10.14751/SZIE.2016.014

SZENT ISTVÁN EGYETEM

A HALSPERMA MINŐSÍTÉSI RENDSZERÉNEK GAZDASÁGI CÉLÚ FEJLESZTÉSE

Doktori értekezés

Bernáth Gergely

Gödöllő

2016

10.14751/SZIE.2016.014

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, MTA levelező tagja

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Horváth Ákos

tudományos főmunkatárs

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Halgazdálkodási Tanszék

……. …….

A programvezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

10.14751/SZIE.2016.014

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS 7

1.1. Célkitűzések 8

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 9

2.1. A halak ivarszervei és -sejtei 9

2.1.1. A here felépítése, típusai 9

2.1.2. A hímivarsejtek kialakulása 9

2.1.3. A petefészek felépítése, típusai 10

2.1.4. A petesejtek kialakulása és érése 10

2.1.5. A spermiumok felépítése 12

2.1.6. Termékenyülés és termékenyítés 13

2.2. A halsperma mélyhűtése és minősítése 14

2.2.1. A mélyhűtés fizikai-biológiai alapjai 14

2.2.2. A spermamélyhűtés folyamata 15

2.2.3. A sperma gyűjtése és hűtés előtti tárolása 15

2.2.4. A hűtőmédium és ekvilibráció 15

2.2.5. A spermaminőség és vizsgálata 16

2.2.6. A sejtkoncentráció mérése 16

2.2.7. A sperma morfológiai vizsgálata 17

2.2.8. A spermiumok membrán-integritásának és a DNS-töredezettségének vizsgálata 17

2.2.9. A spermiumok energiakészletének vizsgálata 18

2.2.10. A spermamotilitás és vizsgálata 18

2.2.11. Mélyhűtés és tárolás 22

2.2.12. Felolvasztás 23

2.3. A spermamélyhűtés és –minősítés eredményei különböző rendszertani csoportokban 24

2.3.1. Spermavizsgálat és -mélyhűtés eredményei tokalakúakban 24

2.3.2. Spermavizsgálat és- mélyhűtés eredményei sügérfélékben 25

2.3.3. Spermavizsgálat és -mélyhűtés eredményei pontyfélékben 26

2.3.4. Spermavizsgálat és -mélyhűtés eredményei lazacfélékben (Salmonidae) 28

2.4. A spermamélyhűtés, valamint a sperma-minőségvizsgálat egységesítése és jövéje 30

3. MÓDSZEREK, EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK A VIZSGÁLT RENDSZERTANI CSOPORTOKBAN 33

3.1. A spermavizsgálat és -mélyhűtés részfeladatainak általános összefoglalása 33

3.2. Vizsgálatok tokfélékben (*Acipenseridae*) 34

3.2.1. A tokfélékben végzett vizsgálatok eredményei 36

3.2.2. A tokfélékben kapott eredmények értékelése 39

3.3. Vizsgálatok a sügér fajban (*Perca fluviatilis*) 40

3.3.1. A sügérsperma minőségvizsgálatának és mélyhűtésének optimalizációja 40

3.3.2. Két spermamélyhűtési módszer összehasonlítása a sügér fajban 44

3.3.3. Nagy mennyiségű ívási időszakon kívül lefejt sügérsperma mélyhűtése 45

3.3.4. A sügér fajban végzett vizsgálatok eredményei 48

3.3.5. A sügérben végzett vizsgálatok eredményeinek értékelése 57

3.4. Pontyfélékben (*Cyprinidae*) végzett vizsgálatok 60

3.4.1. A pontysperma (Cyprinus carpio) mélyhűtésének sztenderdizációja 60

3.4.2. Különböző aranyhal változatok (Carassius auratus) spermáján végzett kísérletek 64

3.4.3. Pontyfélékben végzett vizsgálatok eredményei 68

3.4.4. A ponytfélékben kapott eredmények értékelése 73

3.5. Vizsgálatok lazacfélékben (*Salmonidae*) 77

3.5.1. A sebes pisztrángban (Salmo trutta* m. *fario) végzett vizsgálatok 77

3.5.2. A márványpisztrángban (Salmo marmoratus) végzett vizsgálatok 78

3.5.3. Az adriai pérben (Thymallus thymallus) végzett vizsgálatok 79

3.5.4. Lazacfélékben végzett vizsgálatok eredményei 82

3.5.5. A lazacfélékben kapott eredmények értékelése 85

3.6. Új tudományos eredmények 87

3.7. Javaslatok 88

4. ÖSSZEFOGLALÁS 89

5. SUMMARY 93

6. IRODALOMJEGYZÉK (MELLÉKLET) 97

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 111

Rövidítések jegyzéke

Teljes név	A szövegben használt rövidítés
Bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)	BSA
Computer-assisted Sperm Analysis (számítógépes spermavizsgáló rendszer)	CASA
Controlled-rate freezer (programozható mélyhűtő berendezés)	CRF
Curvilinear velocity (sebesség)	VCL
Desztillált víz	Dv
Hank's Balanced Salt Solution (Hank's féle sóoldat)	HBSS
Horváth et al. módszer (Horváth et al. 2012)	Hm
Human chorionic gonadotropin	hCG
Lahnsteiner et al. módszer (Lahnsteiner et al. 1996d)	Lm
Lahnsteiner-féle általános sügér aktiválóoldat (Lahnsteiner 2011b)	Sa
Módosított Lahnsteiner-féle aktiváló olda (Lahnsteiner 2011b)	La
Módosított Lahnsteiner-féle immobilizáló oldat (Lahnsteiner 2011b)	Li
Módosított pér hígító	MPh
Módosított Tanaka hígító (Szabó et al. 2005)	Th
Nynca et al. módszer (Nynca et al. 2015b)	Nm
Pér hígító (Horváth et al. 2012)	Ph
Ponty szeminális folyadék	Szf
Módosított pontyfélék aktiválóoldat (Saad et al. 1988)	Pa
Progressive motility (progresszív motilitás)	pMOT
Propídium-jodid	PI
Straightness (egyenesség)	STR
Woynárovich oldat (Woynárovich és Woynárovich 1980)	Wo

10.14751/SZIE.2016.014

1. BEVEZETÉS

A halsperma-mélyhűtés a genetikai tartalékok megőrzése és a gyakorlati állattenyésztés során egyaránt nagyon fontos biotechnológiai eljárás. A sperma fagyasztásos tárolásának számos előnye lehet, pl. az aszinkron gametogenezis során mind a két ivarban a legjobb minőségű ivarterméket használhajtuk, egyszerűsítheti a termelést, lehetővé teszi az ivarsejtek szállítását és kereskedelmét, segíti a veszélyeztetett fajok megmentését, a genetikai szelekciót és irányított tenyésztést, valamint a génbankok létrehozását (Cabrita et al. 2010). A halak esetében az első sikeres spermamélyhűtés egyidős más háziállatokéval, ám míg a nagytestű emlősök körében az elmúlt több mint 50 évben a módszer sok (szóismétlés miatt) millárd dolláros üzletággá nőtte ki magát, addig a halak esetében a gyakorlati alkalmazás továbbra is várat magára.

A mélyhűtés gazdaságosságának növelése és sikeres alkalmazásának egyik alapfeltétele a módszerek fejlődése (Tiersch 2008). Az egységes módszertan hiánya, a közölt metodikák gyenge ismételhetősége súlyos akadálynak bizonyul a sperma manipulációjával járó technikák (pl. a mélyhűtés) elterjedésében a halgazdálkodási gyakorlatban (Cabrita et al. 2010, Tiersch 2008). Az eredményeket egy egységes rendszerbe kell beépíteni, amely a szaporodásbiológiai és genetikai információt egyaránt magába foglalja. A rendszer részét kell, hogy képezze a minták hosszú távú hatékony és szelektív tárolása, valamint azok minőségének ellenőrzése. Infrastruktúra fejlesztés keretében adatbázisok és tároló állomások létrehozásával mindenki számára elérhetővé válhat ez a szolgáltatás. A folyamatban fontos szerepe lehet a kutatómunka mellett a gyakorlati szakemberek képzésének. A módszerek elterjedésének és gyakorlati alkalmazásának elengedhetetlen feltétele az anyagi háttér megteremtése (Tiersch 2008). A nemzetközi menedzsment, támogatási rendszerek és pénzügyi alapok nagyban meggyorsíthatják a sztenderdizációs folyamatot világszerte.

1.1. Célkitűzések

Kutatásom során a következő kísérletek megvalósítását tűztem ki célul:

1. A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata természetvédelmi és gazdasági szempontból egyaránt jelentős lénai tok (*Acipenser baerii*) és vágótok (*Acipenser gueldenstaedtii*) fajokban.
2. A sügérsperma minőség-vizsgálatának és mélyhűtésének optimalizációja.
3. A pontysperma (*Cyprinus carpio*) mélyhűtésének sztenderdizációja.
4. A sperma tárolhatóságának vizsgálata, és mélyhűtése különböző aranyhal változatokban.
5. A sebes pisztráng (*Salmo trutta* m. *fario*) és márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) mélyhűtött spermájában a felolvasztás utáni tárolhatóság vizsgálata, illetve az utóbbi faj esetében a metanol és dimetil-szulfoxid (DMSO), mint védőanyagok összehasonlítása. A felolvasztási utáni sperma-ikra arány meghatározása és különböző spermamélyhűtési módszerek összehasonlítása az adriai pénzes pérben (*Thymallus thymallus*).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A halak ivarszervei és -sejtei

2.1.1. A here felépítése, típusai

A halak hím ivarszerve a here. A herét két fő részre oszthatjuk, az ott található sejtek, valamint az általuk betöltött funkció alapján (Callard 1991, Grier 1993). Az intersticiális, kötőszövetes állomány szolgálja a here vérellátását, találhatók itt myoid sejtek és az androgéneket kiválasztó Leydig-féle sejtek. A myioid sejtek nem egybefüggő simaizomszövetet képeznek a here másik fő régiója, a csírahám körül (Grier 1993). A simaizom összehúzódásaival a spermiumok kijuttatását segíti elő az ívási időszak során (Grier és Neidig 2011). A spermatogenezis és az érett spermiumok tárolása egyaránt a csírahámban folyik (Grier 1993, Grier és Taylor 1998). A csírahám morfológiai sajátosságai alapján kétféle heretípust különíthetünk el a halakban: a csöves és lebenyes herét. A csöves herében a csírahám egy egybefüggő térhálós rendszert alkot. A perifériкus régióban a csírahám hurkokat képez, így kapcsolódva vissza a csöves rendszerbe (Grier és Neidig 2011). Ezt a heretípust találhatjuk meg az alacsonyabb rendű (*Protacanthopterygii*, *Clupeomorpha*, *Ostariophysi*) csontos halakban (*Osteichthyes*) [pl. pontyfélék-*Cyprinidae*, harcsafélék-*Siluridae*, csukafélék-*Esocidae*, lazacfélék-*Salmonidae* (Grier 1993)]. Közülük, számos fajt már évszázadok óta tenyésztenek (pl. aranyhal-*Carassius auratus*), mások pedig kedvelt sporthalak (szivárványos pisztráng-*Oncorhynchus mykiss*, csuka-*Esox lucius* stb.) (Grier és Neidig 2011). A magasabb rendű (tüskésúszójúak öregrendje-*Acanthopterygii*) csontos halak esetében a csíraállomány lebenyekbe rendeződik, amelyek vakon végződnek a here perifériáján (pl. sügéralakúak-*Perciformes*) (Grier és Taylor 1998). Mindkét heretípusban a csírahámban helyezkednek el a Sertoli- és ősivarsejtek, melyek a spermiumok képződésében játszanak kulcsszerepet. Ebben a régióban zajlik a spermiumok kialakulása (spermato- és spermiogenezis) és tárolása (Jamieson 1991). A Sertoli-sejtek teljesen körülveszik a fejlődő ivarsejteket, segítik a tápanyagtranszportot, fagocitálják a spermiogenezis végén visszamaradt spermiumokat (Szabó et al. 2000).

