kezelések, környezeti tényezők változtatása). A kutatások végcélja a keltetőházi fejés időzíthetősége, valamint a gazdaságos lárvaneveléshez elegendő mennyiségű ivartermék kinyerése.

Magyarországon 2010 óta, kísérleti jelleggel folyik az „*Exportképes halfajok (Barramundi; Vörös árnyékhal) termeléstechológiájának komplex fejlesztése*” elnevezésű 4 éves kutatási projekt keretében barramundi tenyésztés a Jászkiséri Halas Kft. halnevelő telepén. A kísérletek további résztvevői a Szent István Egyetem, a Halászati és Öntözési Kutatóintézet, a Debreceni Egyetem, valamint az Unio SeaFood Kft.

Az emberiség növekvő fehérjeszükségletének kielégítésére az intenzív haltenyésztés lehet az egyik megoldás, azonban az intenzív tartástechnológia elemeire (magas egyedsűrűség, tápos takarmányozás, stressz) a legtöbb halfaj érzékeny. A barramundi ezzel szemben jól nevelhető zárt tenyésztési rendszerben. A nevelés során a jászkiséri telepen alkalmazott recirkulációs rendszer víztakarékos, így alacsony a termelés során a környezetet érő terhelés. A halfaj által termelt hús prémium minőségű piaci termék: szállátlan, omlós szerkezetű, magas nedvességtartalmú, telt ízű. A barramundi további előnye, hogy a Magyarországon termelt ponttyal szemben jelentős exportpotenciállal rendelkezik.

Kísérletünk keretében két különböző kezelés, a hipofízis injektálás és a víz sókoncentrációjának növelésének hatását vizsgáltuk a barramundi ivarérettségi és ivarváltási folyamataira vonatkoztatva. Célunk a spermatermelés stimulációja volt.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A barramundi bemutatása

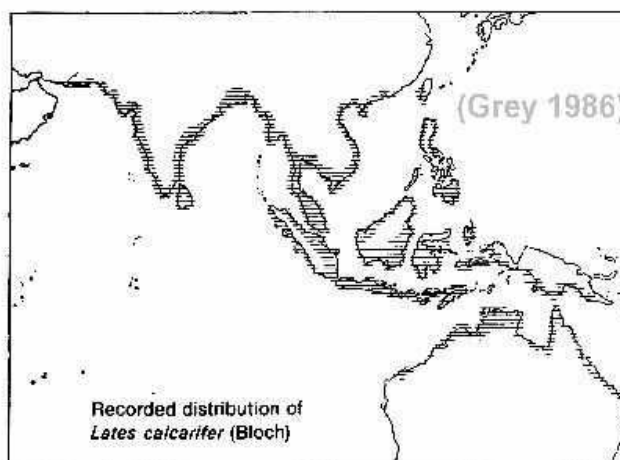
A barramundi (*Lates calcarifer*, BLOCH, 1790), más néven óriás ausztrál sügér vagy ázsiai sügér, a sugarasúszójú halak (Actinopterygii) osztályába, sügéralakúak (Perciformes) rendjébe, Latidae családba tartozik (http1). Ausztrália nemzeti hala, nevének eredeti jelentése „nagy pikkelyű ezüsthall” (1. ábra).



1. ábra: A barramundi (*Lates calcarifer*)

2.1.1. Elterjedése, élőhelye

A barramundi természetes elterjedési területe Észak-Ausztráliától Délkelet-Ázsiáig, illetve a Perzsa-öböl tart (Katersky et al, 2007). Megtalálható az Indiai-óceán és a Csendes-óceán trópusi szigetein (2. ábra). Az ázsiai és az ausztrál populáció között több élettani különbséget is feljegyeztek.



Geographical distribution of *L. calcarifer*.

2. ábra: A barramundi földrajzi elterjedése (forrás: http 2.)

A barramundi populációk a partok közelében, lagúnákban, folyótorkolatokban, tengerbe torkolló folyókban élnek, 10-40 méter mélységű vizekben. A lárvák és a növendék halak brakkvizű (félsós vizű) időszakos mocsarakban, a kifejlett egyedek az ivarérettség eléréséig a folyókban élnek. Az ívás a partközeli, sós vízben történik (Davis, 1987).

2.1.2. Külső megjelenése

A barramundi nagytestű halfaj, teste megnyúlt, vaskos, oldalról lapított. A száj nagy és ferde, felső állkapcsának széle a szem mögé ér. Az úszók sötét színűek. A kifejlett példányok 29-60 centiméteresek, de a másfél méteres testhosszt is elérhetik. Testtömege 2-7 kg. Találtak már 2 méteres, 60 kilogrammos egyedet is.

2.2. A barramundi biológiai sajátosságai

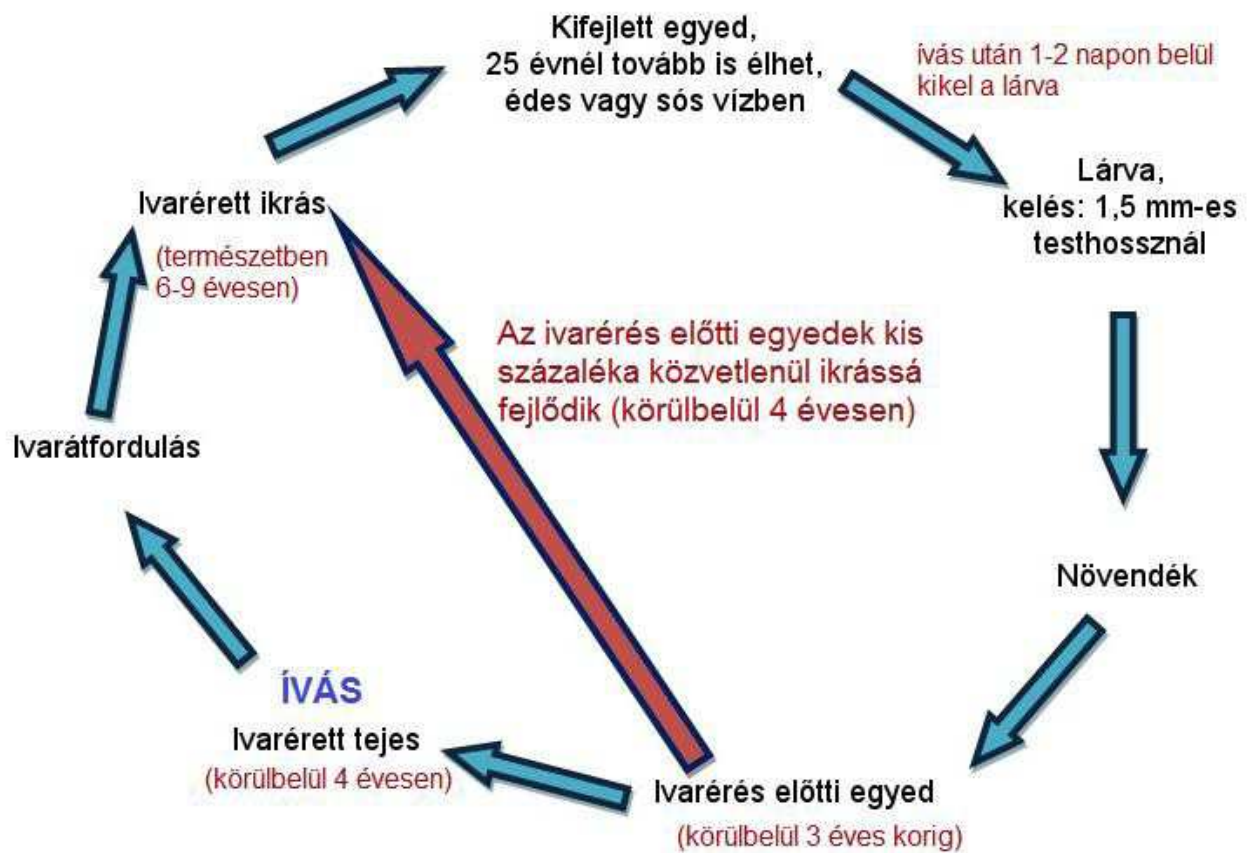
A barramundi eurihalin faj, azaz a víz sókoncentrációjának változását jól tűri (McDougall, 2004), ennek következtében édes, sós és félsós vizekben is megtalálható. Természetes körülmények között életének első 2-3 évét édesvízben tölti, majd onnan vándorol a tengerbe. Ez a vándorlás azért fontos, mert gonádok végső kifejlődése 30‰ körüli sótartalmú vízben megy végbe. Ettől függetlenül édesvízben is megfigyeltek már ivarváltó egyedeket (Moore, 1979). A fiatal egyedek mindenevők, kis halakat, ízeltlábúakat és algákat egyaránt fogyasztanak. A kifejlett hal ragadozó, rákokkal, halakkal, puhatestűekkel táplálkozik.

2.3. A barramundi szaporodásbiológiai sajátosságai

A faj protandriás hermafrodita, a halak teljesen válnak ivaréretté, és csak néhány egyed alakul át ezután ikrássá (Moore, 1979). A hímek ivarérese természetes körülmények között 3-5 éves életkorban következik be, és legalább egy ívás előzi meg az ivarváltást (3. ábra). Mesterséges tartáskörülmények között gyorsabban bekövetkező ivarváltásról számolt be Toledo (Toledo et al, 1991), tengeri úszó ketrecekben nevelt barramundi állománynál 2-2,5 évesen találtak már ivarérett tejes egyedeket. A barramundi ívása periodikus, érett ikrás egyedeket általában telihold idején, 18:00 és 22:00 óra között szoktak gyűjteni, dagály idején (Kungvankij et al, 1986).

Ausztráliában, a Carpentaria-öbölben olyan értékes barramundi populációt találtak, melynek hím egyedei már 1-2 éves korukra ivaréretté váltak, és az ivarváltás már négy éves korban bekövetkezett. Az állomány három éves korára elérte az 1:1-es ivararányt, ami a többi barramundi

populációban csak hét éves kor után következett be. A populációban az ivarátfordulás eredményeként jelen lévő ikrások mellett találtak kis számban elsődleges ikrásokat is. (Davis, 1984)



3. ábra: A barramundi életciklusa (saját ábra)

Az ivarszervek fejlettségi állapota és az egyed neme külső megfigyeléssel nem megállapítható, a meghatározásra biopsziás módszert használunk (Garcia, 1989). Az eljárás során felhasznált 5%-os foszfát-pufferes formalin oldat ozmolaritása megegyezik a barramundi vérplazmájáéval. Fixálás után az ivarképletek (petesejtek, hímvarsejtek, stb.) átmérője mérhetővé válik, ezek lényegében megegyeznek a friss képletek méreteivel.

A barramundi reprodukciós ciklusát és ivarátfordulását tengervízben elhelyezett úszó ketrecekben tartva vizsgálták Tahitin (Guiguen et al, 1994). Három éves koruktól kezdve vettek ivarszerv mintát az egyedekből havi rendszerességgel, 14 hónapon keresztül. Az ivarszerv egy darabját fixálták, dehidratálták, paraffinba ágyazták, majd a 4-7 mikrométeres metszeteket megfestették. Néhány ivarszervet egyben fixáltak, és három egyenlő részre osztották fel, a lehetséges eltérések vizsgálatára az átmeneti ivarszervekben. A legnagyobb petesejt átmérőt a tíz

legnagyobb petesejt átmérő átlagértékéből határozták meg a metszeteken. A mintavételek mellett rögzítették a halak testparamétereit (standard testhossz, testsúly, ivarszerv súlya). A ketrecben a halak egyedsűrűsége folyamatosan változott a kísérlet alatt. A három éves tejes egyedek 45%-a váltott ivart, és alakult át nősténnyé. Októbertől februárig tartó, éves reprodukciós ciklust figyeltek meg a meleg hőmérsékletű és csapadékos évszakban. Az ivarátfordulás ezen ciklus után kezdődik az íváson átesett hímekben. A következő főbb szövettani változások ekkor: hereszövet visszaalakulása, női ivarsejtek megjelenése, petefészek szövet centripetális osztódása.

2.3.1. Reprodukciós szakaszok

A barramundi természetes reprodukciós ciklusa két fő szakaszra bontható, melyek a következők:

- **Pihenő szakasz:**

A márciustól szeptemberig terjedő pihenő szakaszban alacsony GSI (gonadoszomatikus index) mérhető, hímek esetében 0,1%-nál, nőstények esetében 0,5%-nál alacsonyabb érték. Csupán néhány hím egyedet találtak, melyek ivarszerve a 3. fejlettségi stádiumban volt, a nőstények közül egyetlen egyed sem volt ilyen stádiumban. (Guiguen, 1994)

- **Reprodukciós szakasz:**

Az októbertől februárig tartó reprodukciós időszakban magas GSI mérhető, és szinte minden vizsgált egyed az ivarszervek érésének 3. szakaszában van (tejeseknél spermiáció, ikrásoknál vitellogenezis) (Guiguen, 1994).

2.4. Ivar kialakulása

A barramundi nőstények általában az ivarérett hím egyedekből alakulnak ki. Az ivarérett hímek testhossza az északi területeken és a Carpentaria öböl dél-keleti részén 600 és 550 mm között volt. A legtöbb egyed 900-850 mm körüli testhossz elérésekor váltott ivart a megfigyelt területen (Davis, 1982). Az ivarérett a természetes élőhelyen 4 éves korban, intenzív rendszerekben korábban, már 2-3 éves korban bekövetkezik (Borbély és Csorbai, 2010). Recirkulációs rendszerben a spermatogenezis a halakban már 9 hónapos koruk előtt megkezdődik (Szentés et al, 2012).