2.1.2. A hímivarsejtek kialakulása

A hímivarsejtek kialakulásának folyamata a spermatogenezis, ami a csírahám szövetében megy végbe. A progenitor őssejtek (ős-csírasejtek vagy primordiális csírasejtek) diploid sejtek, amelyek a kelő lárvákban gyöngysorszerűen fűződnek fel az ivari redőbe, ahova az embrionális fejlődés során vándorolnak. Az első lépés a magányosan álló A-típusú spermatogóniumok differenciálódása, melyeket a Sertoli sejtek vesznek körül, és amelyek a hámszövetben mitotikus osztódásra képesek (fenntartva számukat a csírahámban). Az újabb osztódás során kialakulnak, a már csoportokba rendeződött B-típusú spermatogóniumok, amelyek továbbosztódva és átalakulva elsődleges spermatocytákat képeznek. Az elsődleges spermatocyták kialakulásával megkezdődik a meiózis folyamata. A B-típusú spermatogóniumoktól az elsődleges spermatocytákat a nagy sejtmag és cisztaméret segítségével különíthetjük el. Az első számfelező osztódás során kialakulnak a másodlagos spermatocyták. Ezek a sejtek szinte azonnal továbbosztódnak, létrehozva a haploid spermatidákat. A spermatidák átalakulásával elkezdődik a spermiogenezis

folyamata. A centriolumok a sejt perifériájára vándorolnak. A külső membránra merőleges elhelyezkedésű centriolumok alakítják ki a bazális testet, mely később a spermium flagellumává fog fejlődni. A flagellum folyamatos nyúlásával a sejtmag alakja és a kromatin állaga megváltozik. A sejtmagban létrejön egy üreg, eközben a flagellum nyúlása folytatódik. A mitokondriumok megnagyobbodnak és a flagellum proximális végéhez vándorolnak. A spermatida citoplazmája szintén hátrafelé vándorol és a sejten kívülre lökődik, amit a Sertoli-sejtek fagocitálnak (Grier és Neidig 2011, Szabó et al. 2000).

2.1.3. A petefészek felépítése, típusai

A petefészek az ingoláknál (*Petromyzontidae*) és nyálkahalaknál (*Myxini*) páratlan, a porcos (*Chondrichthyes*) és csontos (*Osteichthyes*) halaknál páros szerv. A csontos halak petefészke tágas üregű hártyásfalú zsák. Belső falából számos lamella indul ki, ezekről fűződnek le a petesejtek (ikra), és a táplálásukat szolgáló, valamint a peteburok kialakításában is részt vevő tüszőhámsejtek (nutritív sejtek). A petevezető az ingoláknál és nyálkahalaknál hiányzik, a porcos halaknál és tokféléknél (*Acipenseridae*) az ősvese elvezető csatornájából levezethető Müller-csőből származik. A csontoshalak jelentős részénél a petevezető, a petefészek elkeskenyedő részéből jön létre. Tágult része az uterus, ami egyes elevenszülő fajok esetében az utódok fejlődési helyéül szolgál. A csontoshalak közül nem alakult ki petevezető az angolnafélékben (*Anguillidae*) és a pisztrángfélékben (*Salmoninae*), így az ovulált ikra a testüregbe jut. A petevezető általánosan a húgynyílás után nyílik a külvilágba, de előfordul a húgyivarszemölcs is (Kiss 2000). A kijuttatott ikraszemek általában egymástól függetlenül jutnak a vízbe és oszlanak el az aljzaton. Kivételt képez a sügér ovulációja ahol, a nőstények által kibocsátott ikraszemek egymáshoz tapadva gyöngyfüzérszerű láncot alkotnak, ami a növényeken vagy a köveken megtapad (Harka és Sallai 2004). A le nem adott ikrát az ivási időszak végeztével a tüszőhámsejtek, vagy más vándorlásra képes sejtek fagocitálják (Kiss 2000).

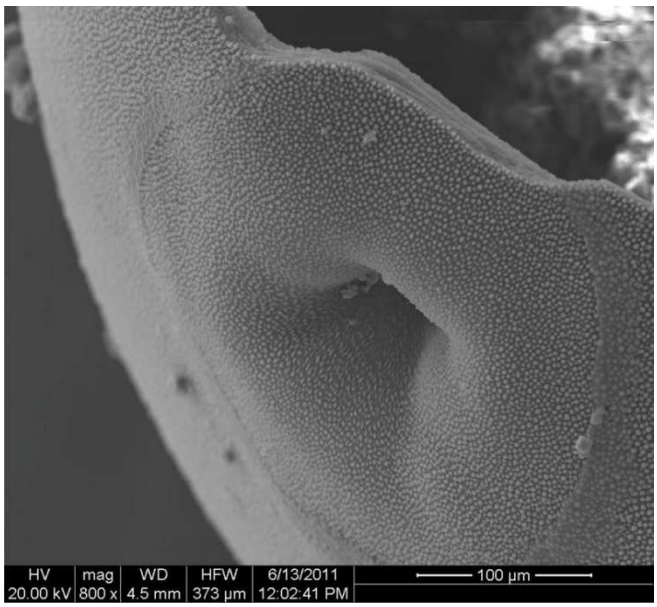
2.1.4. A petesejtek kialakulása és érése

A petesejtek fejlődése szempontjából kétféle típust különböztetünk meg. Az összes ivarsejt végigmegy a fejlődési folyamaton (szinkronizált) és a petefészekben minden sejt azonos stádiumban van, akkor semelpar fejlődésről beszélünk (pl. lazacfélék). Ezek a halak életükben egyszer szaporodnak. A csontos halak nagyobb része azonban élete során többször szaporodik, így a petesejtek a petefészekben különböző fejlettségi állapotban vannak (iteropar).

A petesejteket a fejlődés kezdeti szakaszában a tüszőhámsejtek veszik körül. A petesejtek kialakulásának (oogenezis) 3 fő szakaszát különböztetjük meg (szaporodási, növekedési és érési periódus). Az oogenezis során az őspetesejtekhez az őket körülölelő multipotens sejtek kapcsolódnak, létrehozva a primer oocytákat (a rajta lévő hártyával jön létre a primer folliculus). A petesejtek számtartó osztódásra képes szakasza lezárul. A protoplazmás szakaszba lépve, megkezdődik a sejtek plazmájának egyenletes növekedése. A következő lépésben a primer oocytákban megindul a nagyarányú tápanyagfelvétel, és felhalmozás (trofoplazmikus szakasz). Első lépésben, a citoplazmában vakuólumok jönnek létre (vakuolizáció), amelyek lassan kitöltik az egész plazmát. A következő folyamat során alveolusok jönnek létre (olajtartalmú sejtzárványok), melyek között megkezdődik a lipoid tartalmú

sziklemezkék szintézise, felhalmozódása és berakódása (vitellogenezis), mely során a vakuólumok a perifériára szorulnak. A sejtméret gyorsan gyarapodik. A vitellogenezis során megvastagodik a peteburok (oolemma) és sugárirányú csatornácskák alakulnak ki benne (zona radiata). A végbemenő bioszintézisben nagy jelentőséggel bírnak a sejtmagvacskák (nukleoluszok), amelyek a sejtmembránhoz tapadva a fehérjeszintézisben vállalnak aktív szerepet. A petesejt érésének végét jelzi a nukleoluszoknak a sejtmag centrumába való húzódása. Ilyenkor, az érett petesejt kész az ovulációra (Szabó et al. 2000).

Az érett petesejteket a szikanyag alapján csoportosíthatjuk. Sok szikanyagot tartalmazó (polylecithalis, számos halfaj), kevés vagy közepes (mesolecithalis) szikanyaggal rendelkező petesejt (iszaphal-*Amia calva*, tüdőshalak-*Dipnoi*, tokfélék-*Acipenseridae*). A szikanyag elhelyezkedése alapján lehet egyelőtlen eloszlású (anisolecithalis), illetve a petesejt egyik pólusán tömörülő (telolecithalis). Elkülöníthető egy szikmentes, vagy csak kevés szikanyagot magába foglaló animális és egy nagy mennyiségű sziket tartalmazó vegetatív pólus. A sejtmag az érett petesejtben az animális pólusban található (Kiss 2000). A külső megtermékenyítésű fajokban a pete külső védőburkán csírakapuk (micropyle, **1. ábra**) jönnek létre, amelyek a spermiumok bejutását szolgálják (számuk csontoshalaknál 1, tokféléknél általánosan 5-15, de akár 50 is lehet) (Kiss 2000).

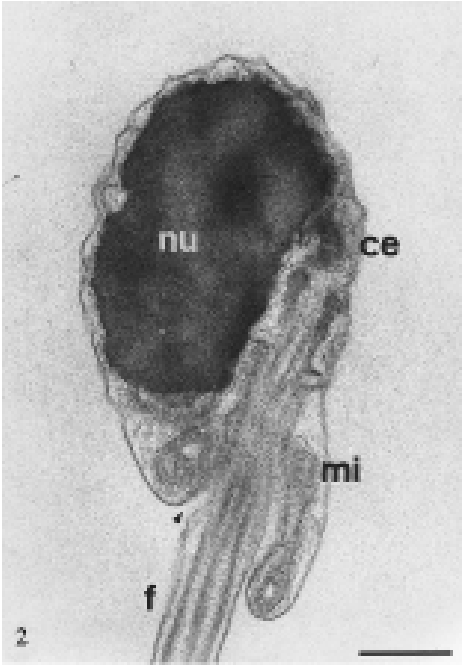


1. ábra. A balin (*Aspius aspius*) ikra és csírakapu elektronmikroszkópos képe 3 perccel az aktivációt követően (Korzelecka-Orkisz et al. 2013).

2.1.5. A spermiumok felépítése

A spermium elsődleges funkciója a hím haploid kromoszómaállomány eljuttatása a petesejtbe. Négy fő részre osztható: akroszóma (csak egyes fajokban található meg pl. a tokalakúakban-*Acipenseriformes*), fej, középdarab, és a farok vagy flagellum. A tokalakúak esetében az akroszóma nem vesz részt az ikra külső burkának lízisében, ugyanakkor az akroszóma-reakció elengedhetetlen a sikeres termékenyítéshez. A pontos sejttani folyamat egyelőre nem tisztázott, azonban feltételezik, hogy a reakció során keletkező termékenyülési filamentumok kötik össze a petesejtet a spermium fejével, ezzel segítve elő a termékenyülést (Linhart et al. 2011). A lazacfélékben, a spermium feji régiójának csúcsi részén kis vezikulumot írtak le, mely valószínűsíthetően csökevényes akroszómamaradvány (Lahnsteiner és Patzner 2008). A DNS-állományt tartalmazó feji régió gyakorta kerek vagy ovális alakot vesz fel (sügérfélék-*Percidae*, lazacfélék, pontyfélék, **2. ábra**), de előfordul hosszúkás megnyúlt forma is (pl. tokalakúakban) (Fürböck et al. 2009, Lahnsteiner és Patzner 2008, Linhart et al. 2011). A középdarab a spermium energiaraktára, itt találhatók a mitokondriumok. A hímivarsejt motorja a flagellum. A fej és középtest határán található a centrioláris komplex, amelyet a proximális és disztális centriólumok (a flagellum alapját képezi) alkotnak.

A számos halfajt változatos felépítésű spermiumok jellemzik (Lahnsteiner és Patzner 2008). A sejtek alakját tekintve aszimmetrikus alakot írtak le a pontyfélék és sügérfélék esetében, sugárirányban szimmetrikust a tokalakúakban és függőlegesen szimmetrikus felépítést a lazacfélékben (Fürböck et al. 2009, Lahnsteiner és Patzner 2008, Linhart et al. 2011).



2. ábra. Sügérspermium elektronmikroszkópos képe. nu: sejtmag, mi: középdarab, ce: centriolum, f: középtest és centrioláris komplex (Lahnsteiner et al. 1995a).

2.1.6. Termékenyülés és termékenyítés

Megkülönböztetünk a halakon belül külső (ovipar) megtermékenyítésű fajokat, amelyek nagyszámú ivarsejtet termelnek. Az ikra előbb a vízbe (külvilágba) kerül, majd azt megtermékenyíti a spermium. A belső megtermékenyítésű fajoknál a spermium az ikrás testén belül találkozik a petesejttel. A belső termékenyítés porcoshalakban gyakoribb, mint a csontos halakban. Gyakorta párzószerv segítségével kerül át a hímivarsejt a nősténybe (porcos halak-myxopterigium, csontos halak-gonopodium). Egyes ráják, cápák és csontoshalak esetében a megtermékenyített zigóta azonnal a külvilágba kerül (zigopar). Az ovovivipar fajok esetében a petevezető módosult részében fejlődnek és kelés előtt kerülnek leadásra (porcoshalak 50%, csontoshalak 2-3%). Az ikrás nem táplálja őket közvetlenül, de a vererek segítségével az oxigénellátás biztosított. A vivipar fajok esetében az utód az uteruszban fejlődik (cápák egy része), vagy a petefészekben (csontoshalak mintegy 500 fajánál) fejlődik. A táplálás a szikzacskó és az anya által történik a vererek, vagy sziktömlőplacenta segítségével.

A termékenyülés természetes folyamat, mely során a haploid ivarsejtek (n) fúziójával létrejön a diploid zigóta (2n). Első lépésként a spermium bejut a petesejtbe (impregnáció), majd bekövetkezik az összeolvadás (konjugáció). A spermiumok célba jutásában a kemotaxisnak kulcsszerepe van. A mikropyle körül található attraktánsként működő vegyületek váltják ki a spermiumok nagyarányú aktivitását (pontyfélék, lazacfélék). A lerakott megtermékenyítetlen petesejt élettartama fajtól függően néhány perctől akár egy napig is tarthat. A termékenyülés során kortikális reakción megy keresztül az ikraszem. A kétféle sejtmagból létrejönnek az előmagvak (pronukleuszok). A maganyagok összeolvadásával a kromatinállományból létrejönnek a kromoszómák transzport formái. A maghártyák ciszternákba tagolódnak, kialakul a mitotikus orsó. A centriólumok az orsó két végére kerülnek, és végbemegy a mitózis, azaz megkezdődik a barázdálódás folyamata. A barázdálódás főbb állomásai az első osztódások, szedercsíra (morula) állapot, hólyagcsíra (blasztula) állapot, bélcsíra (gastrula) állapot, idegcsíra állapot

(neuruláció), és a többi szerv kifejlődése a kelésig (posztembrionális fejlődés). A barázdálódás időtartama fajspecifikus, környezeti tényezők jelentősen módosíthatják (alacsony hőmérséklet és oxigénkoncentráció lassítja a folymatot) (Kiss 2000). A valódi csontoshalak esetében a termékenyülés minden esetben monospermiás. A polispermia kialakulását az ikra szerkezeti adottságai (pl. a zona radiata a spermiumok számára nem átjárható, a petesejt felszínén csak egy csírakapu található,) és élettani sajátossága (pl. a petesejt felszínén lejátszódó kortikális reakció) akadályozzák meg. Tokfélékben (pl. kecsege-*Acipenser ruthenus*) a nagyszámú csírakapu miatt kialakulhat polispermia a termékenyülés során, ami rendellenes embrionális fejlődést eredményezhet (Horváth és Urbányi 2000).

Mesterséges körülmények között a szaporítás során a halakban fajspecifikus módszerekkel indukáljuk az ivarsejtek termelését (kémiai és organikus anyagok injektálása, fotoperiódus, vízhőfok szabályozása stb.). A lefejt tejet és ikrát kontrollált körülmények között keverjük össze. A spermiumok aktivációja történhet víz, vagy aktiváló oldatok alkalmazásával (fajspecifikus). Megkülönböztetünk úgynevezett száraz (sperma ikrához keverése, majd aktiváció) és nedves termékenyítést (ikrára először az aktiváló kerül, majd a sperma) (Szabó et al. 2000).

2.2. A halsperma mélyhűtése és minősítése

2.2.1. A mélyhűtés fizikai-biológiai alapjai

A tiszta, ionokat nem tartalmazó víz fagyáspontja 0 °C. A különböző oldott anyagokat tartalmazó vizes oldatok fagyáspontja ennél alacsonyabb és az oldott anyagok mennyiségétől függ (Denniston et al. 2000). Az élő sejtek számos ozmotikus egyensúlyt fenntartó partikulumot tartalmaznak, amelyek nagyban befolyásolják mélyhűtésüket. Az állati sejtekben nagy mennyiségű víz, oldott cukrok és sók, valamint fontos fehérjék és zsírok találhatók. Mindezek nélkülözhetetlenek a sejt-szervecskék és az őket körülvevő sejtmembrán zavartalan működéséhez és felépítéséhez. A plazmamembrán egy féligáteresztő hártya, amely csak a nagyobb molekulák számára jelent akadályt, a víz többé-kevésbé zavartalanul át tud hatolni rajta. Ez a sejten belüli és a sejten kívüli tér közötti áramlás létfontosságú, hiszen lehetővé teszi, hogy a különböző anyagok mennyisége egyensúlyban legyen a két oldalon. Az oldott anyagok mennyiségét az oldatban ozmolalitással szokás megadni, amelynek mértékegysége mosmol/kg. Egy átlagos állati sejtben átlagosan 280-310 mosmol/kg az oldott anyag mennyisége (Denniston et al. 2000).

A sejtek mélyhűtésének időrendben 4 fő folyamatát különíthetjük el. Az első periódusba a jégkristályok kialakulását megelőző hűtési folyamatot soroljuk. A soron következő folyamat maga a kristályok kialakulása, melyet követően a mintákat tovább hűtjük átlépve a fagyasztás szempontjából kritikus periódust (-10 °C-tól -40 °C-ig). A végső szakaszban a sejtek hőmérséklete, a hűtésre szolgáló anyaggal megegyező (száraz jég, folyékony nitrogén stb.) hőfokra csökken. Az első szakasz a halsperma esetében (a soron következőkhöz képest) nem bír nagy jelentőséggel a mélyhűtés alakulásában, ám fontos megjegyezni, hogy a sejtek nem tehetők ki sorozatos hőmérsékletváltozásnak (ingadozásnak), valamint biztosítani kell a fagyasztásra szolgáló tároló egységek (műszalma, fagyasztócső stb.) mintával megegyező hőmérsékletét.

A következő periódus alapja, a sejteket körülvevő vizes közeg fagyása során végbemenő halmazállapot-változás. A hűtő közeg fagyása során, a sejten belüli térben és közvetlen környezetében a hőmérséklet növekszik. Optimális esetben a

jégkristályok a hűtőmédium fagyáspontja közeli hőmérsékleten nagy arányban, ám egyenletesen jönnek létre (túlhűtést megakadályozva), elkerülve a sejtek esetében, a víz hőfúziója által kiváltott túlzott hőmérsékletváltozást. A kritikus periódusban nagy szerepe van a hűtés sebességének. A sejten kívüli jégkristály-képződés következtében, a membrán két oldalán ozmotikus gradiens jön létre, ami nagyarányú vízkiáramlást eredményez. A vízleadás tart, amíg a sejthártya két oldalán az ozmotikus viszonyok ki nem egyenlítődnek. A hűtés sebességének tehát elég lassúnak kell lennie a víz kiáramlásához és az ozmotikus viszonyok kiegyenlítődéséhez. A túl gyors hőmérséklet-csökkenés sejten belüli jégkristály-képződéshez vezet. A túl lassú fagyasztás azonban a megnövekedett membránon belüli sókoncentráció következtében végzetes dehidratációt eredményez. A fagyasztás záró szakaszában a sejtek átlépve a kritikus hőmérséklet tartományt lehűlnek a hűtőközeg hőmérsékletére (Cloud és Patton 2009). A membránon belül és kívül stabil, homogén, fagyott halmazállapot jön létre. A végső hőmérsékleten történő rövid tárolással a minták teljes mértékben adaptálódnak külső környezetükhöz.

2.2.2. A spermamélyhűtés folyamata

A sperma mélyhűtése egy asszisztált reprodukciós eljárás, melynek köszönhetően a genetikai örökítőanyag szinte korlátlan ideig tartósítható (Cloud és Patton 2009) Ashwood-Smith, Whitthingham és Stoss kutatásai alapján elmondhatjuk, hogy a mélyhűtött minta folyékony nitrogénben évekig is tartósítható (Ashwood-Smith 1980, Whitthingham 1980, Stoss 1983). Ez az eljárás kiválóan alkalmazható a halak tenyésztésében és veszélyeztetett fajok genetikai tartalékainak megőrzésében (Cloud és Patton 2009).

2.2.3. A sperma gyűjtése és hűtés előtti tárolása

A mélyhűtés első lépése a vizsgált faj spermájának kinyerése. A csontoshalak nagy részénél a spermát le lehet fejni (pl.: szivárványos pisztráng), azaz a hasfal masszírozásával kinyerhető a herében tárolt sperma (Pintér 1992). Más halfajok (pl. afrikai harcsa-*Clarias gariepinus*) esetében a faj anatómiai sajátosságai miatt az egyedet altatást követően le kell vágni, és az ivarszervéből kell kinyerni a spermát. A sperma kinyerése során el kell kerülnünk a minta vérrel, vizelettel, széklettel vagy egyéb anyagokkal történő szennyeződését (Cloud és Patton 2009). A fejés közben használhatunk az ivarvezetékbe helyezett katétert, mellyel tovább csökkenthetjük a szennyeződés lehetőségét (Glogowski et al. 2000). A gyűjtött spermát felhasználásig oxigéndús környezetben, 0-4 °C-on kell tárolni. Amennyiben a minta szállítást igényel, a tárolásnál megadott hőmérsékletet és oxigénellátottságot kell biztosítani (Cloud és Patton 2009).

2.2.4. A hűtőmédium és ekvilibráció

A minta hűtőmédiummal történő hígítása fajspecifikus és tág keretek között mozog (általában 1:1-1:9, Cabrita et al. 2010). A közeg, amely mélyhűtés közben körülveszi a spermiumokat, két fő összetevőből áll. Az első ezek közül a hígító (szeminális plazmának megfelelő izotóniás oldat), amely a optimális pufferrendszerrel és membránstabilizáló anyagokkal rendelkezik. Az alkalmazott hígító nem aktiválja a sejtek mozgását, és összetétele taxonfüggő. Sók és cukrok

(extracelluláris védőanyag, Cabrita et al. 2001a) egyaránt alkothatják. Az egyik legfontosabb összetevője a pufferrendszer, amely megakadályozza a hűtés és felolvasztás során az oldat pH-értékének jelentős ingadozását. Fontos alkotórészei lehetnek a különböző membránstabilizáló anyagok, amelyek jelentős szerepet játszanak a sejtek külső felületének védelmében (Cloud és Patton 2009). Jól alkalmazható stabilizáló anyag pisztrángfélék esetében a tojássárgája, a szarvasmarha szérum albumin (BSA) és a promin D. A hűtőmédium szintén fontos alkotója az ún. védőanyag (Baynes és Scott 1987, Stoss és Holtz 1981b). A védőanyagok általában alacsony molekulatömegű vegyületek, hiszen át kell hatolniuk a sejtek plazmamembránján. Egyes védőanyagok toxikusak lehetnek a sejtek számára. A spermiumokba jutva megakadályozzák a jégkristályok kialakulását a mélyhűtés során. Ilyen anyagok használata nélkül a sperma termékenyítő-képessége a felolvasztás után jelentősen lecsökken (Cloud és Patton 2009). Halaknál jól alkalmazható védőanyagok például a dimetil-szulfoxid (DMSO), a glicerin, vagy a metanol (Denniston et al. 2000). A sejtbe történő behatolásukhoz időre van szükség, amelyet ekvilibrációs időnek nevezünk. Az ekvilibrációs folyamat addig tart, amíg a krioprotektív anyag koncentrációja a sejten belül és kívül ki nem egyenlítődik. Kis sejtek és egyes védőanyagok (pl. metanol) esetében a jelenség az összekeverést követően azonnal lezajlik, nincs szükség várakozási időre (Horváth 2001).