2.4.1. Tejesek ivarérési szakaszai

A hímek gametogenezise folyamatos, minden ivarsejt fejlődési stádium megtalálható egész évben a biopsziás módszerrel vett ivarszerv mintákban. A spermatogenezis legfejlettebb stádiumát mutató sejtek mindig a here központi részében helyezkedtek el. A herékben az egyes érési stádiumok alatt jelen lehetnek previtellogenikus petesejtek. Ezek többnyire az ivarszerv ventrális oldalán találhatók, csoportokba rendeződve. A sejtípusok aránya alapján a következő érési stádiumokat különítették el (Guiguen, 1994):

- **M1, spermatogoniális stádium:** döntő többségben spermatogóniumokat tartalmazó ciszták találhatók a hereszövetben.
- **M2, spermatogenezis szakasza:** döntő többségben spermatocitákat és spermatidákat tartalmazó ciszták találhatók a hereszövetben.
- **M3, spermiáció szakasza:** a here nagy részében érett spermiumok találhatók.
- **M4, ivás utáni szakasz:** a legtöbb leány spermiumoktól mentes, de néhány spermatogóniumokat tartalmazó ciszta még jelen van a perifériás területeken.

2.4.2. Az ivar átfordulása

Moore (1979) írta le elsőként a barramundi ivar átfordulásának folyamatát. Az egyedek testhossz eloszlását vizsgálta, átmeneti ivarszerveket talált és biopsziát végzett, és megállapította, hogy a barramundi protandriás hermafrodita faj, valamint hogy az ivar átforduláshoz az ivarszerv teljes újraszerveződésére van szükség. Moore eredményeit erősítette meg Davis (1982). Az átmeneti ivarszerveket egyik szerző szerint sem lehet morfológiai tulajdonságaik alapján detektálni. Azt azonban megállapították, hogy az átmeneti ivarszerv minden esetben a herével megegyező morfológiai és szövettani képet mutat, azonban néhány fiatal previtellogenikus petesejtet már tartalmaz a ventrális oldalán. Ezek az oocita-szerű sejtek Reinboth (1988) megfigyelése szerint a hímivar bármelyik fejlődési stádiumában jelen lehetnek. Éppen ezért Guiguen a T1 fázis kezdetét a degenerálódó hereszövet megjelenésétől kezdve számítja.

További szerepe lehet az ivar átforduláskor a megnövekedett mennyiségben jelen lévő véralkotó sejteknek, valamint az immunrendszer sejtjeinek. Más halfajoknál megfigyeltek hosszirányú heterogenitást az ivarszerven belül, azonban a barramundi esetében Guiguen (1994) ennek ellenkezőjét találta, ami megkönnyíti az ivarszerv egyes fejlődési fázisokba történő

besorolását. A teljes ivar átfordulás hímből nőtény egyeddé kevesebb, mint tizenhét nap alatt végbemegy.

Az ivar átfordulás kiváltható viselkedési szignálokön keresztül is, különösképp korlátozott méretű területen tartott csoportoknál (Ross, 1990). A zárt, mesterséges csoportokban történő tartás növelheti ezen szignálok mértéként. Hatása lehet a csoportban a nemek és az életkor arányának is. A nőtények arányának alacsony száma pozitív hatással lehet az ivar átfordulásra.

A barramundi ivarváltása a természetben 100 cm körüli testhossz elérésekor következik be, míg intenzív tartási rendszerekben ezt már 60 cm-es testhossznál is megfigyelték (Borbély és Csorbai, 2010). Guiguen et al. (1994) kísérletei eredményei alapján megállapították, hogy jelentős különbséget mutat a testsúly és standard testhossz a hím és nőtény egyedek között. A nőtények testhossza és súlya is nagyobb, mint a hímeké, és az átmeneti ivarú halak esetében nagyobb zsigerelt testsúlyt mértek, mint a hímeknél (1. táblázat). Az átmeneti ivarú halak és az ikrások között nem találtak lényegi különbséget.

Ivar	Testtömeg (átlag±szórás), g	Testhossz (átlag±szórás), cm
Tejes	4310 ± 66	55,6 ± 0,4
Átalakuló	5015 ± 189	57,8 ± 0,7
Ikrás	5213 ± 95	58,7 ± 0,3

1. táblázat: Különböző ivarú halak testtömege és testhossza (Guiguen et al, 1994)

A here és a petefészek közti nagymértékű szerkezeti különbségekből adódóan jelentős morfológiai újraszerveződéssel jár az ivarátfordulás. Az ivarátfordulás után az ivarszerv mérete csökken, színe pirosas-rózsaszínes lesz, feltehetően a külső perifériás vérbőség miatt, ami ekkor szintén megfigyelhető a szövettani metszeteken. A visszafejlődő here szövet és az osztódó petefészek szövet aránya alapján négy fázisra osztható az ivarátfordulás:

- **T1, első átmeneti szakasz:** a degenerálódó leányekben lévő cisztákban megfigyelhetők a spermatogenezis különböző stádiumai. Ebben a szakaszban petefészek-szövet nem megfigyelhető. Sötét pigment anyagot tartalmazó bazofil sejtcsoportok alakulnak ki, valamint megnagyobbodnak az erek, főképp a perifériás területeken.
- **T2, második átmeneti szakasz:** ezt a szakaszt az ovogóniumok és a meiózis első fázisa profázisának különböző alszakaszaiban lévő ovocitáknak az ivarszerv ventrális oldalán kialakuló bemélyedésekben történő csoportos megjelenésétől számítjuk. A

degenerálódó hereszövet a dorzális oldalon található főképp, a ventrális oldalt kötőszövet tölti ki.

- **T3, harmadik átmeneti szakasz:** ebben a szakaszban a petefészek-szövetben egybefüggő réteget alkotnak a protoplazmás növekedési szakaszban lévő petesejtek, melyek főképp a petefészek ventrális oldalán helyezkednek el. Az ivarszerv többi részét (több, mint 50%-át) tömöttrostos kötőszövet-állomány alkotja, melyben nem található hereszövet. A petefészek-szövet és a tömöttrostos kötőszövet között lazarostos kötőszövetes zóna található. A ventrális oldalon található bemélyedések átalakulnak kötőszövetté, mely később az ovariális lamellákat fogja alkotni.
- **T4, negyedik átmeneti szakasz:** az ovociták aránya meghaladja az 50%-ot (a kötőszövethez viszonyítva). Kialakul a petefészek ürege, az ivarszerv falából lemezek türemkednek be, melyek csírahámját a fejlődő follikulusok alkotják. Ez a stádium a petefészek kialakulásának kezdőlépése.

Az ivarátfordulás fázisát a reprodukciós (októbertől februárig) és a nyugalmi (márciustól szeptemberig) periódus között figyelték meg az átmeneti ivarú egyedeken, január és április között. Az ivar átfordulása nagyobb arányban történt a nyugalmi periódus kezdetekor, mint a reprodukciós periódus végén. Csak áprilisban volt szignifikáns a hím egyedek számának csökkenése. Az ivarátfordulás nem szinkronizáltan történt a hím populációban. A fázis alatt a napfényes órák száma csökkent, a hőmérséklet pedig növekedett ápriliséig, amikor az ivarátfordulás aránya a legnagyobb volt. (Guiguen, 1994)

2.4.3. Ikrások ivarérési szakaszai

- **F1, protoplazmás szakasz:** a petefészek ovariális lamellákba rendezett previtellogenikus ovocitákkal van tele. Hematoxylinnel és Giemsa-val történő festéskor a petesejtek bazofilek. A tíz legnagyobb ovocita átmérőjének átlaga 73 μm .
- **F2, vakuolizálódás szakasza:** a vakuolizálódás stádiumában lévő ovociták legfeljebb 50%-os arányban figyelhetők meg a petefészek keresztmetszeten. Az ovociták már nem bazofilek. Könnyen elkülöníthető follikuláris sejtek veszik körül a petesejteket. A tíz legnagyobb ovocita átmérőjének átlaga 160 μm .
- **F3, vitellogenezis szakasza:** a vakuolizálódás stádiumában lévő ovociták a petefészek keresztmetszet több, mint 50%-ában vannak jelen. A tíz legnagyobb ovocita átmérőjének átlaga 390 μm .

- **F4, atretikus szakasz:** jelentős többségben atretizált ovociták vannak jelen a petefészekben. A tíz legnagyobb ovocita átmérőjének átlaga 335 μm .

2.5. Az ivarszervek jellemzői

2.5.1. A here jellemzői

Barramundi esetében a here relatív tömege kisebb, mint a legtöbb halfajnál, körülbelül a testtömeg 0,2-1%-a, az alacsony gonadoszomatikus index a trópusi halfajok sajátossága. Ezzel párhuzamban azonban az ivarsejt képződés folyamatos. A kifejtett here fehér színű, a vese alatt elhelyezkedő, megnyúlt, páros szerv.

2.5.2. A petefészek jellemzői

Barramundi esetében here és a petefészek morfológiailag jelentős különbségeket mutat, a petefészek nagyobb méretű a herénél, valamint pirosas-rózsaszínes színeződésű, ez a sűrű perifériás vérhálózatnak köszönhető (Guiguen, 1994).

2.6. Az ivarérés befolyásolásának lehetőségei

Az ivarérés befolyásolására halfajonként különböző módszerek váltak be a gyakorlati alkalmazás során. Barramundi halfaj esetében az alábbi pontokban felsorolt módszerekkel folytattak eredményes kísérleteket.

2.6.1. Ivarérés befolyásolása a környezeti tényezők megváltoztatásán keresztül

Az ivarérés indukálható bizonyos környezeti tényezők megváltoztatásával. Ilyen tényezők a víz sókoncentrációja, a víz hőmérséklete és az egyedsűrűség. Ezekkel a természetben lezajló vándorlás körülményeit lehet szimulálni, mint például a sótartalom növekedése a tenger felé vándorlás során, ezzel egyidejűleg az egyedsűrűség csökkenése, valamint az évszakok hőmérsékletváltozásai. A környezeti tényezők változtatásán alapuló módszer az ázsiai barramundi populációk esetében bizonyult csak hatásosnak, az ausztrál populációban nem figyeltek meg változást az állomány szaporodásbiológiai állapotában.

2.6.2. Ivarérés befolyásolása a víz sókoncentrációjának növelésével

A barramundi természetes életciklusának része az édesvízből magasabb sókoncentrációjú vizekbe vándorlás, az ivarérésre jelentős hatása van a sótartalomnak. Recirkulációs rendszerben

nevelt barramundi állományánál az év bármely időszakában indukálható az ívás, ha a víz sókoncentrációja 30-36 ‰ között van, a víz hőmérséklete 28-29°C, és a nyári fototeperiódusnak megfelelő napi 13 óras megvilágítást alkalmaznak (Garrett & O'Brien, 1994).

2.6.3. Ivarérés befolyásolása LHRH-analógokkal

A napjainkban legelterjedtebb indukciós módszer barramundi esetében a luteinizáló hormon-releasing hormon analógok (LHRH-a) használata. Az ovocitaérés barramundi esetében kiváltható LHRHa kezeléssel a vitellogenezis idejében (Garcia, 1992). A kezelt nőtények több alkalommal ikráznak, 24 órás időközönként. Ezzel a kezeléssel növelni lehet a nőivarú egyedek alacsony arányát. GnRH-t injekció és beültetett pellet formájában is juttattak be nőtényekbe, mindkettőt ismételve, ezáltal többszörös ikrázást váltottak ki. A pelletes módszer olcsóbbnak és megbízhatóbbnak bizonyult, valamint kisebb stresszhatás érte így a halakat. (Almendras et al, 1988)

2.6.4. Ivarérés befolyásolása hipofizálással

A hipofizálás az indukált halszaporítás egyik legrégebbi és legelterjedtebb módszere, több évtizede, az 1940-es évek óta használják a haltenyésztők gyakorlatban. A hipofízis hatóanyaga a gonadotrop hormon (GtH), mely az adenohipofízisben termelődik. A hipofízis kivonatot többnyire tartósítás után használják fel a halak kezelésére, ez a tartósítás a mirigy dehidratálásával és zsírtalanításával történik, aceton felhasználásával. Az így kezelt hipofízis évekig tárolható és felhasználható.

A gonadotrop hormon a keringési rendszeren át eljut az ivarszervekbe, ahol hatására 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-on termelődik és kerül kiválasztásra. Ennek eredményeként végbemegy a végsőérés és spermiáció. Ez a két hormon játszik szerepet a spermiumok szeminális folyadékban történő inaktív állapotban tartásában, majd a végsőérésben és a mozgásképesség kialakulásában. Mindezek mellett jelentőségük van a szaporodási folyamatokban feromonként is.