2.2.5. A spermaminőség és vizsgálata

A szezonálisan ivó halfajokban (fajonként változó módon) természetesen az ivarsejtek érése is időszakos ritmust mutat. A termékenyülés sikere mind gazdasági, mind pedig a természetes populációk dinamikus egyensúlyának fenntartása okán elengedhetetlen. A sikeres ívás vagy szaporítás számos környezeti, antropogén hatástól függhet közvetlenül (pl. áradás, anyahalak tartása), illetve közvetve (pl. sperma, ikra minősége és mennyisége) (Cabrita et al. 2011, Fauvel et al. 2010, Szabó et al. 2000). Több esetben megállapították, hogy az ikra termékenyülése szorosan összefügg a sperma minőségével (Fauvel et al. 2010). A legtöbb összefoglaló értekezés is arról számolt be, hogy a sperma tulajdonságai külön-külön vagy eggyüttesen fejtik ki hatásukat a termékenyülés folyamatában (Alavi et al. 2008, Bobe és Labbé 2010, Cabrita et al. 2009). A legfontosabb minőséget jelző paraméterek a sperma motilitása, sejtsűrűsége, morfológája, a sejtmembrán integritása, és a spermium energiakészlete (ATP-szintje), a sejtmagi DNS fragmentáltsága, stb. A mérési módszerek egységesítése azonban elengedhetetlen a hatékonyság növelése érdekében (Fauvel et al. 2010). Kaspar et al. (2008) a pontysperma kompetíció vizsgálata során bizonyította, hogy a sperma sebessége befolyásolta az eredményes termékenyítést. Azokban, a vizsgálatokban, ahol a spermaminőség és termékenyülés között nem volt összefüggés (szivárványos pisztráng, tengeri süllő-*Dicentrarchus labrax*), a termékenyülés sikerét egyértelműen az ikra minősége határozta meg (Nagler et al. 2000, Saillant et al. 2001).

2.2.6. A sejtkoncentráció mérése

A sejtkoncentráció vagy sejtsűrűség az 1 ml mintában található sejtek számát jelenti, amelynek ismerete termékenyítéskor lehet fontos. A sperma sűrűségének meghatározása elengedhetetlen a megfelelő és fajfüggő sperma/ikra arány megállapításához. A sejtkoncentráció pontos ismerete elősegítheti a mélyhűtési

módszerek eredményességét és ismételhetőségét (Cuevas-Uribe és Tiersch 2011, Fauvel et al. 2010). Az évtizedek során számos hatékony módszert fejlesztettek ki a sperma sűrűségének precíz mérésére. Az egyik klasszikus módszer a sejtszámláló kamrákban (Bürker-, Thoma-, Neubauer-kamra) mikroszkóp segítségével végzett számlálás. A sejteket immobilizált állapotban szabad szemmel, vagy számítógépes szoftver segítségével számolhatjuk le (Christensen et al. 2005, Fauvel et al. 2010, Lujić et al. 2015, WHO 2010b). A sejtsűrűség továbbá meghatározható számítógépes spermavizsgáló rendszer segítségével is (Computer-Assisted Sperm Analysis, Cuevas-Uribe és Tiersch 2011). Újabb módszer a spektrofotométer alkalmazása, melynek segítségével vizsgálható, hogy az eltérő fajok különböző sűrűségű spermája más hullámhossz-tartományban nyeli el a látható fényt. A legkorszerűbb és legdrágább módszer az áramlási citométer (flow-cytometer) alkalmazása. A gép segítségével nem csak a különböző méretű és alakú sejtek száma, de azok fiziológiás állapota is vizsgálható (Fauvel et al. 2010).

2.2.7. A sperma morfológiai vizsgálata

A spermium heréből az ikrához való eljutása során számos változáson mehet keresztül, amit gyakran abiotikus tényezők, mutációk, vagy a különböző tárolási folyamatok (pl. mélyhűtés) eredményeznek. A spermium feji, középdarabi és farki régiója egyaránt sérülhet. Bár az emlősöknél már a 90-es évektől alkalmazzák az úgynevezett automata spermavizsgáló rendszert (ASMA-Automated Sperm Morphology Analysis), a halak körében először Van Look és Kime 2003-ban használta sikerrel az aranyhal spermáján. Az utóbbi években azonban a módszer alkalmazása az európai angolna (*Anguilla anguilla*) esetében is eredményesnek bizonyult (Asturiano et al. 2006., Peñaranda et al. 2008).

2.2.8. A spermiumok membrán-integritásának és a DNS-töredezettségének vizsgálata

A módszer lényege, hogy a sejtmembrán épségének (integritásának) vizsgálatával megállapítjuk az élő és holt spermiumok arányát. A hagyományos festési eljárások (pl. eozin-nigrozin festés) halsperma esetében nem terjedtek el, mivel a sejtek rosszúl tűrik a szárítást. Gyakrabban használják a fluoreszcens eljárásokat, amelyek szintén kettős festésen alapulnak. Az élő sejtek kimutatására használhatjuk pl. a zöld fényt kibocsátó SYBR 14-et, a holt sejtek meghatározásához pedig a vörös fluoreszcens fényt kibocsátó propídium-jodidot (Grzyb et al. 2003, Segovia et al. 2000). A SYBR 14 képes az élő sejtek membránján áthatolni és a magban működő DNS-hez kötődni, míg a propídium-jodid a sérült membránnal rendelkező (azaz holt) spermiumokba hatol be és ott festi meg a maganyagot (Segovia et al. 2000). Az áramlási citométer ugyanezt a folyamatot gyorsítja fel: egy CCD kamera által egymás után rögzített képek halmazát analizálja, és meghatározza az élő és halott sejtek arányát. A berendezés alkalmas sejtkoncentráció meghatározására, és a mitokondriumműködés hatásfokának vizsgálatára. A membránintegritás vizsgálható továbbá nagyfelbontású fénymikroszkóp segítségével szabad szemmel. A mozgó sejt membránjának vizsgálatára jól működő módszer a stroboszkópos analízis, ami a fej és farok illeszkedésének állapotát, valamint a farki részen ozmotikus sokk hatására rendellenesen kialakuló membránhólyagok vizsgálatát teszi lehetővé.

A sejtmagban található DNS épségének meghatározására jól alkalmazható az úgynevezett „Comet Assay“ módszer. A módszer segítségével olcsón és nagy hatásfokkal mutatható ki a DNS fragmentációja. A töredezettség létrejöhet, a sejt morfológiai elváltozásihoz hasonlóan, abiotikus tényezők és a különböző tárolási folyamatok (pl. mélyhűtés) eredményeként. A módszer során különböző fluoreszcens anyagok (pl DAPI, etídium bromid stb.) megfestik a DNS állományt az egyszerű gélelektroforézis során megfuttatott tárgylemezeken (Fauvel et al. 2010).

2.2.9. A spermiumok energiakészletének vizsgálata

A mitokondriumokban az ATP (adenozin-trifoszfát) hidrolízisével energia szabadul fel, és a párosan elhelyezkedő mikrotubulusok elmozdulásával létrejön a flagellum mozgása. A folyamatot számos fajban leírták (ponty: Perchec et al. 1995; nagy rombuszhal-*Psetta maxima*: Dreanno et al. 1999a; lénai tok-*Acipenser baeri*: Billard et al. 1999; tengeri süllő: Dreanno et al. 1999b és 2000). A sejtek energiakészletének mérésére szolgáló módszerek a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography), biolumineszcens mérés, vagy mágneses magrezonancia alkalmazása (NMR, Nuclear Magnetic Resonance). A lumineszcens eljárás során a mintákat foton kibocsátására képes anyaggal (pl. luciferin, Perchec et al. 1995) jelölve speciális lemezeken analizálják. Előnye, hogy gyors (akár 3 óra) eljárás, alkalmazásával az ATP mennyisége precízen mérhető.

A HPLC teknika alkalmazásával az ATP-vel egyidejűleg, az ADP (adenozin-difoszfát) és AMP (adenozin-monofoszfát) szint is mérhető. Együttesen AEC (Adenylate Energy Charge) komplexnek hívjuk, ami a spermiumok számára a mozgás során elérhető energiaraktár egy része. Értékét százalékos arányban adják meg. Ha a mért eredmény 80-95%, akkor sejt ideális energiakészlettel rendelkezik. Közepes stádiumban 50-70%, a spermium alacsonyabb intezitású mozgásra lehet képes, de az energiakészlet még magasnak számít. Az alacsony energiakészletet 50%-nál alacsonyabb szint jelenti, mely erősen kihat a sejt mozgására.

Az NMR egyéb (nem AEC) energetikai szempontból fontos vegyületek (pl. kreatin-foszfát, Saudrais et al. 1998) mérésére alkalmas (Fauvel et al. 2010). Az NMR alapelve szerint az anyagot mágneses mezőbe helyezzük ahol, egy másik forrásból érkező elektromágneses sugarakat rezonanciaszerűen elnyeli (Sohár 2004). Az ATP-szint egyes fajokban az ívási időszak előrehaladtával csökkenhet (tengeri süllő, Dreanno et al. 1999b). Az ATP-szint és a motilitás közötti összefügést csak néhány kutatásban nem tudták bizonyítani (pl. szélhajtó küsz-*Alburnus alburnus*, Lahnsteiner et al. 1996b) (Fauvel et al. 2010).

2.2.10. A spermamotilitás és vizsgálata

Aktiváció

A külső megtermékenyítésű fajok esetében a sperma a szeminális plazmában nyugalmi, immobilis állapotban van. Az aktiváció kiváltásához vizes közegre vagy speciális aktiváló oldatra van szükség. Az aktiváló oldatok ionos összetétele révén a spermiumok körül ozmotikus nyomáskülönbség alakul ki. Attól függően, hogy édesvízi, vagy tengeri fajról beszélünk az ozmolalitásnak az aktiváló oldatban alacsonyabbnak vagy magasabbnak kell lennie, mint a szeminális plazmában. Az édesvízi fajok esetében az ozmolalitás csökkenése, míg a tengeri fajok esetében

annak növekedése váltja ki a sejtek mozgását. Nem csak az ozmotikus nyomáskülönbség játszhat szerpet a motilitás katalizálásában. Egyes fajokban a káliumion (tokalakúak, lazacfélék), más esetben a széndioxid (lepényhalalakúak-*Pleuronectiformes*) koncentrációjának nagyarányú csökkenése szükséges az aktivációhoz. Az optimális aktiválóban maximalizálható a motilitás, az immobilizáló oldattal vagy hígítóval pedig megakadályozható a spermiummozgás (Cosson 2008).

A motilitás időtartama

A motilitás időtartama az aktivációt követően néhány perc, de nagyon gyakran kevesebb, mint egy perc. Vigyázni kell tehát a fejés során, hogy a sperma ne érintkezzen semmilyen, aktivációra képes anyaggal (vizelet, bélsár, víz, vér stb.), elkerülve ezzel is a mozgás vizsgálat előtti indukálását. Előaktivációt okozhat továbbá a minták tárolására, vagy előhígítására szolgáló immobilizáló oldat vagy hígító. A motilitás idő előtti inicializálása a rögzíteni kívánt paraméterek objektív mérését is torzíthatja, melyeket rögtön (néhány másodperc, fajfüggő) az aktivációt követően ajánlott rögzíteni. A spermiumok kezdeti motilitásának 2-3 másodperccel az aktivációt követően igen magas a sebessége (300 µm/s) és a flagellum mozgási frekvenciája (100 Hz), azonban ezek az értékek az idő előrehaladtával arányosan csökkenek (Cosson 2008). A vágótok (*Acipenser gueldenstaedtii*) esetében a motilitás időtartama körübelül 245 mp, a ponty (*Cyprinus carpio*) esetében 90 mp, sebes pisztráng (*Salmo trutta* m. *fario*) esetében 100 mp (Browne et al. 2015). A sügér (*Perca fluviatilis*) sperma esetében a szerzők által közölt adatok nagy különbségeket mutatnak. Browne et al. (2015) átlagosan 10 mp-es intervallumot írtak le munkájukban. Lahnsteiner (2011b) vizsgálatában, meglepő módon még 2 órával az aktivációt követően is fedezett fel mozgó sejteket a sügérsperma-mintákban.

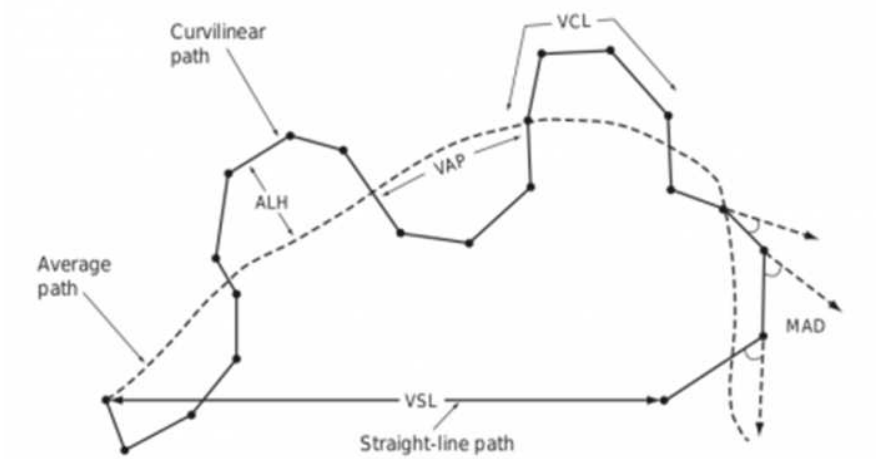
A motilitás mérése

A spermiummozgás mintán belüli meghatározásának szubjektív, de gyors módszere a fénymikroszkóppal végzett vizuális becslés. A spermamotilitás számítógép által végzett mérése, objektívebb és egységesebb eredményt ad. A legalapvetőbb (régebbi) formája, hogy mikroszkóp és kamera segítségével felvételt készítünk a spermiumok mozgásáról, majd azt számítógépen utólagosan elemezzük. Minden sejtmozgást leállítva egyenként jelöljük a megtett utat, a sebességet és a mozgó sejtek arányát. A módszer pontos, bár időigényes és nem képes az eredmények valós idejű (real-time) közlésére. A számítógépes vizsgálatban az igazi áttörést a bonyolultabb CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) rendszerek jelentették (Kime et al. 2001). A CASA rendszer a spermiumok fejét érzékeli, videófelvételeket rögzít, melyeket ezután egymásba fűz. A szoftver a spermiumok elmozdulását kalkulálja ki a felvételek alapján, és meghatározza a mozgás útját, arányát és egyéb paramétereit (Fauvel et al. 2010). A módszert először a humán orvostudományból adaptálták az emlősökre, később számos módosítás útján a halakra. Az emlős sperma órákig tartó mozgásával szemben, a rendszernek alkalmazkodnia kellett a halsperma rövid, legfeljebb 1-2 perces mozgásához. A „real-time” rendszerekben is alkalmazhatók egyszerűbb programok (sperm tracker), melyek során a különböző videókon a kutató választja ki az elemezni kívánt sejteket. Ezek az eljárások még mindig viszonylag szubjektívek és időigényesek. Az újabb programok már több száz sejt azonnali, egyidejű elemzésére is képesek (pl. Hobson

Sperm Tracker, Hobson Vision Ltd., Baslow, UK. Kime et al. 2001). Egy hasonlóan eredményes alkalmazás az Image J szoftveren (Image J for Windows, National Institutes of Health, Egyesült Államok) belül kidolgozott CASA alkalmazás (Wilson-Leedy és Ingermann 2007), mely használata során még mindig rengeteg beállítás, és utómunka szükséges, de a módszerre írt automatizálás már némileg csökkenti az időráfordítást. A szoftver legfontosabb előnye az ingyenes elérhetőség. (Fauvel et al. 2010, Purchase és Earle 2012). A legújabb, legköltségesebb rendszerek már mikroszkóp és számítógépes szoftver segítségével képesek azonnal nagy mennyiségű spermium (akár 4000) pontos elemzésére. A felhasználónak nem kell utómunkákkal foglalkoznia, ám a mérést megelőzően a fajra jellemző spermiumok sajátosságaihoz kell igazítania a rendszert (pl. Sperm Class Analyzer v. 4.0.0. by Microptic S.L., Barcelona, Spanyolország; Sperm VisionTM v. 3.7.4., Minitube of America, Venture Court Verona, Egyesült Államok; ISAS, Proiser R+D, S.L., Paterna, Spanyolország). A modernebb CASA rendszerek a humán orvoslásban meghatározott, a spermiumok mozgásának objektív leírására szolgáló paramétereket rögzítik, melyek a mozgó és statikus sejtek arányát, a fej rezgését, a mozgás egyenességét és különböző sebességi paramétereket adják meg (**1. táblázat, 3. ábra**).

1. táblázat. A CASA rendszerek által legygakrabban rögzített paraméterek (Fauvel et al. 2010, Horváth et al. 2006, Rurangwa et al. 2004, WHO 2010a).

Rögzített paraméter (angol)	Paraméterek magyar meghatározása	Mértékegység
Motility	Motilitás	%
Progressive motility	Progresszív motilitás	%
VCL-curvilinear velocity	A hímivarsejt sebessége a ténylegesen megtett, teljes mozgási útvonalára számolva	µm/s
VSL-straight line velocity	A hímivarsejt sebessége mozgásának kiindulási és végpontja közötti távolságra számolva (progresszív sebesség)	µm/s
LIN−linearity	A hímivarsejt ténylegesen megtett mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése	%
VAP-Average Path Velocity	A hímivarsejt sebessége mozgásának átlagolt útvonlára számolva	µm/s
ALH- amplitude lateral Head Displacement	A fej oldalirányú kitérésének átlagos nagysága	µm
BCF-Beat Cross Frequency	A fej kilengésének frekvenciája	Hz
DAP- distance average path	A hímivarsejt ténylegesen megtett útonalának és a mozgásának kiindulási és végpontja között mért távolságnak (nettó) az átlagolt hosszúsága	µm
DCL-distance curved line	A hímivarsejt által ténylegesen megtett út hosszúsága	µm
DSL- distance straight line	A hímivarsejt által megtett egyenes útvonal	µm
WOB- wobble	A hímivarsejt teljes mozgási útvonalának az átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése	%
STR-straightness	A hímivarsejt átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése	%



3. ábra. Különböző motilitás paraméterek a spermamozgás útvonalának függvényében (WHO 2010a).

A motilitás mérésének folyamata

A mérés során a spermát egy aktiváló oldattal (víz vagy speciális fajspecifikus aktiváló oldat) keverjük össze. A vizsgálatot végezhetjük egyszerű vagy speciális tárgylemezen (pl. Leja tárgylemez v. kamra, Leja, Luzernestraat, Hollandia), illetve spermavizsgáló kamrában (pl. Spermtrack, Proiser R+D, S.L., Paterna, Spanyolország; Makler, Sefi Medical Instruments, Izrael). A mérés során meg kell

akadályozni a sejtek letapadását (pl. fehérjetartalmú anyag hozzáadásával (szarvasmarha szérum albumin-BSA)). A sűrűbb minták előhígítást igényelnek. A hígítónak a spermiumokat teljes egészében immobilizálnia kell. A legtöbb faj esetében a sperma aktivációját követően, a motilitás drasztikus csökkenésének következtében, a mérést nagyon gyorsan (<10 mp) kell elvégezni. Az aktiváló hőmérsékletét az adott faj környezeti igényeinek megfelelően érdemes megválasztani. A vizsgálat során továbbá, törekedni kell a sejtek sodródásának elkerülésére, mivel ilyenkor az egyébként mozdulatlan sejteket is aktívan mozgó spermiumokként rögzíti a rendszer (Kime et al. 2001). Az említett tényezők alapján, a méréseket egy adott mintában több alkalommal is érdemes megismételni.

2.2.11. Mélyhűtés és tárolás

Az előkészített spermamintákat cseppek (pelletek) formájában közvetlenül, vagy műszalmákba, illetve ampullákba töltve hűtik. Utóbbi kettő alkalmazása kényelmesebb, hiszen könnyebb adagolást tesz lehetővé (Martínez-Pastor és Adams 2009). A műszalmák mérete változó lehet (0,25-5 ml) (Cabrita et al. 2005, Ciereszko et al. 2014, Horváth et al. 2003, Horváth et al. 2007, Miskolczi et al. 2005, Velasco-Santamaría et al. 2006).

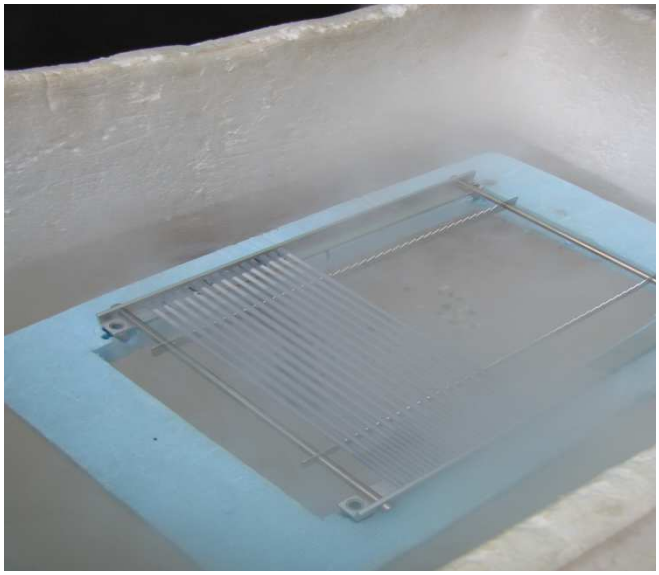
Az évek során számtalan módszer alakult ki a sperma mélyhűtésére. A legegyszerűbb és legolcsóbb a szárazjég használata, melynek szublimációs hőmérséklete -78,5 °C. Ennél az eljárásnál ún. pelleteket cseppentenek a szárazjégtömb felületén lévő mélyedésekbe. A módszer hátránya, hogy a hűtési sebesség és az arány nagyban függ a minta nagyságától. Előfordul, hogy a pelletek nem egyenletesen fagynak meg.

A szárazjéghez hasonló módszer a hideg alkoholos fürdő. A spermát műszalmákba töltve fagyaszthatjuk le. Ebben az esetben is szigetelt tárolóegységet alkalmaznak, de ebbe folyamatosan áramoltatják az alacsony hőmérsékletű alkoholt. A hűtőközeg ebben az esetben általában minimum 95%-os és -78 °C-os metanol, etanol vagy akár izopropanol. Szárazjég is adagolható a rendszerhez, ezzel is szabályozva a hűtés sebességét. Ennek a lépésnek hirtelen buborékképződés lehet az eredménye, ami csökkentheti a mélyhűtés sikerét.

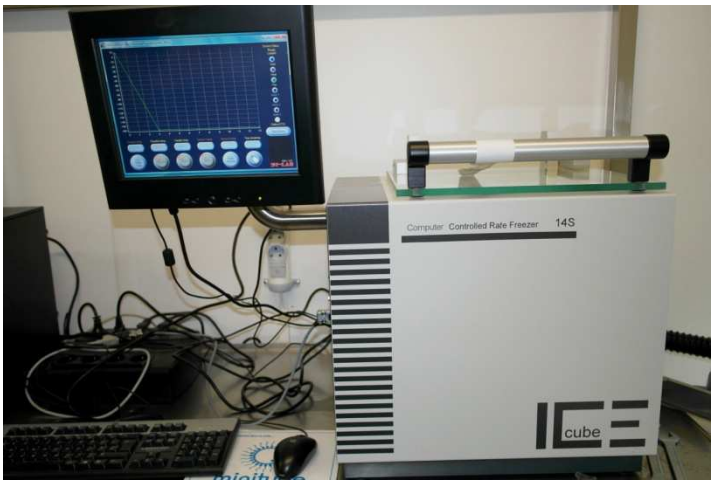
A fenti módszerhez képest több előnnyel bír a cseppfolyós nitrogén alkalmazása. Ebben az esetben is szükség van hőszigetelt edényre, amelybe a -196 °C-os hűtőközeget helyezik. A mintákat műszalmákba, vagy hűthető ampullákba töltik, melyeket egyenesen a folyékony nitrogénbe vagy egy, a közeg tetején úszó keretre helyeznek. A felületen lebegő tartó különböző vastagságú lehet, ezzel beállítható a hűtés sebessége és hőmérséklete. Ez a módszer lehetővé teszi fajra jellemző hűtési eljárások kidolgozását (**4. ábra**).