Két különböző gonadotrop hormont izoláltak a csontoshalak hipofíziséből: a GtH-I FSH, a GtH-II pedig LH jellegű molekula, funkciójuk különböző. A gametogenezis szabályozásában a GtH-I játszik fontos szerepet, az ivarmirigyek 11-ketotesztoszteron termelését serkenti a hímivarú halakban, melynek termelődési helye a Leydig-sejtekben van. A 11-ketotesztoszteron aktiválja a Sertoli-sejteket és serkenti a spermatogenezist. A GtH-II hormon mennyisége közvetlenül az ívás előtt nő meg. A gonadotrop hormonok hatására az ivarszervekben további célhormonok, ivari szteroidok termelődnek. Ezek befolyásolják a gametogenezist, valamint szabályozzák a

hipotalamusz-adenohipofízis tengelyt visszacsatolós mechanizmussal. Egyes szteroidok az ivarsejtek fejlődését, mások a gaméták végső érését serkentik. (Horváth, 2000)

A hipofízis injekciót többnyire két egymás utáni dózisban adják be a halnak. Ha erre sem reagál, harmadik injekciót is beadnak. Ivarzás indukálására a hím egyedek a nőtények adagjának felét kapják a hipofízis oldatból. A beadott hipofízis mennyisége több tényezőtől függ, ilyenek például a donor és a recipiens testtömege, életkora, neme és ivarérettsége. A hipofízis kivonatok alkalmazásának fő problémája az ázsiai haltenyésztők számára a jelentős költségvonzat (Marte, 1989). Széles körben alkalmazott módszer barramundi ívás indukálására a következők injektálása: Puberogen, Pregnyl, hCG vagy hCG + pontyhipofízis kivonat (Kungvankij, 1986, Maneewong, 1986).

A hipofizálás eredményes hatását a spermatermelésre nézve megfigyelték már több halfajon. Compó esetében ponty hipofízis kivonat (CPE; 0.5 mg/testtömeg kilogramm) és ponty homogenizált hipofízis (1 mg / testtömeg kilogramm) injektálásával érték el a spermatogenezis szignifikáns növekedését (Linhart et al, 1995).

3. Anyag és módszer

3.1. Kísérleti egyedek és tartási körülmények

A két kísérletben részt vevő halak 2010. február 27-én kerültek egy hónapos ivadékként a jászkiséri halgazdaság területére. Az előnevelt barramundi ivadékokat Izraelből szállítják Magyarországra, a Madan-Ma'agan Micheal Fish Breeding Center-ből, az ivadék szállítás egész évben folyamatosan biztosított (http 3.). Az ivadékok testtömege 0.2-1 gramm közötti érték, átlagosan 0,5 gramm. Az ivadékok rövid akklimatizációs idő után kerülnek be a jászkiséri telep zárt recirkulációs rendszerébe. A nevelés kezdetén a telepítési sűrűség 5kg ivadék/1000 liter víz, 4 köbméteres utónevelő körmedencékben. 20 grammos testtömeg elérésekor az állományt áthelyezik az áruhal nevelő medencékbe (4. ábra), melyben 80 kg hal/1000 liter víz a telepítési sűrűség, és a medence mérete 54 köbméter. Az állományt teljes értékű haltakarmánnyal etetik, az Aller Aqua cég tápjaival. A testtömegekre vetítve az ivadékok 4-10%, az áruhalak 100 grammos testtömegig 2%, felette 1%, a kívánt testméret elérése után 0,5% az etetett takarmány.

Az alkalmazott fényprogram minden haltartó épületben 12 órás. A nevelés ideje alatt a víz hőmérsékletét folyamatosan 27°C-on tartják (+/-1°C eltérés), valamint a következő paramétereket figyelik és szabályozzák folyamatosan:

- oldott oxigén szint (ivadéknevelés alatt 7-8 mg/l, növekedési fázisban 4-5 mg/l),
- ammónia szint (<0,5 mg/l),
- nitrit szint (<1 mg/l),
- nitrát szint (<150 mg/l).



4. ábra: Halnevelő medencék a jászkiséri halgazdaság egyik épületében

3.2. Kísérleti beállítások

3.2.1. Hormonkezelés hatását vizsgáló kísérlet beállítása

A kísérleti állomány elhelyezése két egymás melletti medencében és csoportokra osztása (hipofizált és kontroll csoport) 2011. november 2-án történt. A 21 hónapos életkorú egyedek közül véletlenszerűen választottunk ki 30 halat, melyeket két csoportra osztottunk (15 egyed/csoport), és az egyedeket a csoportok szerint jelöltük (BH: hipofizált-, BK: kontroll csoport), és megmértük a testparamétereiket. (5. ábra, 2. táblázat) Az egyedek jelölését mindkét kísérlet esetében hátizomba injektált elektronikus jeladóval végeztük (P.I.T., passive integrated transponder tag), leolvasó készülékkel azonosítottuk a halakat (6. ábra). A leolvasó rádiójelet bocsát ki, melyet a hátizomban lévő chip visszaküld, és ez karakterekként jelenik meg a leolvasó készüléken.



5. ábra: Barramundi testhossz felvétele



6. ábra: Barramundi egyedi jelölése



7. ábra: Kezelés előtt elaltatott barramundi



8. ábra: Barramundi oltása hipofízis oldattal

Jelölés	Testtömeg (g)	Standard testhossz (cm)	Teljes testhossz (cm)	Jelölés	Testtömeg (g)	Standard testhossz (cm)	Teljes testhossz (cm)
BH 01	1690	40,5	46,0	BK 01	1780	44,0	49,7
BH 02	2020	43,0	48,5	BK 02	1730	41,5	46,8
BH 03	1550	39,8	44,3	BK 03	2110	43,4	49,5
BH 04	1870	42,5	48,0	BK 04	2300	44,0	50,5
BH 05	1600	41,0	46,0	BK 05	1890	42,4	48,0
BH 06	2210	45,3	50,8	BK 06	1740	41,7	47,5
BH 07	1980	45,6	51,0	BK 07	1730	41,0	46,5
BH 08	1800	44,5	50,0	BK 08	1830	41,4	46,7
BH 09	2090	43,8	49,2	BK 09	1570	39,3	44,5
BH 10	1800	42,4	48,0	BK 10	1650	40,3	45,7
BH 11	1980	43,6	49,7	BK 11	1690	41,7	47,5
BH 12	2260	46,8	52,3	BK 12	2150	44,8	50,0
BH 13	1540	41,0	46,5	BK 13	1940	44,3	49,2
BH 14	2030	45,0	50,5	BK 14	1440	39,8	44,8
BH 15	1860	43,0	46,5	BK 15	1870	44,7	49,8
Átlag	1885,33	43,19	48,49		1828,00	42,29	47,78
Szórás	225,42	2,04	2,28		226,97	1,81	1,95

2. táblázat: Halak testparaméterei a kísérlet beállításakor

Az egyes kísérleti csoportok átlagos testparaméterei között nem volt lényegi eltérés. A hipofizált csoport átlagos testtömege $1885,33 \pm 225,42$ g, standard testhossza $43,19 \pm 2,04$ cm, teljes testhossza $48,49 \pm 2,28$ cm, a kontroll csoport átlagos testtömege $1828 \pm 225,97$ g, standard testhossza $42,29 \pm 1,81$ cm, teljes testhossza $47,78 \pm 1,95$ cm volt.

A hipofízis injekcióval kezelt csoport oltásait altatásban végeztük (7. ábra), melyhez 2-fenoxietanolt használtunk. Az oltás során 5mg/testtömegkilogramm ponty hipofízist sóoldatban (SalsolA, Teva) oldva injektáltunk a halak hasüregébe (8. ábra). A kontroll csoport egyedeinek hasüregébe sóoldatot injektáltunk. Az oltásokat a kísérlet során hetente ismételtük.

3.2.2. Sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérlet beállítása

A sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérletben részt vevő 16 hal a kísérlet beállításakor (2012. május 07.) 27 hónapos volt, testparamétereik a 3. táblázatban láthatók. A kísérlet beállításakor a halak átlagos testtömege $2188,75 \pm 253,98$ g, teljes testhossza $51,78 \pm 1,97$ cm, standard testhossza $46,06 \pm 1,52$ cm volt. A víz sókoncentrációját fokozatosan növeltük 12 nap

alatt 0 ‰-ról 30 ‰-re (4. táblázat). A 12-ik napon a 7 m³-es medence vizében összesen 210 kg só volt feloldva.

Jelölés	Testtömeg (g)	Teljes testhossz (cm)	Standard testhossz (cm)
BC01	2250	54,0	48,0
BC02	2470	57,0	50,0
BC03	2790	49,0	45,0
BC04	2050	50,5	45,0
BC05	2010	52,0	46,0
BC06	2100	51,0	45,0
BC07	2140	53,5	47,5
BC08	1920	51,0	45,5
BC09	1990	51,5	45,5
BC10	2100	50,0	45,0
BC11	1820	49,0	43,5
BC12	2130	51,5	46,0
BC13	2600	53,0	47,0
BC14	2130	51,5	45,5
BG01	2360	52,0	46,0
BG02	2160	52,0	46,5
Átlag	2188,75	51,78	46,06
Szórás	253,98	1,97	1,52

3. táblázat: Halak testparaméterei a kísérlet beállításakor

Kísérleti napok száma	Só koncentráció (‰)	Hozzáadott só mennyiség alkalmanként (kg)
1	2	14
2	5	21
3	7	14
4	10	21
5	13	21
6	16	21
7	19	21
8	22	21
9	24	14
10	26	14
11	28	14
12	30	14
Összesen (kg só/7m³ víz)		210

4. táblázat: A víz só koncentrációjának növelése

3.3. Mintavételek

3.3.1. Hormonkezelés hatását vizsgáló kísérlet mintavételei

A hipofízis injekció hatását vizsgáló kísérlet egyedeiből történő ivarszerv mintavétel az alábbi időpontokban történt (5. táblázat).

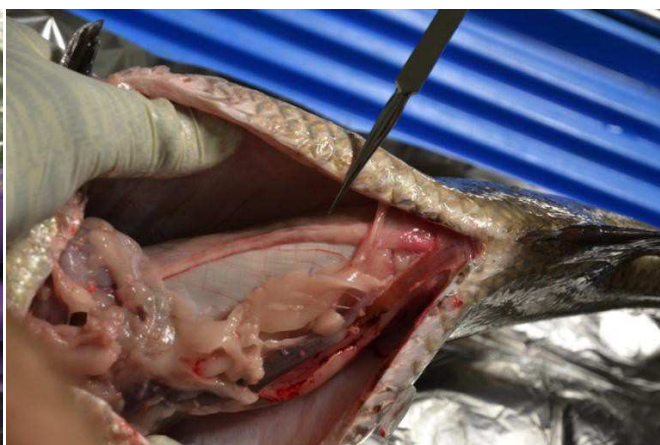
Dátum	Hipofízis injekció szá ma	Halak életkora	Vizsgált egyedek száma
2011.10.24		19 hónap	5
2011.12.21		21 hónap	5
2012.01.04	9. oltás	23 hónap	10 (5 hipofizált, 5 kontroll)
2012.03.07	18. oltás	25 hónap	15 (5 hipofizált, 5 kontroll, 5 az árutermelő medencéből)
2012.05.03	27. oltás	27 hónap	15 (5 hipofizált, 5 kontroll, 5 az árutermelő medencéből)

5. táblázat: Mintavételek időpontjai

Minden alkalommal 5-15 véletlenszerűen kiválasztott egyedet altattunk el, majd altattunk túl. Felvettük a halak testparamétereit (teljes- és standard testhossz, testtömeg), majd felboncoltuk őket, és mintát vettünk az ivarszervekből (9., 10., 11., 12. ábrák).



9. ábra: Ivarszerv mintavétel



10. ábra: Ivarszerv mintavétel (fotó: Tóth Gábor)



11. ábra: Ikrás egyed, petefészkekkel (fotó: Tóth Gábor)



12. ábra: Tejes egyed, herékkel (fotó: Tóth Gábor)

3.3.2. Sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérlet mintavételei

A sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérlet egyedeiből történő ivarszerv mintavétel a következő időpontokban történt (6. táblázat). Rögzítettük a halak testparamétereit is.

Dátum	Mintavétel jellege
2012.05.07	Halak testparamétereinek felvétele
2012.06.06	Halak testparamétereinek felvétele és boncolás
<u>2012.06.18</u>	<u>Halak testparamétereinek felvétele és boncolás</u>

6. táblázat: Mintavételek időpontjai

3.4. Szövetteni vizsgálatok

Az ivarszerveket három részre osztottuk (dorzális, centrális, ventrális részek), majd ezeket külön jelölve (a, b, c) beágyazó kazettákba helyeztük (13. ábra) és 24 órán át 8%-os pufferolt formaldehid oldatban fixáltuk. Ezt követően a mintákat folyó csapvíz alatt átmostuk, majd szövétvíztelenítő automatába (Shandon Citadel 2000 Tissue Processor, Thermo Scientific) helyeztük őket. Az automata a mintákat felszálló alkoholsorban dehidratálja, majd xilolos kezelést követően folyékony paraffinban tárolja őket beágyazásig. A minták beágyazását Ignifer Sz beágyazó készülék segítségével végeztük. A beágyazott mintákból 4-7 μm -es metszeteket készítettünk szánkás mikrotómmal. A tárgylemezre helyezett mintákat 41°C-os termosztátban tároltuk 24 órán át.



13. ábra: Ivarszerv minta centrális darabjának behelyezése a szövet előkészítő kazettába (fotó: Tóth Gábor)

A festést a metszetek felénél kézzel (7. táblázat), a többinél Shandon Varistain V24-4 típusú festőautomatával (8. táblázat) végeztük, hematoxin-eozin festést alkalmazva (Krutsay, 1980), a táblázatokban (7., 8. táblázat) látható festési protokollok szerint. Az elkészült metszeteket mikroszkóppal elemeztük (Nikon Eclipse E600), valamint felvételeket készítettünk a lemezekről a mikroszkóphoz csatlakoztatott digitális kamerával (QImaging MicroPublisher 3.3), amely a számítógéphez IEEE 1394 (Firewire) interfészkábelén keresztül kapcsolódik. A felvételek készítésére a QImaging QCapture Pro 5.1. szoftvert használtuk.