A negyedik lehetőség a programozható elektromos mélyhűtő berendezések használata (**5. ábra**). Ezek hűtőkamrájába kell belehelyezni a hűteni kívánt műszalmákat vagy hűthető ampullákat. A kamrába a számítógép egy előre megírt program alapján adagolja a cseppfolyós nitrogén gőzét, így belső érzékelői segítségével szabályozza a minta körüli hőmérsékletet (Martínez-Pastor és Adams 2009). A készülékek előnye, hogy a mélyhűtést befolyásoló fontos változók (pl. hűtési sebesség és a környezet a minta körül) a fagyasztás alatt egységesek és változatlanok. A programozható mélyhűtő berendezésekkel fajra jellemző fagyasztási módszerek kidolgozása válik lehetővé (pl. hígító, védőanyag, fagyasztásra való érzékenység tesztelése) (Butler és Pegg 2012). A készülék kapacitása akár több száz műszalma is lehet típustól függően. Kereskedelmi

forgalomban számos ilyen berendezés érhető el [pl. (Cryomed™, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), (IceCube, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria), (Asymptote EF600, Asymptote Ltd., St John's Innovation Centre, Cambridge, Egyesült Királyság)]. A programozható fagyasztó készülékek használatával, a kontrollált környezetnek köszönhetően, növelhető a mélyhűtési protokollok ismételhetősége (Babiak et al. 1999). Hátránya ezeknek a berendezéseknek, hogy nagy az áramfelvételük és viszonylag nagy méretüknél fogva terepen egyáltalán nem vagy csak nehezen alkalmazhatók (Martínez-Pastor és Adams 2009).



4. ábra. Folyékony nitrogénnel töltött polisztirol doboz és a rajta úszó 3cm-es hűtőkeret. (Fotó: Horváth Ákos)



5. ábra. Programozható fagyasztó berendezés. (Fotó: Kása Eszter)

2.2.12. Felolvasztás

Hasonlóan a mélyhűtéshez, a minták felolvasztásakor is törekedni kell a megfelelő sebességre. A műszalmák esetében gyors és dinamikus felolvasztás szükséges (pl. 0,25 ml-es műszalma 40 °C-on 5 mp, Szabó et al. 2005). Ha a folyamat lassú, az intracelluláris jégkristályok megnőnek, ami káros a sejtek számára (Piironen 1993). A felolvasztásnál eredményesen alkalmazható a vízfűrdő berendezés (**6. ábra**). A felolvasztás sebességét a minta méretétől függően, fajspecifikusan kell beállítani (Tiersch 2011).

6. ábra. Műszalma felolvasztása vízfürdőben. (Fotó: Kása Eszter)

2.3. A spermamélyhűtés és –minősítés eredményei különböző rendszertani csoportokban

2.3.1. Spermavizsgálat és -mélyhűtés eredményei tokalakúakban

A tokalakúak spermamotilitás-vizsgálatának és spermamélyhűtésének tanulmányozása igen nagy múltra tekint vissza, amely időszak során számos vizsgálat és eredmény született. A tavi tok (*Acipenser fulvescens*) felovasztott spermája még 5 perc elteltével is képes volt az aktív mozgásra Ciereszko et al. 1996 vizsgálatában. Tsvetkova et al. (1996) a lénai tok és kecsege esetében 3-4 perces maximális mozgásidőt rögzítettek. A lénai tok flagellumának mozgása a felolvasztott mintákban az aktivációt követően az idővel arányosan változik (Billard et al. 2000). A perzsa tok (*Acipenser persicus*) esetében bizonyítást nyert, hogy a motilitás nem függ a szeminális plazma ionösszetételétől és ozmolalitásától, valamint a minta sűrűségétől (Alavi et al. 2006). A sperma szeminális folyadékának összetétele, sebessége és a spermiumok morfológiája jó paramétereknek bizonyultak különböző tokfajok spermatológiai összehasonlítása során (Psenicka et al. 2008). A tokfélék spermáját toxikológiai vizsgálatokban is használták, mint modell-szövetet. A lénai tok spermája ellenállónak bizonyult a kadmium szennyezéssel szemben, azonban az ólom hátrányos hatással volt termékenyítő képességre (Dietrich et al. 2012). Dzyuba et al. (2012) vizsgálatukban egy (egy napon belül) egyed többszöri fejése során nagyobb mennyiségű, jobb motilitással és termékenyítőképességgel rendelkező mintákat nyertek ki. Ugyancsak a kecsege esetében kísérlet igazolta, hogy a heréből származó sperma minősége és termékenyítő képessége döntő mértékben nem különbözik a fejt tejétől (Dzyuba et al. 2014).

Több kutatás témája volt a sperma fejés utáni hűtött tárolhatóságának vizsgálata. Az atlanti tok (*Acipenser sturio*) esetében egy mintánál 17 napos tárolhatóságot írtak le folyamatos oxigénellátás mellett (Dilauro et al. 1994). Dorsey et al. (2011) az atlanti tok spermáját Park és Chapman-féle hígítóban 21 napig tudták tárolni. A lénai és vágótok (*Acipenser gueldenstaedtii*) esetében legalább 6 napos tárolhatóságot rögzítettek (Shaliutina et al. 2013). Hasonló eredményt publikált Aramli et al. (2013) és Aramli (2014) a perzsa tok és viza tej vizsgálatánál (*Huso huso*).

Számos tanulmány született többféle hígítók és védőanyagok sikeres alkalmazásáról a különböző tokfajok spermájának mélyhűtése során. Tisztán cukor alapú hígítókat sikeresen alkalmaztak pl. lénai tok esetében (Judycka et al. 2015). Kizárólag sók (ionok) felhasználásával előállított hűtőmédiumok eredményességét írták le a kecsege és kínai tok (*Acipenser sinensis*) esetében (Jähnichen et al. 1999, Lahnsteiner et al. 2004, Liu et al. 2006). A hígítók tesztelése során sok kutató (Boryshpolets et al. 2011, Glogowski et al. 2002, Horváth et al. 2005 és 2008, Linhart et al. 2006, Liu et al. 2007, Wayman et al. 2008, Yamaner et al. 2015) a cukor (legtöbbször szacharóz) és só összetevőket (NaCl, KCl stb.) egyaránt alkalmazta a lénai tok, vágótok, kecsege, rövidorrú tok (*Acipenser brevirostrum*), ásóorrú tok (*Scaphyrinchus albus*) és lapátorrú tok (*Polyodon spathula*) spermájának mélyhűtésére. A védőanyagok közül, a metanolt, dimetil-acetamidot, DMSO-t (dimetil-szulfoxid), és etilén-glikolt alkalmazták leginkább a kutatók a tokfélék spermájának mélyhűtése során (Billard et al. 2004). A hűtési sebesség kevésbé kutatott témának bizonyult napjainkig a tokfélék körében. A viza esetében Aramli et al. (2015a) gyors, 40°C/perces fagyasztással értek el jó eredményeket. Az utóbbi időben sokat kutatott témává vált a sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata. Aramli és Nazari (2014), valamint Aramli et al. (2015b) a perzsa tokon és vizán végzett kutatásaik során a fagyasztott majd felolvasztott spermaminták 30 percig őrizték meg a minőségüket. A mélyhűtés befolyásolhatja a spermamintákban végbemenő enzimatikus folyamatokat számos tokfélében (kecsege, lénai tok, vágótok, perzsa tok, viza), ami jó indikátora lehet a fagyasztás sikerességének, és a sejtmembránban végbement feolvasztás utáni esetleges szerkezeti változásoknak (Aramli et al. 2014, Aramli 2015, Huang et al. 2014, Sarosiek et al. 2004). A fagyasztott spermát sikeresen alkalmazták androgenezis során lénai, vágótok, sőregtok és viza esetében (Grunina et al. 2006 és 2011), valamint alkalmazták hibridek előállítására (kecsege×vágótok és kecsege×atlanti tok) (Urbányi et al. 2004).

2.3.2. Spermavizsgálat és- mélyhűtés eredményei sügérfélékben

A sügérfélék spermájának vizsgálata viszonylag újkeletű, az első kísérleteket a családba tartozó fajok tenyésztésbe vételével egy időben végezték. Az északi süllő (*Sander vitreus*) spermája hűtött körülmények között akár 10 napig is eltárolható (Satterfield és Flickinger 1995). Rougeot et al. (2004) kutatásukban hagyományos és ivarátfordított sügér tejesek spermájának minőségét hasonlították össze és nem találtak különbséget az ivartermék minőségében a két típus között. Ugyancsak a sügér esetében lengyel kutatók megállapították, hogy az ívási időszak során a vízhőmérséklet befolyásolja a tejesek heréjének anatómiai adottságait és azok működését (Król et al. 2006). Alavi et al. 2007-ben egy átfogó vizsgálatban kutatták, hogy a sügérsperma motilitása milyen mértékben függ az immobilizáló oldat ozmolalitásától és a hígítási aránytól. Az eredmények alapján, a legoptimálisabb hígítási aránynak az 1:50 (sperma: immobilizáló) bizonyult, illetve azt találták, hogy a 300 mOsm/kg ozmolialitású hígító teljes mértékben immobilizálta a spermiumokat. Boryshpolets et al. (2009b) vizsgálatukbban a sügérsperma motilitásának ozmolalitásfüggő sajátosságát fedezték fel. Az ozmolalitás csökkenésével más-más sperma populációk aktiválódtak a mintában a kísérlet során. A sügér esetében bizonyítást nyert, hogy a sperma hígítatlanul és hígítóban egyaránt napokig eltárolható (Sarosiek et al. 2013). Sarosiek et al. (2016) legújabb kutatásukban a süllő (*Sander lucioperca*) fejése során a katéteres és hagyományos

fejést hasonlította össze és arra a következtetésre jutott, hogy a süllő esetében ajánlott a katéter alkalmazása a fejés során, mivel ezzel elkerülhető a sperma szennyeződése vizelettel és az ezzel járó minőségromlás.

A sügérfélék spermájának mélyhűtését illetően kevés szakirodalmi forrás áll rendelkezésrünkre. Moore 1987-ben sikeresen mélyhűtötte az északi süllő spermáját, egy ionokat és cukrot egyaránt tartalmazó hígítóban és 83%-os termékenyülést ért el. Bergeron et al. 2002-es vizsgálatában alacsonyabb termékenyülést ért el Rathbun hígító alkalmazásával. Ciereszko et al. 1993-ban mélyhűtötte a sárga sügér (*Perca flavescens*) spermáját egy szacharóz alapú hígítóval, melyhez DMSO-t alkalmazott védőanyagként. A sügér esetében glükóz alapú hígító és metanol, illetve DMSO védőanyagok alkalmazása mellett 40-40%-os motilitás és termékenyülési eredményről számoltak be kutatók (Rodina et al. 2008, Dzyuba et al. 2010). Bokor et al. 2007-ben közölt kutatásában a süllő esetében 43%-os termékenyülést ért el glükóz hígító és DMSO védőanyag kombinációjával, míg kősüllő esetében a termékenyülés 60% volt glükóz hígító és metanol alkalmazása mellett. A szerzők később nagy mennyiségű ikratétel (50 g) termékenyítése során alkalmazták sikeresen (kelés: 87%) a mélyhűtött süllő spermát (Bokor et al. 2008).

2.3.3. Spermavizsgálat és -mélyhűtés eredményei pontyfélékben

A ponty nagy múltú keltetőházi szaporításával párhuzamosan (Horváth et al. 1992) már évtizedek óta jelentős figyelem összpontosult a spermájának vizsgálatára és mélyhűtésére, amit a nagyszámú irodalmi adat igazol. Billard et al. (1995b) átfogó cikkében részletesen leírta a sperma általános tulajdonságait (pl. szeminális plazma összetétele, átlagos sejtsűrűség), valamint a motilitás (pl. időtartam, energiafelhasználás a mozgás során stb.) és a mesterséges termékenyítés jellemzőit.