Sorszám	Kezelés	Időtartam
1.	Xilol I.	5 perc
2.	Xilol II.	5 perc
3.	Alkohol I.	5 perc
4.	Alkohol II.	5 perc
5.	Desztillált vizes öblítés	2-3-szor
6.	Hematoxin Langyos folyó	30 másodperc
7.	csapvíz	10 perc
8.	Eozin	30 másodperc
9.	Alkohol I.	5 perc
10.	Alkohol II.	5 perc
11.	Xilol I.	5 perc
12.	Xilol II.	5 perc
13.	Limonén	5 perc

7. táblázat: A kézi metszet festés protokollja

Sorszám	Kezelés	Időtartam
1.	Xilol I.	5 perc
2.	Xilol II.	5 perc
3.	Alkohol I.	5 perc
4.	Alkohol II.	5 perc
5.	Desztillált víz I. Desztillált víz	10 másodperc
6.	II. Desztillált víz	10 másodperc
7.	III.	10 másodperc
8.	Hematoxin	2 perc
9.	Langyos víz I.	5 perc
10.	Langyos víz II.	5 perc
11.	Langyos víz III.	5 perc
12.	Eozin	2 perc
13.	Alkohol III.	5 perc
14.	Alkohol IV.	5 perc
15.	Alkohol V.	5 perc
16.	Xilol III.	5 perc
17.	Xilol IV.	5 perc

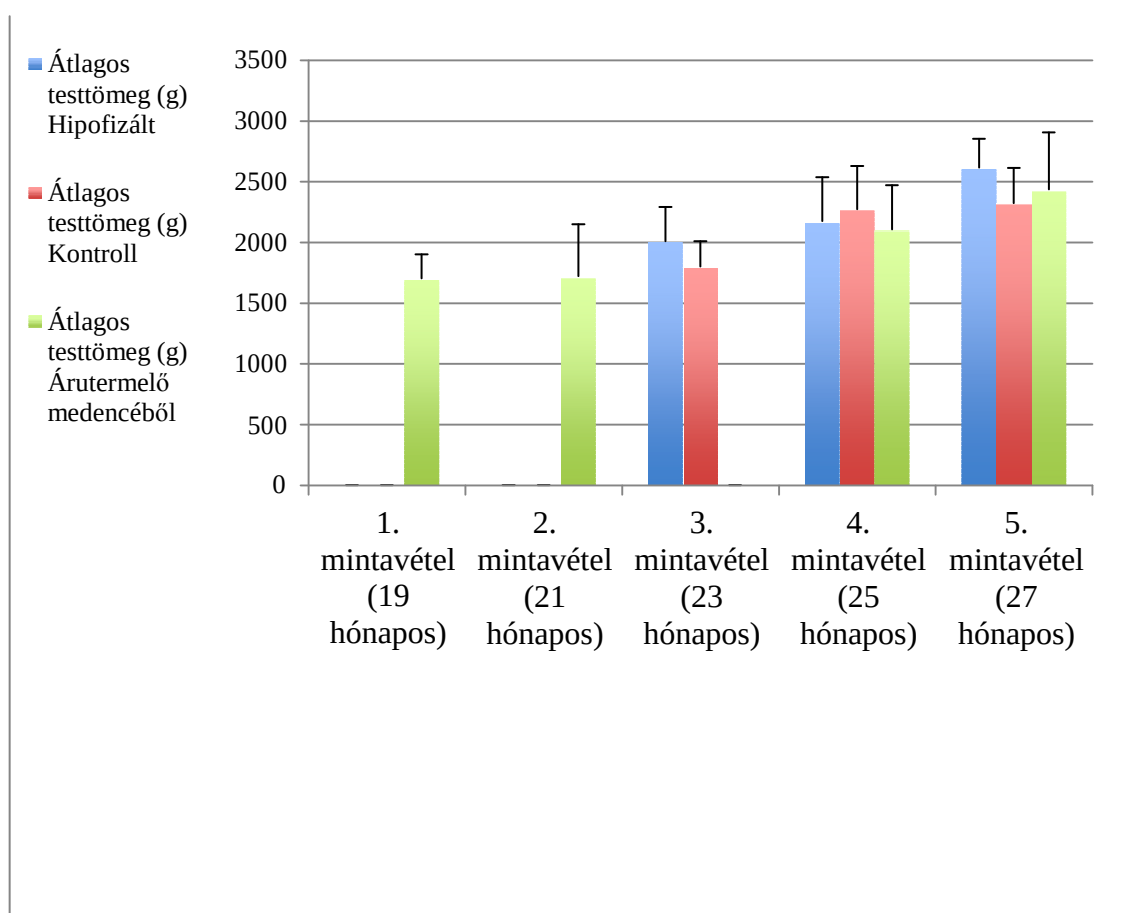
8. táblázat: A festőautomatás metszet festés protokollja

4. Eredmények

4.1. Hormonkezelés hatását vizsgáló kísérlet eredményei

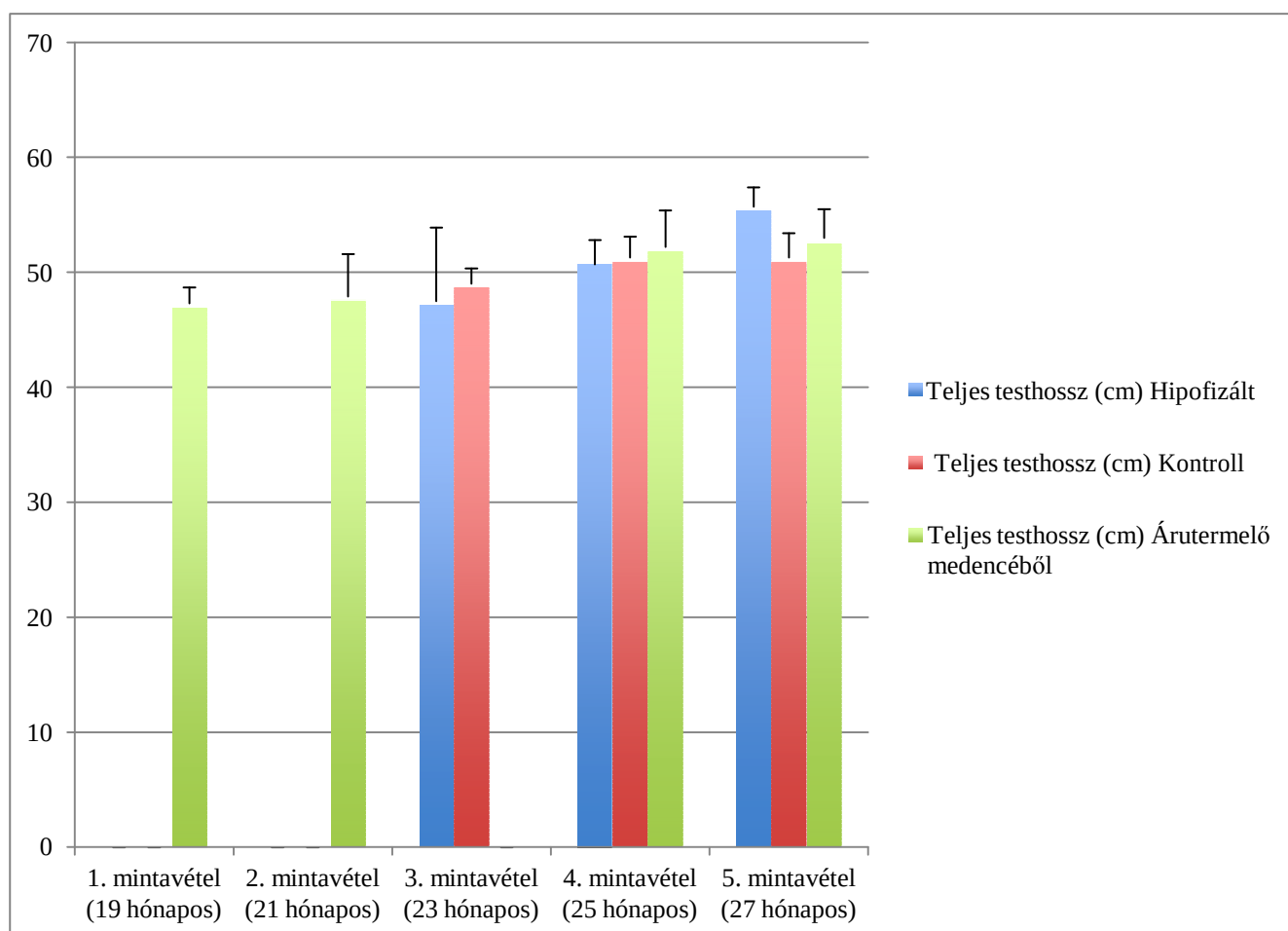
Az első, hipofízis injektálásos kísérletsorozat a jászkiiséri haltartó telepen 2011. október 24-én kezdődött, az utolsó mintavétel 2012 május 3-án történt. A halak egészségi állapotára nem volt káros hatása a kezeléseknak (egyedi jelölés, hetente esedékes altatás, injektálás), egyetlen egyed sem pusztult el a kísérlet időtartama alatt. Az állomány testtömege és testhossza a kísérlet végéig növekedett (14., 15. ábrák).

Testtömeg változása a csoportokban



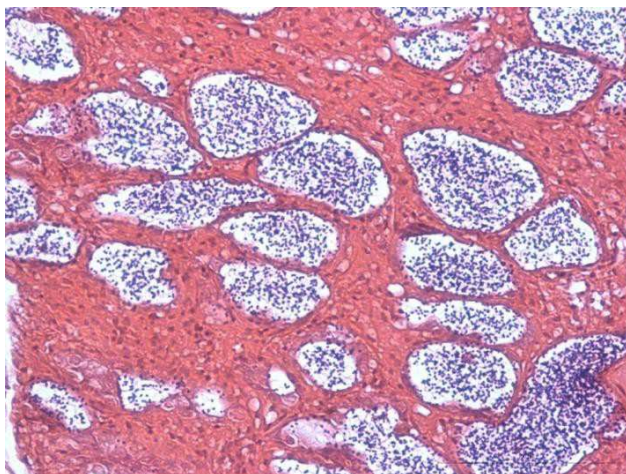
14. ábra: A halak testtömege az egyes csoportokban a kísérlet beállításakor, és a későbbi mintavételek során

Teljes testhossz változása a csoportokban

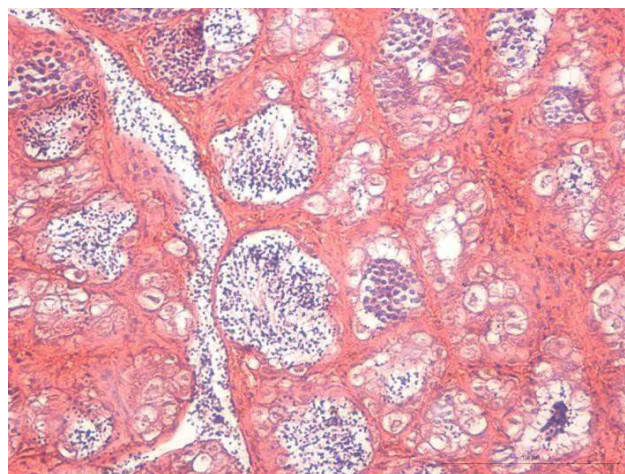


15. ábra: A halak teljes testhossza (cm) az egyes csoportokban a kísérlet beállításakor, és a későbbi mintavételek során.

A kísérlet beállításakor az állomány ivarérett tejesekből állt, a szövettani metszeteken a spermatociszták többségében érett spermiumokat találtunk (16. ábra, 17. ábra), a halak heréjéből nyert spermiumok mesterséges tengervíz hatására aktiválódtak. Ez a reprodukív státusz megerősíti más szerzők megfigyeléseit, amik szerint a barramundi ivarérése mesterséges környezetben korábban bekövetkezik. Többnyire sós vízben, tengeri úszó ketrecekben nevelt barramundi állományokon folytattak ehhez hasonló vizsgálatokat, így kísérletünk eredménye ezt a megfigyelést egészíti ki azzal az információval, hogy a tejesek korai ivarérése édesvízi mesterséges tartásrendszerben is végbe megy.



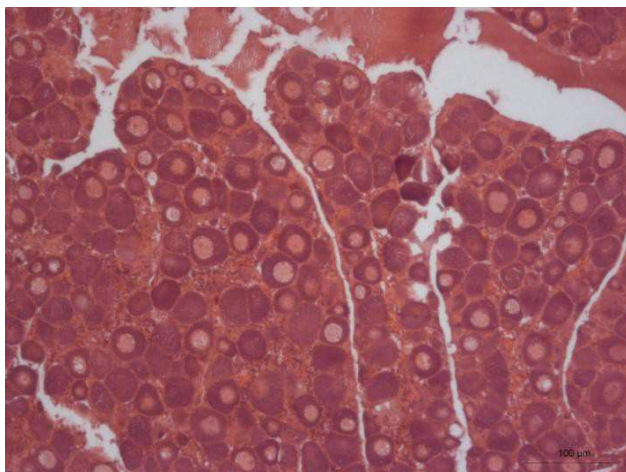
16. ábra: A kísérlet beállításakor a 21 hónapos halakra jellemző hereállapot. A herecsatornácskákat érett spermiumok tömege tölti ki.



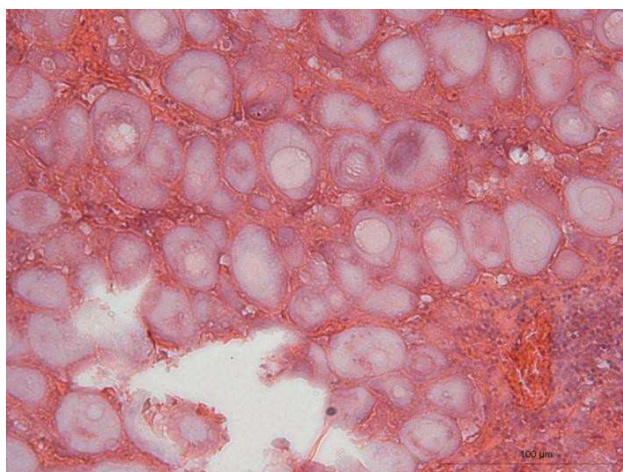
17. ábra: A kísérlet beállításakor a 21 hónapos halakra jellemző hereállapot.

Az első mintavétel során, két hónappal a kísérleti beállítás után már találtunk ivarváltáson átesett egyedeket. A kontroll csoport minden egyede ivart váltott (18. ábra, 19. ábra), a hipofízis injekcióval kezelt csoport 5 egyedéből 4-nél tapasztaltuk ezt (20. ábra), és csupán 1 egyed maradt teljes (21. ábra). Ez, valamint a későbbi hasonló tapasztalatok azt a felvetést támasztják alá, hogy a hipofízis kezelés elősegíti a spermatogenezis folyamatát azokban az egyedekben, melyek nem estek át az ivarátfordulás folyamatán.

A szövettani metszetek vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az átalakuló ivarszerv státuszától függetlenül homogén, a dorzális, centrális, ventrális részeken azonos sejttálapotokat figyeltünk meg. Az eltérő fejlődési stádiumú sejtek egymástól elkülönülve, körkörös sávokba rendeződve találhatóak. Az átalakuló ivarszervben a herére és a petefészekre jellemző sejtípusokat nem választja el egymástól membrán, a működő herében megfigyelhetők ovocita-szerű sejtek, de ezek nem alakítanak ki ovarialis szövetet. A protoplazmás fejlődési szakaszban lévő ovociták a here ventrális oldalán találhatóak egyenként, vagy kisebb csoportokban. Átmérőjük átlaga 20 és 50 μm közötti érték. Az ivarszerv metszetek mikroszkópos vizsgálata során hermafrodita ivarszervet nem találtunk. Nagyobb számú minták feldolgozása esetén is csak ritkán találtak hermafrodita mintát, ugyanis az ivarváltás folyamata barramundiban gyorsan lezajlik (Moore, 1979). A folyamat 17 napnál kevesebb időt vesz igénybe (Guiguen et al, 1994).



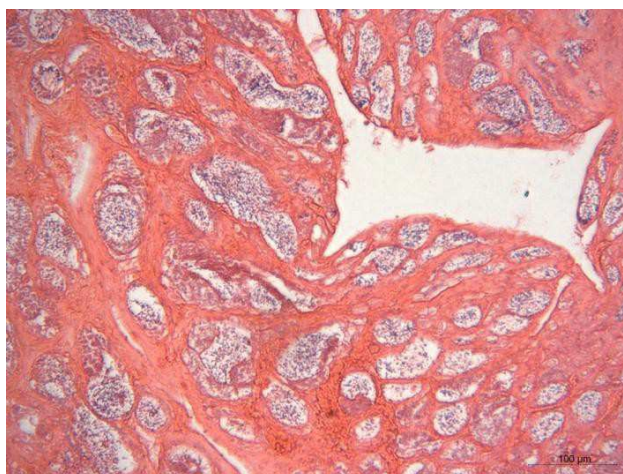
18. ábra: A kísérlet második hónapjában a kontroll csoportból származó 23 hónapos, ivar átforduláson keresztül ment hal petefészké. Az ivarszerv (T3) hasi oldalán a protoplazmás növekedési szakaszban lévő ovociták összefüggő rétegét látjuk. Az átlagos ovocita átmérő 20-25μm.



19. ábra: A kísérlet második hónapjában a kontroll csoportból származó 23 hónapos, ivar átforduláson keresztül ment egyed petefészké. Az ivarszerv (T3) hasi oldalán a protoplazmás növekedési szakaszban lévő ovociták összefüggő rétegét látjuk. Az átlagos ovocita átmérő 20-25μm.

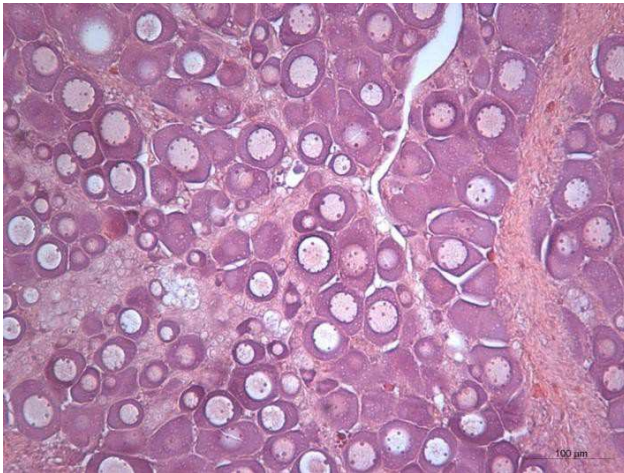


20. ábra: A kísérlet második hónapjában a hipofizált csoportból származó 23 hónapos, ivar átforduláson keresztül ment egyed petefészké. Az átlagos ovocita átmérő 20-25μm.

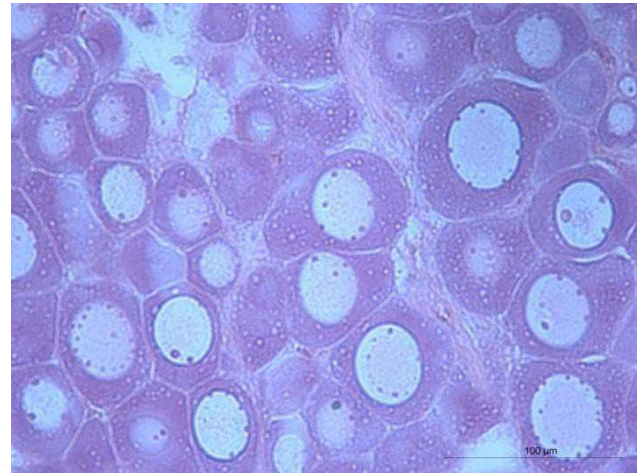


21. ábra: A kísérlet második hónapjában a hipofizált csoportból származó 23 hónapos, intenzív spermatogenezis stádiumában lévő egyed heréje.

A következő mintavételre a kísérlet negyedik hónapjában került sor, ekkor a halak 25 hónaposak voltak. A kontroll és a hipofizált csoporton kívül mintát vettünk 5, az árutermelő állományból származó hal ivarszervéből is összehasonlításképp. Azt tapasztaltuk, hogy a kontroll csoport továbbra is kizárólag ivarátforduláson átesett, ikrás egyedekből állt (22., 23. ábrák). A 22-23. ábrákon látható ivarszervek az átalakulás előrehaladott szakaszában vannak (T3). A sejtmagban egy sejtmagvacska található, a citoplazma erősen bazofil, a follikuláris tok egyrétegű.

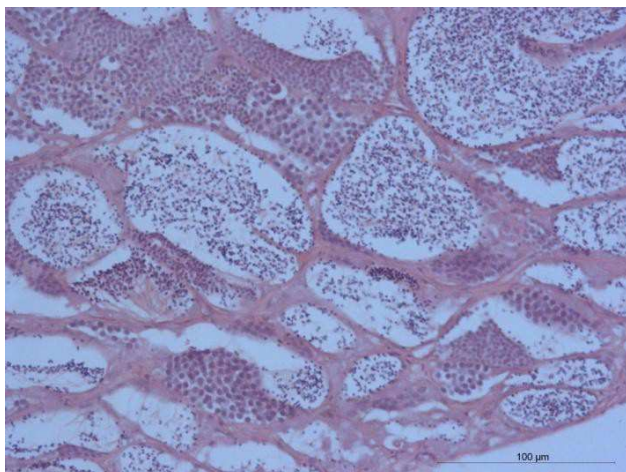


22. ábra: A kísérlet negyedik hónapjában a kontroll csoportból származó 25 hónapos egyed petefészke. Az ivarszerv ventrális oldalán protoplazmás növekedési szakaszban lévő ovociták összefüggő rétegét látjuk. Az átlagos ovocita átmérő 50-60 μm .

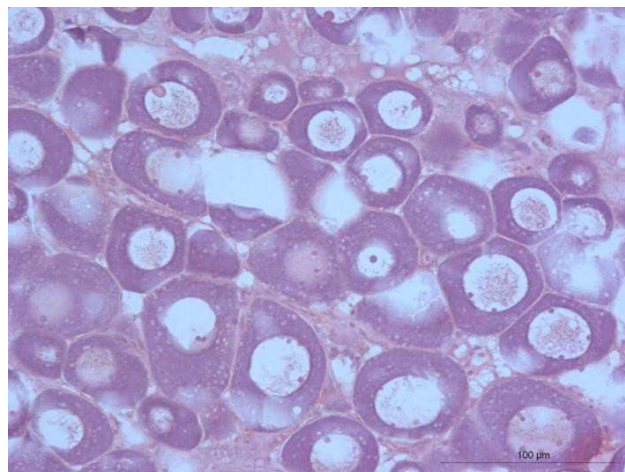


23. ábra: A kísérlet negyedik hónapjában a kontroll csoportból származó 25 hónapos egyed petefészke.

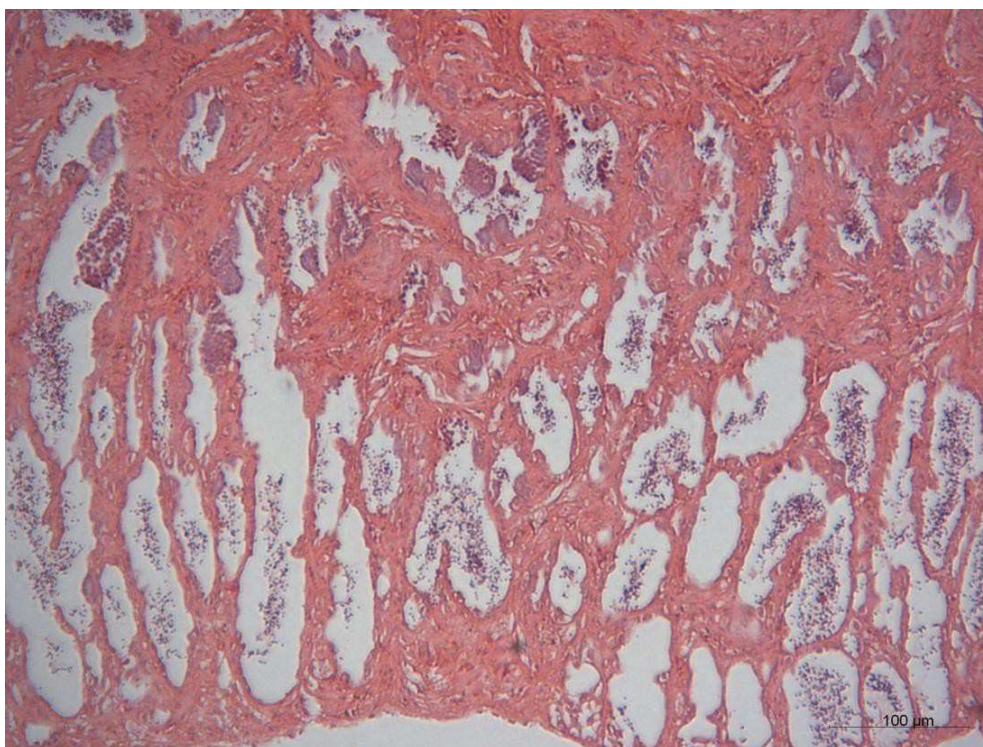
A hipofizált csoport 2 tejes (24. ábra) és 3 ikrás (25. ábra) egyedből állt. Ez a megfigyelés is alátámasztja azt az állítást, miszerint az ivarváltás nem szinkronizáltan megy végbe az állományban (Moore, 1979). Az árutermelő állományban kizárólag tejes egyedeket találtunk (26. ábra).



24. ábra: A kísérlet negyedik hónapjában a hipofizált csoportból származó 25 hónapos egyed heréje.

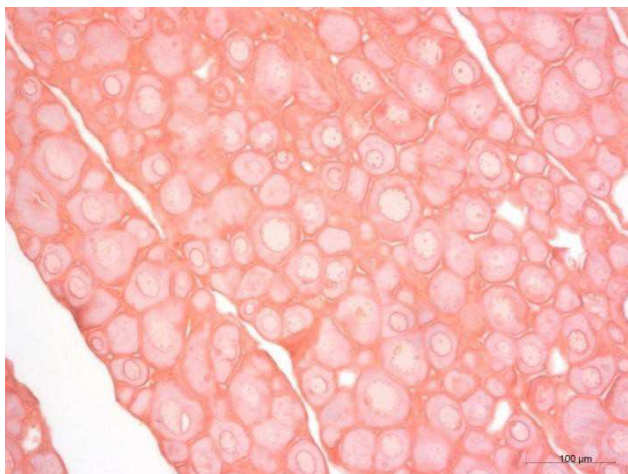


25. ábra: A kísérlet negyedik hónapjában a hipofizált csoportból származó 25 hónapos egyed petefészke.