Az első eredményeket a mélyhűtés témájában Moczarski publikálta 1977-ben. A következő évtizedekben a kutatók számba vettek számos paramétert, ami a módszerek eredményességét döntően befolyásolni képes. A különböző módszereket a kisebb-nagyobb sikerrel alkalmazták a sperma fagyasztása során (Bozkurt et al. 2014, Dzyuba et al. 2013, Horváth et al. 2003, Kurokura et al. 1984, Ögretmen at al. 2014). Nagy figyelem szegeződött a sperma mélyhűtése során alkalmazott hígítási arányokra (sperma: hígító+védőanyag). A kutatók széles skálán (1:1-1:9) tesztelték a hígítás hatását (Horváth et al. 2007, Lahnsteiner et al. 2000, Li et al. 2013, Linhart et al. 2000, Warnecke és Pluta 2003). Fontos tényező a sperma optimális hűtési sebessége, melyet hagyományos és modern módszerekkel egyaránt vizsgáltak a ponty esetében. Irawan et al. 2010-ben a műszalmák nitrogén fölötti távolságának (2-6 cm) növelésével, illetve csökkentésével próbálta lassítani és gyorsítani a folyamatot, ilyen módon tesztelve a hűtési folyamatok hatékonyságát. Modernebb eljárás a hűtési sebesség tesztelésére a programozható fagyasztó berendezés használata, amivel a kontrollált környezet miatt egységesebb, pontosabb eredményeket kaphatunk (Babiak et al. 1999, Butler és Pegg 2012). Warnecke és Pluta (2003) alacsony hűtési sebességek (3 és 6 °C/perc) összehasonlítása során alkalmazták hatékonyan a berendezést a pontysperma mélyhűtésére. Irawan et al. (2010) és Linhart et al. (2000) a ponty mélyhűtött spermájának 105 másodpercig tartó mozgását rögzítették. A sperma felolvasztását követően bizonyítást nyert, hogy a spermiumok spontán aktivációja bekövetkezhet, ami ugyanakkor nem befolyásolta negatívan a sejtek termékenyítő képességét (Boryspholets et al. 2009a). Kevés irodalmi forrás foglalkozott napjainkig a tej felolvasztás utáni tárolhatóságával ponty esetében. Boryspholets et al. (2009a) eredményeik szerint a 10 perces tárolás nem

befolyásolta a minták minőségét. A ponty mélyhűtött spermájával végrehajtott termékenyítés számos esetben igen magas termékenyülést eredményezett (Horváth et al. 2003: 74%, Irawan et al. 2010: 74%, Lahnsteiner et al. 2003: 55-60%). Az eljárásokat azonban csak kevés esetben vizsgálták nagy mennyiségű sperma mélyhűtésére (Horváth et al. 2007, Lahnsteiner et al. 2003).

A szisztematikus vizsgálatok ellenére mindmáig nem született egységes és minden körülmények között nagy hatásfokkal működő protokoll a pontysperma mélyhűtésére. A módszer alkalmazása nem épült be a faj keltetőházi szaporításának folyamatába. A kutatók kisebb hangsúlyt fektettek az egyéb pontyfélék spermájának mélyhűtésére. Compós esetében Rodina et al. (2007, kelés: 39%) és Lujić et al. (2015, kelés: 80%) eredményesen alkalmazták a felolvasztott spermát a termékenyítés során. Lahnsteiner et al. 2003-ban hatékony spermamélyhűtési módszert publikált az állas küsz (*Chalcalburnus chalcoides*), a paduc (*Chondrostoma nasus*), a márna (*Barbus barbus*) és a gyöngyös koncér (*Rutilus meidingeri*) fajokra (legmagasabb kelés: 63-82%). Ugyancsak Lahnsteiner et al. (2000) mélyhűtötte eredményesen az amur (*Ctenouharyngodon idella*), fehér busa (*Hypophthalmichthys molitrix*), a fejes domolykó (*Leuciscus cephalus*) és szilvaorrú keszeg spermáját (*Vimba vimba*) (felolvasztás utáni motilitás: 36-65%). Babiak et al. (1998) sikeresen alkalmazta a felolvasztott balin (*Aspius aspius)* spermát a termékenyítés során (termékenyülés: 62%). Alvarez et al. (2003) a fehér busa esetében alkalmazta eredményesen a spermamélyhűtést keltetőházi keretek között (kelés: 53%). Urbányi et al. 2006-ban magas termékenyülési eredményekről számolt be bodorka (*Rutilus rutilus*), dévérkeszeg (*Abramis brama*), karikakeszeg (*Blicca bjoerkna*) és márna fajokban (kelés: 54-74%). Dietrich et al. 2015-ben megjelent tanulmányában közölte egy cselle faj (*Eupallasella percnurus*) spermájának sikeres mélyhűtését.

Az aranyhal, a díszhaltenyésztés és kutatás szempontjából (modelállat pl. Shaluei et al. 2013, Wang et al. 2015) egyaránt jelentős halfaj. Az aranyhal-sperma motilitását a többi pontyféléhez hasonlóan (ponty, széles kárász-*Carassius carassius*) a környezet (természetben víz, vagy mesterséges aktiváló oldat) ozmolalitásának csökkenése aktiválja (Morisawa et al. 1983). A mozgás átlagos időtartama 100 másodperc volt (Browne et al. 2015). A sperma, fejés után akár 6 napig is tárolható kalcium mentes HBSS oldatban (Glenn et al. 2011). A savas környezet még rövid idejű tárolás alatt is a motilitás csökkenését eredményezi (Chantzaropoulos et al. 2015). Taghizadeh et al. (2013) sikeresen mélyhűtötte az aranyhal spermáját, cukrot és sót egyaránt tartalmazó hígító és DMSO alkalmazásával. Nathanailides et al. (2011) vizsgálatukban különböző védőanyagok toxicitásának vizsgálata során 10 és 5% tojássárgájával, illetve DMSO-val kezelt sperma esetében azt tapasztalták, hogy a DNS kevésbé károsodott a mélyhűtés következtében, mint a 10% etilén-glikollal fagyasztott (kezelt) csoportban. Kutluyer et al. (2015) kutatásukban eredményesen alkalmazták az aranyhal sperma fagyasztásához a 0,1 ml-es pelletet (felolvasztás utáni motilitás: 45%). Az eredmények továbbá azt mutatták, hogy az L-metionin csökkentette a DNS károsodását a sejtekben. A mélyhűtött aranyhalspermát sikeresen használták fel fajok közötti androgenezisben a ponty esetében (Bercsényi et al. 1998). Az irodalmi adatok a sperma minőségvizsgálatáról és mélyhűtéséről hiányosak. Egységes mélyhűtési protokollal a szakirodalom nem rendelkezik, valamint a különböző változatok spermájának jellemzőit sem ismerjük.

2.3.4. Spermavizsgálat és -mélyhűtés eredményei lazacfélékben

Az első kísérletek többek között a lazac (*Salmo salar*) spermájának mélyhűtésével kezdődtek az 1960-as évek elején. Számos kutató mélyhűtötte a faj spermáját, a felolvasztás után azonban csak minimális (0,5-2%) termékenyülést tudtak elérni (Hoyle és Idler 1968). Hoyle és Idler (1968) kísérletében a felolvasztott lazacsperma termékenyítő-képessége már 18%-os volt. Ott és Horton 1971-ben végzett kutatásukban a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) spermáját mélyhűtötték sikeresen. A felolvasztott minták termékenyítő-képessége átlagosan 59%-os volt. A következő 40 évben a figyelem középpontjába került a mélyhűtést befolyásoló tényezők vizsgálata, valamint az adott fajokra tökéletesített hűtési eljárások kidolgozása. Stein és Bayrle 1978-ban végzett kutatásában pontyfélék és pisztrángfélék spermájának mélyhűtését vizsgálták. A spermiumok mozgékonysága hasonló volt az aktivációt követően. A pisztrángfélék mélyhűtött mintája sokkal jobb termékenyítő képességgel bírt felolvasztás után, mint a pontyféléké. Billard (1983) kutatásában sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) és szivárványos pisztráng mélyhűtött spermiumainak morfológiáját, sótűrését és az általa kifejlesztett termékenyítőoldat hatását vizsgálta. Az eredmények azt mutatták, hogy a két faj esetében a Billard (1977) féle oldat növeli a mélyhűtött sperma termékenyítőképességét, viszont a hűtés során a sejtek egy része deformálódik, és termékenyítésre képtelenné válik. Erdahl et al. (1984) kutatásukban a szivárványos pisztráng, a sebes pisztráng, valamint a pataki szajbling (*Salvelinus fontinalis*) spermamélyhűtését befolyásoló tényezőket vizsgálták. Az eredmények azt mutatták, hogy a védőanyag fajtája, valamint a hűtés előtti tárolási hőmérséklet és idő egyaránt befolyásolják a felolvasztás utáni termékenyítőképességet a vizsgált fajok esetében. Schmidt-Baulain és Holtz (1989) munkájukban azt vizsgálták, hogy van-e összefüggés a szivárványos pisztráng spermájának mélyhűtése előtt eltelt tárolási idő és a felolvasztás utáni termékenyülés között. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a mintát a gyűjtés után azonnal mélyhűteni kell, mert a hosszú tárolási idő rontja a sperma minőségét és termékenyítő-képességét. Wheeler és Thorgaard 1991-ben sikeresen mélyhűtötték nagy mennyiségben a szivárványos pisztráng spermáját. A módszer jól alkalmazható volt a laboratóriumi körülmények mellett a gazdasági termelésben is. Lahnsteiner et al. (1996a) vizsgálatukban arra keresték a választ, hogy a hűtési folyamatoknak milyen élettani és anyagcserét befolyásoló hatásai vannak a szivárványos pisztráng spermiumaira nézve. Az eredmények azt mutatták, hogy számos sejtműködésben nélkülözhetetlen enzim, valamint a sejt önfenntartó működéséhez energiát biztosító ATP mennyisége is csökken a mélyhűtés során. Egy másik vizsgálatukban a pénzes pér (*Thymallus thymallus*) és a dunai galóca (*Hucho hucho*) spermamélyhűtését vizsgálták (Lahnsteiner et al. 1996d). Egy, a pisztrángfélékre kifejlesztett hűtési eljárást alkalmaztak (Lahnsteiner et al. 1995b) és három különböző védőanyag (metanol, glicerol-DMSO keveréke, DMSO), valamint különböző hűtési sebességek hatását vizsgálták a felolvasztás utáni termékenyítő képességre. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a mélyhűtés sokkal nagyobb mértékben károsítja a dunai galóca spermiumait, mint a pérét. A pérből származó mélyhűtött minta eredményesebben termékenyített a galócához képest. A három vizsgált védőanyag közül a metanol volt a legeredményesebb.

Cabrita et al. (1998) vizsgálatuk során bebizonyították, hogy a szivárványos pisztráng spermiumok DNS-e a mélyhűtés hatására töredezik. Az eredmények

továbbá azt is mutatták, hogy a károsodást a hűtési eljárás mellett sokszor a felhasznált védőanyag is okozhatja. A mélyhűtési folyamatok megkezdése előtt ellenőrizni kell az alkalmazni kívánt védőanyag hatását adott faj spermiumaira nézve.