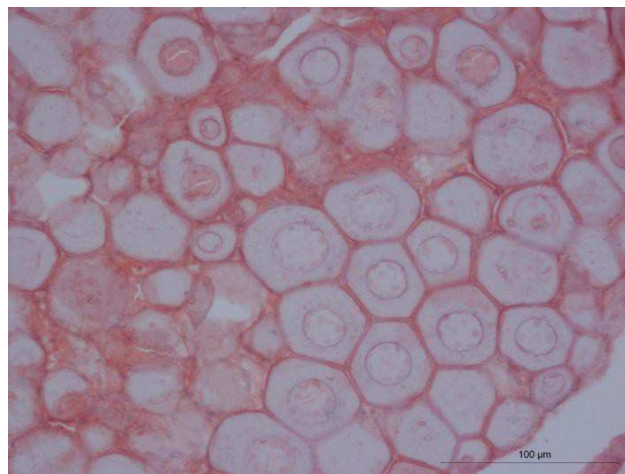


26. ábra: A kísérlet negyedik hónapjában az árutermelő medencéből származó 25 hónapos egyed heréje.

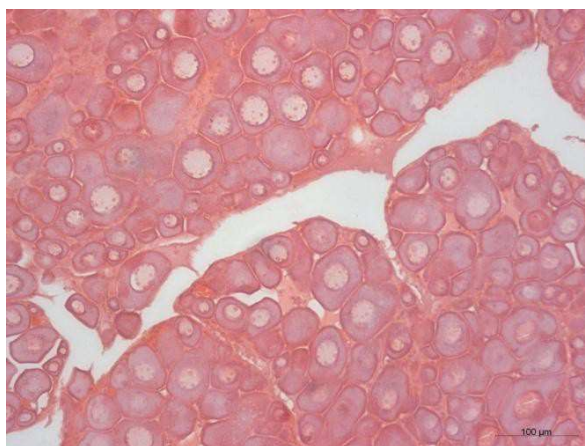
A kísérlet hatodik hónapjában szintén a két kísérleti csoportból és az árutermelő medencéből vettünk mintát, ekkor a halak 27 hónaposak voltak. Ekkorra a kontroll csoport (27., 28. ábra) és hipofizált (29. ábra) csoport mind a tíz egyede átesett az ivarátforduláson, kizárólag petefészkeket láttunk az ivarszervek szövettani metszetének mikroszkópos vizsgálatakor. Ezzel szemben az árutermelő medencében továbbra is kizárólag tejes egyedeket találtunk (30. ábra, 31. ábra).



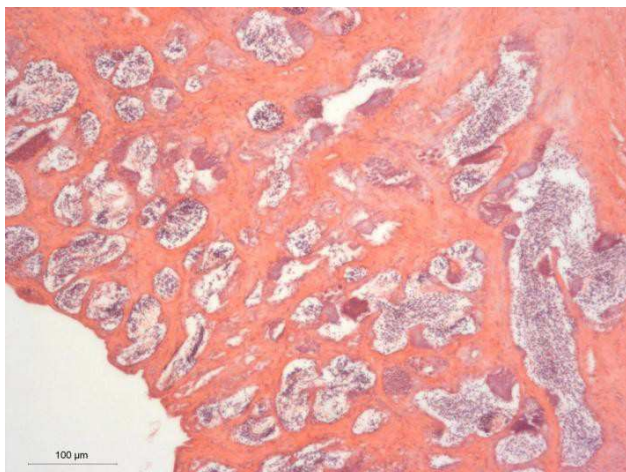
27. ábra: A kísérlet hatodik hónapjában a kontroll csoportból származó 27 hónapos egyed petefészke.



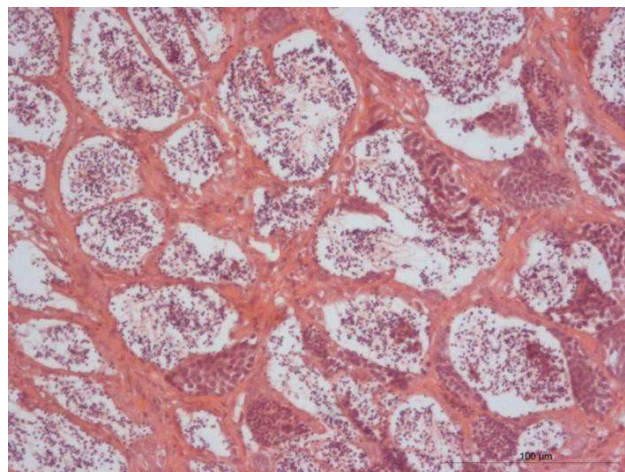
28. ábra: A kísérlet hatodik hónapjában a kontroll csoportból származó 27 hónapos egyed petefészke.



29. ábra: A kísérlet hatodik hónapjában a hipofizált csoportból származó 27 hónapos egyed petefészke.



30. ábra: A kísérlet hatodik hónapjában az árutermelő medencéből származó 27 hónapos, intenzív spermatogenezis stádiumában lévő egyed heréje.



31. ábra: A kísérlet hatodik hónapjában az árutermelő medencéből származó 27 hónapos, intenzív spermatogenezis stádiumában lévő egyed heréje.

A kísérlet első hónapjaiban a hormonálisan kezelt egyedek közül néhány esetében intenzívebbé vált a spermatogenezis, azonban az ivarátfordulás bekövetkeztét nem tudtuk megakadályozni a hipofízis injekciókkal. A kísérlet utolsó mintavételének idejére, azaz 27 hónapos korukra minden kísérleti egyed átesett az ivarváltás folyamatán. Az árutermelő medencéből kivett és szövettanilag megvizsgált halak mind tejesek voltak, nem indult meg az ivarátfordulás folyamata ezeknél az egyedeknél (9. táblázat).

Életkor	Kontroll (db)		Hipofizált (db)		Árutermelő medencéből kivett (db)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
21 hónapos	5	0	5	0		
23 hónapos	0	5	1	4		
25 hónapos	0	5	2	3	5	0
27 hónapos	0	5	0	5	5	0

9. táblázat: Az ikrások és a tejesek száma a vizsgált csoportokban.

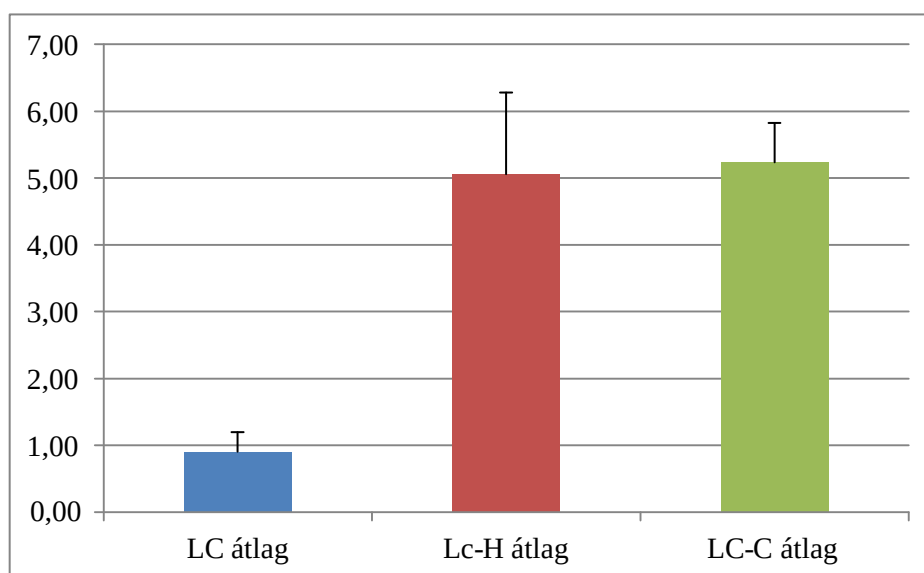
Az árutermelő állomány és a kísérleti állomány külön épületben volt elhelyezve, azonban az alkalmazott fényprogram (12 órás megvilágítás) és a víz paraméterei megegyeztek. Az egyetlen eltérés az állománysűrűség volt, amely az árutermelő medencében 60 kg/m³, a kísérleti medencében

pedig 6kg/m³ volt a kísérlet kezdetén, majd ez az érték folyamatosan csökkent (a mintavételekhez kivett egyedek miatt).

Az ivarszervek tömegét vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a 27 hónapos halaknál a kísérlet keretében áthelyezett egyedek (a hipofizált és a kontroll csoport egyaránt) nagyobb tömegű gonádokkal rendelkeztek, mint a kísérletbe be nem vont egyedek (10. táblázat, 32. ábra).

Jelölés	Gonád (g)	Jelölés	Gonád (g)	Jelölés	Gonád (g)
LC27 1	0,84	LC27-H 1	5,18	LC27-C 1	4,6
LC27 2	0,67	LC27-H 2	3,23	LC27-C 2	5,13
LC27 3	0,81	LC27-H 3	4,72	LC27-C 3	4,78
LC27 4	0,62	LC27-H 4	5,65	LC27-C 4	5,69
LC27 5	1,12	LC27-H 5	6,52	LC27-C 5	5,98
LC27 6	1,37				
LC átlag	0,91	Lc-H átlag	5,06	LC-C átlag	5,24
LC szórás	0,29	Lc-H szórás	1,22	Lc-C szórás	0,59

10. táblázat: Az ivarszerv tömegének megoszlása a csoportok között (LC27=árutermelő csoport egyedei, LC27-C=kontroll egyedek, LC27-H=hipofizált egyedek)



32. ábra: Az ivarszerv tömegének megoszlása a csoportok között (LC=árutermelő csoport egyedei, LC-C=kontroll egyedek, LC-H=hipofizált egyedek)

Kísérletünk hat hónapja alatt a kísérleti egyedek mindegyikében lezajlott az ivarváltás folyamata. A hipofízis kezelés néhány egyednél meghosszabbította a spermatogenezist. A halak ivarátfordulását feltehetően a kísérlet beállításakor megváltoztatott környezeti feltételek indukálták. Ezt támasztja alá az a tény, hogy az árutermelő medencéből vett minták mindegyike alapján a kísérletbe be nem vont halak tejesek voltak. Emellett érdemes megemlíteni a kísérleti halak ivarszervének megemelkedett tömegét, ami az ivaréérés előrehaladásának jele lehet.

4.2. Sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérlet eredményei

A második, sókoncentrációt növelő kísérletsorozat 2012 május 7-én kezdődött, az utolsó mintavétel 2012 június 18-án történt. A kísérlet eredményességét az mutatja, hogy fejhető, mozgásképes spermiumokat termelő hím egyedeket találtunk a 28 hónapos halak között, és az ivarszervek intenzív fejlődést mutattak (11. táblázat, 33., 34. ábrák).



33. ábra: 28 hónapos tejes barramundi fejése



34. ábra: Barramundi fejése

Jelölés	Testtömeg (g)	Teljes testhossz (cm)	Standard testhossz (cm)	Gonád tömeg (g)	Megjegyzés
BC01 BC02 BC03	2570	55,50	49,00	2,15	mozgó sperma
BC04	2060	52,00	46,00	1,00	fejhető hím, mozgó sperma
BC05 BC06 BC07 BC08 BC09 BC10 BC11	1960	53,00	46,50	1,05	mozgó sperma
BC12 BC13	2270	53,00	47,00	0,70	fejhető hím, mozgó sperma
BC14	1950	51,50	45,50	2,85	fejhető hím, mozgó sperma

11. táblázat: A sókoncentráció növelésének hatása a 28 hónapos állományra

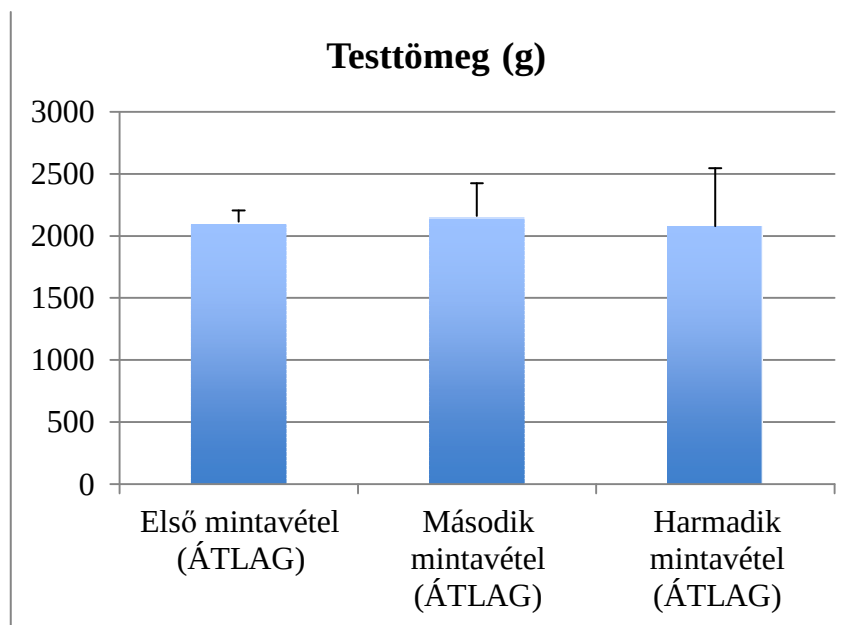
Jelölés	Testtömeg (g)	Teljes testhossz (cm)	Standard testhossz (cm)	Gonád tömeg (g)	Megjegyzés
BC02 BC03	2610,0	55,6	50,5	1,7	nem fejhető, sperma van
BC06 BC07	1860,0	50,0	45,0	1	nem fejhető, kevés sperma
BC08 BC09 BC10	1650,0	52,0	46,0	0,63	nem fejhető
BC11	1720,0	48,0	43,0	1,77	nem fejhető, sperma van
BC13	2560,0	54,5	48,5	0,56	nem fejhető, kevés sperma

12. táblázat: A sókoncentráció növelésének hatása a 29 hónapos állományra

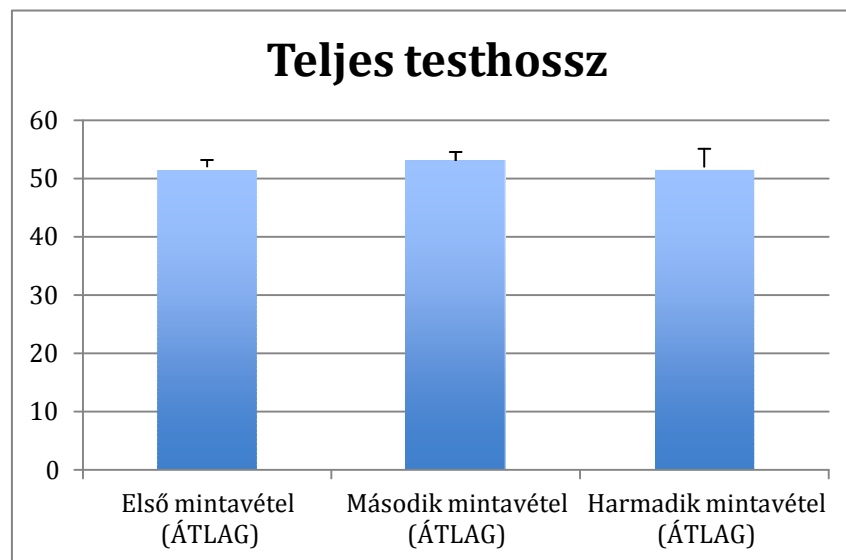
A piros színnel jelölt egyedek elhullottak a kísérlet ideje alatt. Az elhullások mellett a halak egészségi állapotának romlását, testtömeg gyarapodásuk csökkenését (11., 12., 13. táblázat, 35., 36. ábrák), majd az utolsó mintavétel során az ivarszervek visszafejlődését tapasztaltuk. A 29 hónapos halak a 28 hónapos halakkal ellentétben már nem adtak kézzel fejhető tejet, és a here szövettani vizsgálatakor is kevésbé aktív spermatogenezist tapasztaltunk, mint az egy hónappal korábbi szövettani mintáknál. Ennek a halak állapotára gyakorolt negatív hatásnak az oka valószínűsíthetően a sókoncentráció túlzottan gyors növelése által okozott stresszhatás.

	Testtömeg (g)	Teljes testhossz	Standard testhossz
Első mintavétel (ÁTLAG)	2114	51,9	46,1
Szórás	92,09	1,29	1,14
Második mintavétel (ÁTLAG)	2162	53	46,8
Szórás	261,86	1,54	1,35
Harmadik mintavétel (ÁTLAG)	2080	52	46,6
Szórás	467,5	3,1	2,9

13. táblázat: A halak testparamétereinek változásai a mintavételek során

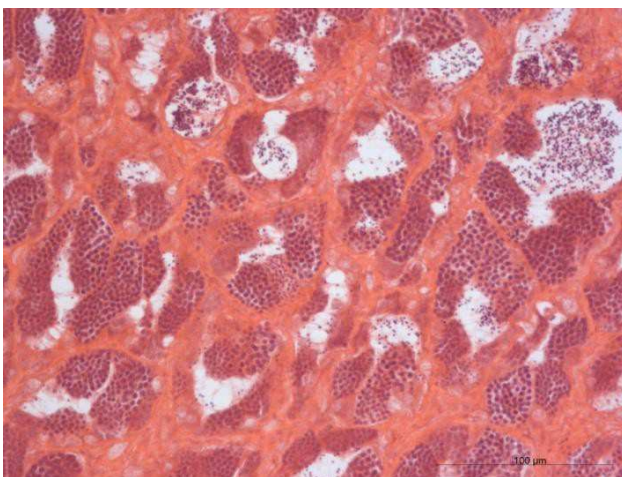


35. ábra: A kísérleti halak testtömegének változása a mintavételek során

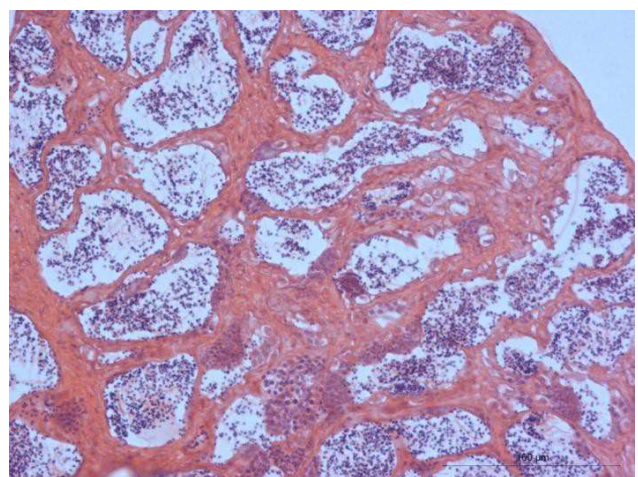


36. ábra: A kísérleti halak testtömegének változása a mintavételek során

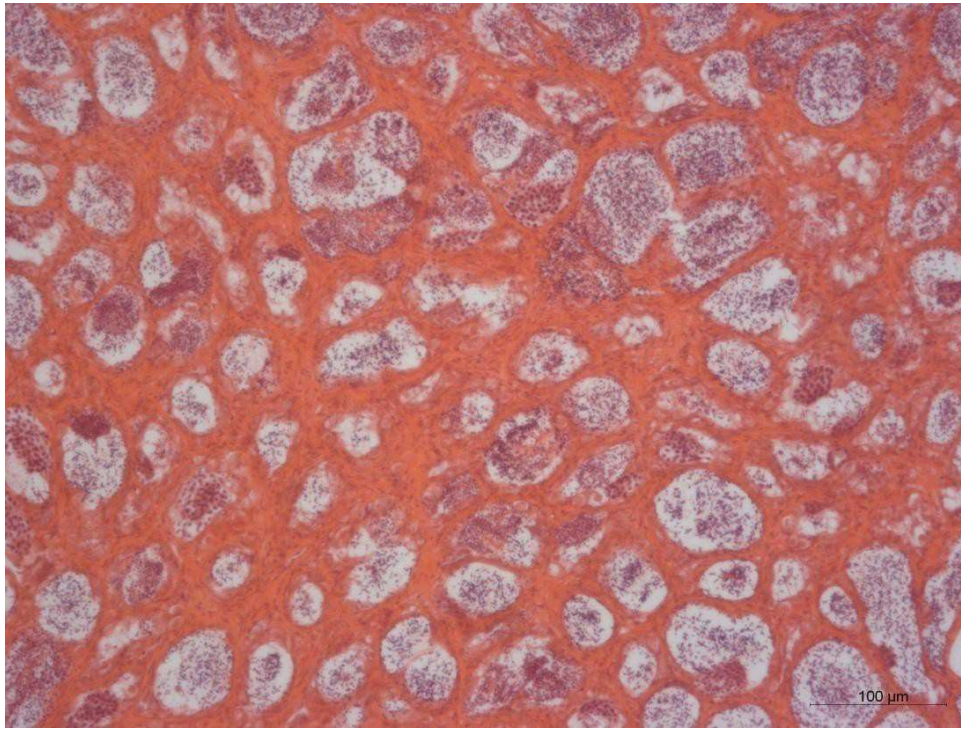
A 37. ábrán látható az első mintavételből származó here szaporodásbiológiai státusza, amely az M2 kategóriába tartozik Guiguen besorolását alapul véve (Guiguen et al, 1994). A herében a spermatocitákat és a spermatidákat tartalmazó ciszták vannak többségben, de megfigyelhetünk érett spermiumokat is. A 38. ábrán egy másik metszet látható, ebben a herében már kevesebb a spermatocita és a spermatida, az érett spermiumokat tartalmazó üregek vannak többségben. A 39. ábrán hasonló stádiumú here látható, kisebb nagyításban.



37. ábra: A sókoncentráció növelése utáni első mintavételből származó here (M2) metszete.

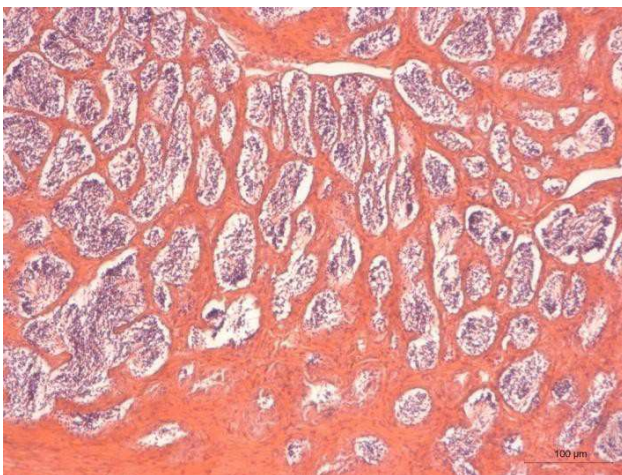


38. ábra: A sókoncentráció növelése utáni első mintavételből származó here metszete.

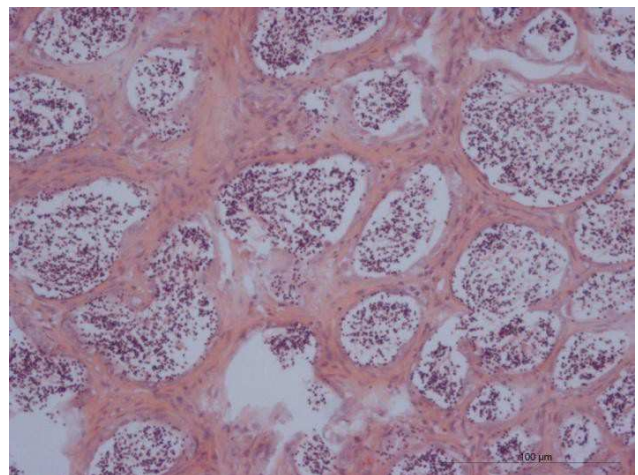


39. ábra: A sókoncentráció növelése utáni első mintavétel. A metszeten egy 27 hónapos hal heréje látható.

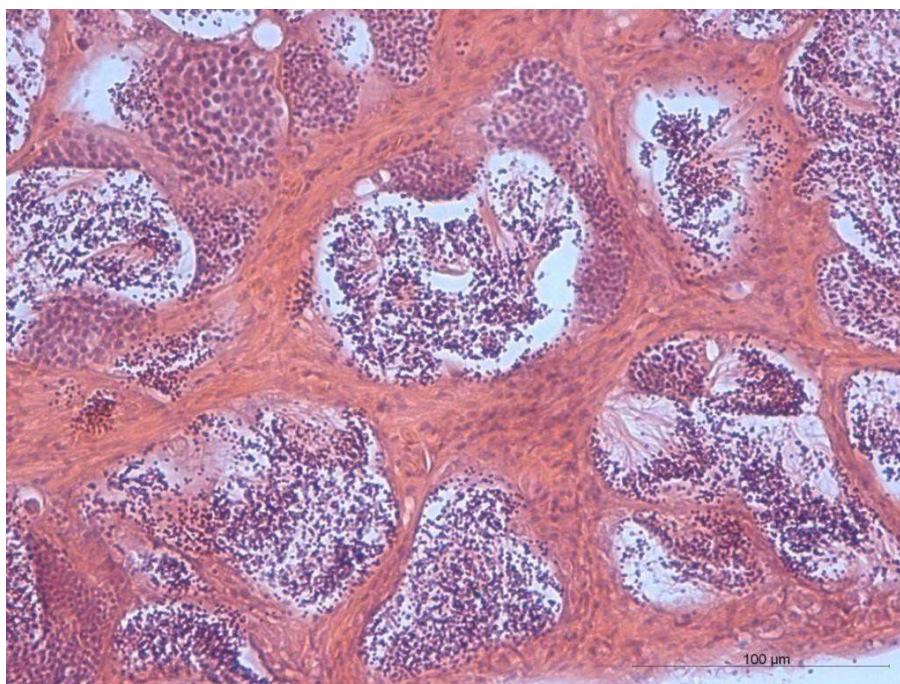
A második mintavétel során készült metszeteket a 40-41-42. ábrák szemléltetik.



40. ábra: A sókoncentráció növelése utáni második mintavétel. A metszeten egy 28 hónapos hal heréje látható.



41. ábra: A sókoncentráció növelése utáni második mintavétel. A metszeten egy 28 hónapos hal heréje látható.



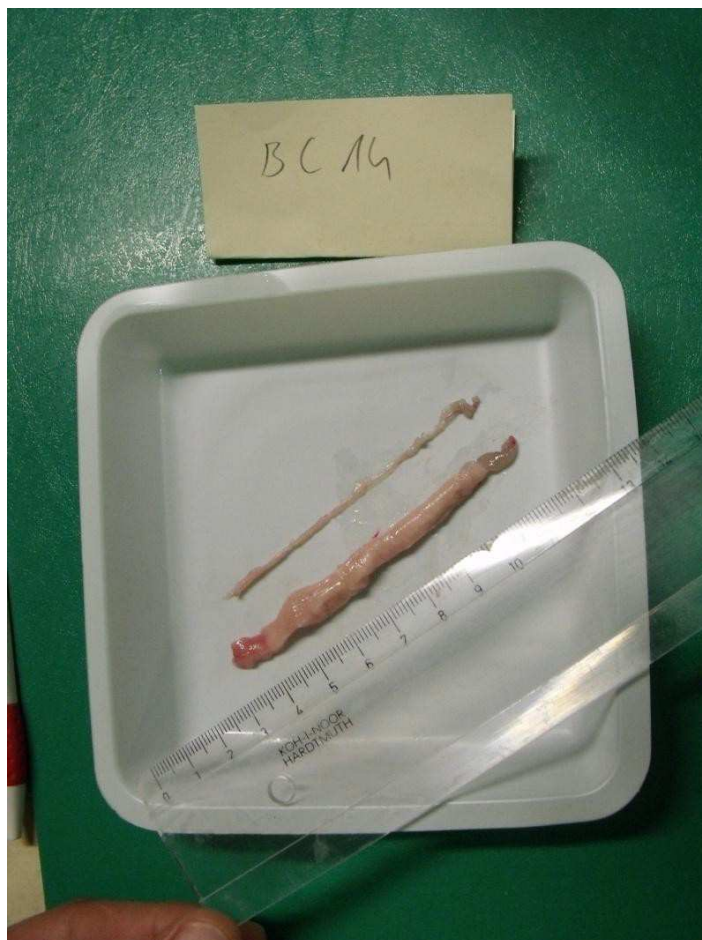
42. ábra: A sókoncentráció növelése utáni második mintavétel. A metszeten egy 28 hónapos hal heréje látható. A herecsatornácskákban érett spermiumok láthatók, emellett megfigyelhetők spermatociták és spermatidák csoportjai is.

A 13. táblázat adataiból látható, hogy a sókoncentráció növelése olyan stresszt okozott a halaknak, amitől nem az elvárások szerint alakult a testparamétereik növekedése.

Első mintavétel				Második mintavétel			
Jelölés	Testtömeg (g)	Teljes testhossz (cm)	Standard testhossz (cm)	Jelölés	Testtömeg (g)	Teljes testhossz (cm)	Standard testhossz (cm)
BC01	2250	54	48	BC01	2570	55,5	49
BC04	2050	50,5	45	BC04	2060	52	46
BC05	2010	52	46	BC05	1960	53	46,5
BC12	2130	51,5	46	BC12	2270	53	47
BC14	2130	51,5	45,5	BC14	1950	51,5	45,5
ÁTLAG	2114	51,9	46,1	ÁTLAG	2162	53,00	46,8
Szórás	92,09	1,29	1,14	Szórás	261,86	1,54	1,35

14. táblázat: A kísérleti állomány öt egyedének testparaméter változása a kísérlet során.

Érdekes tapasztalat volt, hogy az egyik hal (BC14-es jelölésű egyed) két ivarszerve között jelentős méretbeli különbség volt, a jobb oldali gonád 2,48 g, a bal oldali 0,22 g tömegű volt (43. ábra).



43. ábra: A BC14 jelölésű egyed ivarszervei. Jelentős aszimmetria figyelhető meg a két here között.

5. Értékelés és következtetések

A hipofízis injektálás hatását vizsgáló kísérlet eredményeképpen megállapíthatjuk, hogy a kezelés elősegítette a spermatogenezist, mivel előrehaladottabb érési stádiumokat figyeltünk meg a kezelt halak ivarszervének külalakját és szövettani metszetét vizsgálva, mint az árutermelő állományból vizsgálatra kivett teljes egyedek esetében. Emellett a hipofízissel kezelt csoport egyedei később alakultak át ikrásokká, mint a kontroll halak. A kontroll csoport minden egyedében a kísérlet beállítása utáni második hónapra végbe ment az ivarátfordulás, ez alapján érdemes lenne további vizsgálatokat folytatni az állománysűrűség szaporodásbiológiai állapotra gyakorolt hatásával kapcsolatban, mivel ez volt az egyetlen olyan tényező, amelyben nem egyeztek a kísérleti medence és az árutermelő medence paraméterei.

A vizsgált ivarszervek alapján megerősítettük más szerzők azon megfigyelését, miszerint az ivarérés mesterséges tartáskörülmények között gyorsabban végbe megy a halakban, mint ahogy azt a természetes vizekben megfigyelték. Emellett kijelenthetjük, hogy az ivarváltás édesvízi mesterséges tartásban is bekövetkezik.

A sókoncentráció növelésének hatását vizsgáló kísérletet érdemes lenne megismételni, a vízben oldott só mennyiségének lassabb növelésével, nagyobb egyedlétszámmal. A sókoncentráció lassabb ütemű növelése feltehetőleg kisebb stresszhatás lenne a halak számára, így az egészségi állapotukra sem jelentene komoly terhelést. Mivel a magasabb sókoncentrációjú medencében nevelt egyedek között több olyan egyed is találtunk, amely fejhető tejet adott, feltehetőleg ezzel a módszerrel elő lehetne állítani hímekeket a keltetőházi szaporításhoz.

Érdemes lenne megállapítani összefüggéseket a környezeti tényezők változása (például hipofízis injekció, növekvő sókoncentráció a vízben, csökkenő állománysűrűség) és a kísérleti halak vérparamétereinek és hormonszintjeinek változásával kapcsolatban, a barramundi szaporodásbiológiájának jobb megismerése érdekében.

6. Összefoglalás

A dolgozatban a protandriás ivarváltó barramundi (*Lates calcarifer*) halfaj ivaréret és ivarátfordulását vizsgáltuk szövettani módszerekkel olyan kísérletek keretében, melyek célja a spermatermelés stimulációja volt.

A kísérleti állomány 21-27 hónapos életkorú egyedekből állt, melyeket meleg vizes (27 °C) recirkulációs rendszerben neveltek Jászkiséren. Hat hónapon keresztül 15 kísérleti egyed hetente kezeltünk hormonálisan ponty hipofízis oldat injekcióval, és a gonádokat fixáltuk szövettani vizsgálat céljából. A halak testhosszát (cm) és testtömegét (g) rögzítettük a kezelt és a kontroll csoport esetében is.

A kísérlet ideje alatt a hormonálisan kezelt egyedek intenzív spermatogenezis stádiumába kerültek, míg a kontroll csoportnál beindult az ivarváltás, és a kísérlet második hónapjának végére minden kontroll csoportba tartozó egyed ikrás lett. A kezelt csoportba tartozó halak kis százaléka hímivarú maradt, ezeknél megnövekedett spermatermelést figyeltünk meg a kísérlet első négy hónapja alatt, ám a kezelések végére minden egyed átesett az ivarátfordulás folyamatán. Az eredeti tartáskörülmények között nevelt halaknál csak a spermatogenezis korai stádiumai voltak megfigyelhetők.

Az eredmények azt mutatják, hogy az ivarátfordulás a korábban leírtaknál hamarabb elkezdődik az édesvízi recirkulációs rendszerben, ez a tartási körülmények megváltoztatásával magyarázható. A hormonális kezelés megnövelte és fenntartotta a spermatermelést egy ideig, de nem tudta megakadályozni az ivarátfordulás bekövetkezését.

A spermatermelés indukálására egy újabb kísérletet kezdeményeztünk. Ebben magasabb sókoncentrációjú vízbe helyeztünk halakat, és figyeltük az ivarszervek fejlődését. A sókoncentráció emelése egy hónap kezelés után az ivarszervek intenzív fejlődését eredményezte, azonban a kísérlet befejezésére nem volt lehetőségünk, az egyedek egészségi állapotának leromlása miatt.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni konzulenseimnek, Szentes Katalinnak, Dr. Horváth Ákosnak és Dr. Szabó Tamásnak a dolgozat elkészítése során nyújtott segítségüket. Köszönöm Dr. Urbányi Béla tanszékvezetőnek, hogy lehetővé tette munkámat a tanszéken, és Kurnász-Mészáros Erikának, hogy segítséget nyújtott a szövettani vizsgálatok során.

Köszönettel tartozom továbbá a Jászkiséri Halas Kft. tulajdonosának, Borbély Gyulának, és Csorbai Balázsnak, a telep vezetőjének, hogy hozzájárultak kísérleteink lebonyolításához, valamint a telep dolgozóinak a vizsgálatok során nyújtott segítségükért.

8. Nyilatkozat

Alulírott Kása Eszter, a Szent István Egyetem Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar Mezőgazdasági Biotechnológus MSc szak hallgatója nyilatkozom, hogy a TDK dolgozat a saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy a dolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Környezet- és Tájjgazdálkodási Intézet honlapjára.

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

Gödöllő, 2012. október hó 25. nap

.....

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a TDK dolgozatot áttekintettem, a felhasznált irodalmat a hallgató korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezelte.

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

Gödöllő, 2012. október hó 25. nap

.....

témavezető aláírása

9. Irodalomjegyzék

Almendras, J.M., Duenas C., Nacario J., Sherwood N. M., Crim L. W. (1988): Sustained Hormone Release. III. Use of Gonadotropin Releasing Hormone Analogues to Induce Multiple Spawns in Sea Bass, *Lates Calcarifer*. *Aquaculture*, 74 (1988), 97-111.

Borbély Gy., Csorbai B. (2010): A barramundi, mint új faj, tenyésztés-technológiájának első tapasztalatai. HAKI, Magyar-orsz-cseh workshop az intenzív akvakultúráról

Davis, T. L. O. (1982): Maturity and Sexuality in Barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), in the Northern Territory and South-eastern Gulf of Carpentaria. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 1982, 33., 529-45.

Davis, T. L. O. (1984): A population of sexually precocious barramundi, *Lates calcarifer* in the Gulf of Carpentaria, Australia. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, Issue 1., 144-149.

Davis, T. L. O. (1987): Biology of wildstock *Lates calcarifer* in northern Australia. *Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi (Lates calcarifer)* 22-29.

Fehér M., Stündl L., Szűcs I., Borbély Gy., Bársony P. (2011): A barramundi (*Lates calcarifer*) mint új halfaj a magyar akvakultúrában. *Pisces Hungarici* 5.

Garcia, L. M. B. (1989): Development of an ovarian biopsy technique in the sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, Volume 77, Issue 1, 15 February 1989, Pages 97–102.

Garcia, L. M. B. (1992): Lunar synchronization of spawning in seabass, *Lates calcarifer* (Bloch): effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) treatment. *J. Fish Biol.* 40: 359-370.

Garrett, R. N., O'Brien, J. J. (1994): All-year-around spawnings of hatchery barramundi in Australia. *Austasia Aquaculture* 8, 40-42.

Guiguen Y., Cauty C., Fostier A., Fuchs J., Jalabert B. (1994): Reproductive cycle and sex inversion of the seabass, *Lates calcarifer*, reared in sea cages in French Polynesia: histological and morphometric description. *Environmental Biology of Fishes* 39, 231-247.

Horváth L. (2000): Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda kiadó, Budapest. 439 p

Katersky, R. S., Carter, C. G. (2007). A preliminary study on growth and protein synthesis of juvenile barramundi, *Lates calcarifer* at different temperatures. *Aquaculture* 267, 157–164.

Krutsay M. (1980): Szövevényi technika. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 201. old. ISBN: 9632406885 Kungvankij P., B.J. Pudadera, L.B. Tiro and I.O. Potestas, (1986): Biology and culture of sea bass (*Lates calcarifer*) NACA Training Manual Series No. 3 Network of Aquaculture Centres in Asia (NACA) Regional Lead Center in the Philippines (RLCP). 1-70.

Linhart O., Peter R. E., Rothbard S., Zohar Y., Kvasnička P. (1995): Spermiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract. *Aquaculture*, Volume 129, Issues 1–4, January 1995, Pages 119–121.

Maneewong S., (1986): Induction of spawning of sea bass (*Lates calcarifer*). pp116-119. In : ACIAR Workshop on Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi (*Lotes calcarifer*). Darwin, Australia, 24 Sept.-1 Oct. 1986.

Marte, C. L. (1989): Hormone-induced spawning of cultured tropical finfishes. *ADVANCES IN TROPICAL AQUACULTURE. Tahiti, Feb. 20 - March 4 1989 AQUACOP 1 FREMER Acres de Colloque* 9 pp. 519 F39

McDougall, A. (2004): Assessing the use of sectioned otoliths and other methods to determine the age of the centropomid fish, barramundi (*Lates calcarifer*) (Bloch), using known-age fish. *Fisheries Research* 67.129–141.

Moore, R. (1979): Natural sex inversion in the giant perch (*Lates calcarifer*). *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 30. 803-13.

Ross, R. M. (1990): The evolution of sex-change mechanisms in fishes. *Env. Biol. Fish.* 29: 81-93.

Szentes K., Mészáros E., Szabó T., Csorbai B., Borbély G., Bernáth G., Urbányi B., Horváth Á. (2012): Gonad development and gametogenesis in the Asian sea bass (*Lates calcarifer*) grown in an intensive aquaculture system. *J. Appl. Ichthyol.* (2012), 1–3

Toledo, J. D., Marte, C. L., Castillo, A. R. (1991): Spontaneous maturation and spawning of sea bass *Lates calcarifer* in floating net cages. Journal of Applied Ichthyology, Volume 7, Issue 4, pages 217–222.

Internetes hivatkozások:

1. <http://www.fishbase.org/summary/Lates-calcarifer.html> (2012. 08.27.)
2. <http://www.aquafarmer.com.au/Fish%20Farming%20Hatchery%20Requirments.html> (2012. 10. 08)
3. <http://www.madan.co.il/Htmls/product.aspx?C1010=12542&BSP=12420> (2012. 08. 27.)