Babiak et al. 2001-ben végzett kutatásukban bebizonyították, hogy összefüggés van a hűtésnél használt hígító összetétele és az equilibrációs idő között. A két tényező külön-külön és együttesen is csökkentheti vagy növelheti a felolvasztás után a sperma termékenyítő képességet a szivárványos pisztráng esetében. Az eredmények alapján arra is rájöttek, hogy a hűtési folyamat során, a sejteken belüli a tejsav-dehidrogenáz és a z aszparaginsav-aminotranszferáz mennyisége csökkenhet, ami gátolja a termékenyülést. Cabrita et al. (2001b) vizsgálatukban sikeresen hajtottak végre spermamélyhűtést nagyméretű (1,8 és 5 ml) műszalmákkal szivárványos pisztráng fajban. Az 1,8 és 5 ml-es műszalmák esetében csak kismértékű csökkenést tapasztaltak a termékenyítő képességben az eddig használt kisebb (0,25 és 0,5 ml) szalmákhoz képest. A módszer akár a tenyésztőmunka során is jól alkalmazható. Labbé és Maisse 2001-es kutatásukban a sebes pisztráng spermiumainak sótűrését vizsgálták. A halakat kilenc hónapon keresztül tengervízben tartották, majd a sperma mélyhűtése és felolvasztása után megvizsgálták a sejtek élet- és termékenyítő-képességét. Az eredmények azt mutatták, hogy a sós környezet okozta ozmotikus sokk nem befolyásolja a felolvasztás utáni termékenyülés esélyét, a spermiumok működését és aktivitását. Sarvi et al. 2006-os kutatásuk során a veszélyeztetett sebes pisztráng alfajaként számon tartott *Salmo trutta caspius* spermamélyhűtését vizsgálták. A hűtésnél használt hígító és a felolvasztás ütemének hatását elemezték a mélyhűtött sperma termékenyítő-képességére. Az eredmények alapján a két tényező között összefüggés állt fenn, mely befolyásolta a termékenyítés sikerességét.

Az évtizedeken át tartó fejlesztés könnyen kezelhető és piaci forgalomba hozható KIT-eket eredményezett (Haffray et al. 2008). Az elmúlt 50 év kutatómunkájának köszönhetően a mélyhűtött sperma termékenyítő-képessége jelentősen emelkedett (40-90%) a legtöbb lazacfélék családjába tartozó faj esetében. Akadnak azonban kis populációval rendelkező, veszélyeztetett taxonok (pl. márványpisztráng-*Salmo marmoratus*, adriai pénzes pér-*Thymallus thymallus*, dunai galóca-*Hucho hucho*), amelyek spermájának mélyhűtéséről keveset tudunk. A pénzes pér és dunai galóca esetében egyaránt eredményes protokollt közöltek Nynca et al. 2015b-ben, habár a glükóz hígító és a metanol, mint védőanyag, eltérő hatásfokkal működött (termékenyülés: dunai galóca-88%, pénzes pér-50%). A fent említett hígító és védőanyag hatásosnak bizonyult a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*), ivarátfordított szivárványos pisztráng, a sebes pisztráng (*Salmo trutta* m. *fario*) és pataki szajbling (*Salvelinus fontinalis*) esetében egyaránt (Ciereszko et al. 2014 és 2015, Nynca et al. 2014, és 2015a). A fent említett vizsgálatok már nagy hangsúlyt fektettek az effektív felolvasztás utáni sperma:ikra arány meghatározására. Golshahi et al. (2015) a kaszpi sebes pisztráng (*Salmo trutta caspius*) esetében végeztek sikeres mélyhűtési kísérletet (70% feletti termékenyülés még 60 perccel a felolvasztást követően), ami nagy jelentősséggel bír az alfaj természetes populációinak csökkenése miatt.

Az adriai pér, a pénzes pér (*Thymallus thymallus*) adriai vérvonalaként természetvédelmi szempontból (az adriai vonal csökkenése és eltűnése) és horgászati szempont egyaránt jelentős taxon. Spermájának mélyhűtését Horváth et al. dolgozták ki. A kutatások eredményességének köszönhetően, a módszer mára a Tolmin-i Horgász Egyesület konzervációbiológiai programjának szerves részét képezi, azaz

bevezetésre került a gyakorlati a keltetőházi szaporításba (Horváth et al. 2012). Az említett példa jól bizonyítja, a mélyhűtés alkalmazhatóságát és potenciálját, a lazacfélék termelésében. A módszerek fejlesztésével és egységesítésével, egyre több faj esetében válik lehetővé az eljárás integrációja.

2.4. A spermamélyhűtés, valamint a sperma-minőségvizsgálat egységesítése és jövője

Számos spermamélyhűtési és -minőségvizsgálati módszer született az évtizedes kutatások során gazdaságilag és természetvédelmi szempontból jelentős halfajok esetében egyaránt. Egyes esetekben az eljárást sikeresen átültették a haltermelés gyakorlatába, de többségében a módszerek alkalmazása még várat magára. A vizsgálati teknikák, valamint a sperma fagyasztva tárolásának és hosszú távú felhasználhatóságának számos előnye ellenére (sperma tárolása a szaporításhoz, szelekciós programok, költségek csökkentése, új iparág teremtése, Cabrita et al. 2010, Tiersch 2008) a gazdasági hasznosítás továbbra is várat magára. A mélyhűtés, szélesebb körben való alkalmazása a modellállatok (zebradánió-*Danio rerio*, medaka-*Oryzias latipes*, mexikói kardfarkú hal-*Xiphophorus helleri*, aranyhal-*Carassius auratus*) körében szintén jelentős potenciállal bír (értékes vonalak spermabankja vagy exportja, a halak tartásának egyszerűsítése, fagyasztott sperma felhasználása a kutatásban), lehetővé téve más tudományterületek fejlődését (genommanipuláció, orvostudomány, ökotoxikológia stb.). Az új teknikák integrálása költséges folyamat (eszközök beszerzése, termelés adaptációja, szakképzett személyzet foglalkoztatottsága), melyet idővel a termelésben, a módszerek alkalmazásának köszönhetően szerzett többletjövedelemből lehet fedezni (Caffey és Tiersch 2000). A gyakorlatban azonban csak egységesen, minden körülmények között, az adott faj vagy fajok esetében magas színvonalon és eredménnyel működő eljárások lehetnek hosszútávon működőképesek. A helyzet megváltozásához a tudomány szintjén van elsődlegesen szükség előrelépésre, esetlegesen szemléletváltásra. A jövő kutatásainak a rendszer egyes részeire kell külön-külön nagy hangsúlyt fektetnie, ami idővel egységes, egész módszert eredményez. Elsődleges lépés a kulcs-paraméterek definiálása úgy, mint a halak tartása és felkészítése (fotoperiódus, hőmérséklet-program, spermatogenezis indukciója, altatás, fejés folyamata), a minták kiválasztása (CASA, hígítók, sejtkoncentráció, mozgás időtartama, tárolás) és a mélyhűtés (hígítók, védőanyagok, ekvilibráció, hűtés módszer-fagyasztó berendezés, hűtési sebesség, szalmaméret, felolvasztási sebesség, felolvasztás utáni tárolás). A jövőben különleges figyelmet érdemel majd a halak takarmányozása és annak hatásai a sperma minőségére, mivel ez indirekt módon befolyásolhatja a mélyhűtés eredményességét (Cabrita et al. 2010, Tiersch 2008).

A módszerek fejlődésének gátat szab a tudományos közleményekben megjelent eredmények összehasonlíthatóságának gyakori hiánya. Szükség van a kutatásban született módszerek pontos leírására, mely nagyban megnöveli az adott fajban leírt eljárások ismételhetőségét (Tiersch 2008). Az említett tényezők együttes sztenderdizálása utat nyithat a spermamélyhűtés és –minőségvizsgálat elterjedésének más haszonállatokhoz hasonlóan (pl. szarvasmarha), a halak körében is. Az elmúlt nyolc évben a halak ivarsejtjeivel foglalkozó kutatók négy, egymást kétévente követő nemzetközi szimpóziumon fogalmazták meg azt az általános igényt, hogy a publikált módszerek ismételhetősége és gyakorlati alkalmazása érdekében kerüljön sor egy laboratóriumok közötti módszertani egységesítésre. A 2011-ben Budapesten

és Gödöllőn megrendezésre került találkozót (3rd International Workshop on the Biology of Fish Gametes) követően a résztvevők (több mint 20 ország képviselői) sikeresen pályáztak az Európai Unió COST programjának támogatására. A pályázat témája és fő célja a halivarsejtek kutatásában használt módszerek egységesítése, sztenderdizálása. A pályázat sikere is jelzi a téma időszerűségét és fontosságát (Aquagamete Cost Action 2015).

10.14751/SZIE.2016.014

10.14751/SZIE.2016.014

3. MÓDSZEREK, EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK A VIZSGÁLT RENDSZERTANI CSOPORTOKBAN

3.1. A spermavizsgálat és -mélyhűtés részfeladatainak általános összefoglalása

A vizsgált halfajokban a használt módszertan egy része megegyezett. A sperma és ikra fejése során az egyedeket 2-fenoxi etanollal (99%, 0,4 ml/l) bódítottam. Az anyákat nedves törölközőre helyeztem és a hasfal masszázsával nyertem ki az ivarterméket. A tejet minden esetben 4 °C-on, az ikrát fajtól függően (meleg és hideg vízben ívó) keltetőházi körülmények között, illetve szintén 4 °C-on (hűtőszekrényben) tároltam.

A friss és felolvasztott spermaminták motilitását számítógépes spermavizsgáló berendezéssel (CASA, Computer-assisted Sperm Analysis) rögzítettem. A munkám során két különböző rendszert alkalmaztam. Magyarországi és szlovén vizsgálataimban a Sperm VisionTM v. 3.7.4. (Minitube of America, Venture Court Verona, Egyesült Államok), Lengyelországban elvégzett kutatásaimban a Sperm Class Analyzer v. 4.0.0. (Microptic S.L., Barcelona, Spanyolország) rendszereket használtam. A sperma aktivációját Makler kamrában (Sefi-Medical Instruments Ltd., Izrael) végeztem fajspecifikus, vagy a kísérleti beállításnak megfelelő oldattal. Az aktiváló oldatokhoz minden esetben 0,01 g/ml szarvasmarha szérum albumin (BSA, bovine serum albumin) kevertem, meggátolva ezzel a sejtek letapadását. Az aktivációt minden esetben legalább 2 ismétlésben végeztem el. Kísérlettől függően a spermiumok pMOT, VCL, és STR értékeit rögzítettem. A paraméterek kiválasztása irodalomban megjelent közlemény alapján történt (Rurangwa et al. 2004, WHO 2010a, Wilson-Leedy és Ingermann 2007). A 3 paraméter a mozgás 3 különböző tulajdonságát írja le a (lásd: **2.2.10. fejezet**)

A mélyhűtés során 0,5 ml-es műszalmákat alkalmaztam. A mintákat különböző hígítókban immobilizáltam (vizsgálat szerint), és 10% metanollal (védőanyag) kevertem össze. Kutatásomban a kísérlettől függően 2 féle mélyhűtési módszert vettem igénybe. A polisztirol hűtődoboz (folyékony nitrogénnel 3 cm magasan feltöltve) alkalmazása során a mintákat egy 3 cm vastag hűtőkereten 3 percig fagyasztottam, majd a szalmákat a nitrogénbe helyeztem 5 percre (Horváth et al. 2012). A másik eljárás során a spermát egy programozható mélyhűtő berendezésben (CRF, Controlled rate freezer, IceCube 14s, IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria) fagyasztottam le (kiindulási hőmérséklet: 7,5 °C, végpont: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc).

A műszalmákat 10 l-es (Bio 20, Statebourne Cryogenincs, Egyesült Királyság) vagy 35 l-es (VWR XSS 48/10, VWR Inernational Kft, Debrecen, Magyarország) úgynevezett kanniszteres kannában tároltam. A mintákat vízfürdőben (ThermoHaake P5, Thermo Electron Corp, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) olvasztottam fel 40 °C-on 13 másodpercig (Horváth et al. 2012).

Az adatok elemzését minden esetben a Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok), SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Egyesült Államok) és GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, Egyesült Államok) felhasználásával végeztem. A felhasznált vegyszereket a Reanal (Budapest, Magyarország), Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) és POCH (Gliwice, Lengyelország) cégektől szereztem

be. A fentiekben részletezett módszertantól való eltéréseket, valamint a módszerek egyedi alkalmazását a továbbiakban az adott fejezetben külön ismertetem.

3.2. Vizsgálatok tokfélékben (*Acipenseridae*)

7. ábra. A lénai tok- *Acipenser baerii.* (Fotó: Bokor Zoltán).

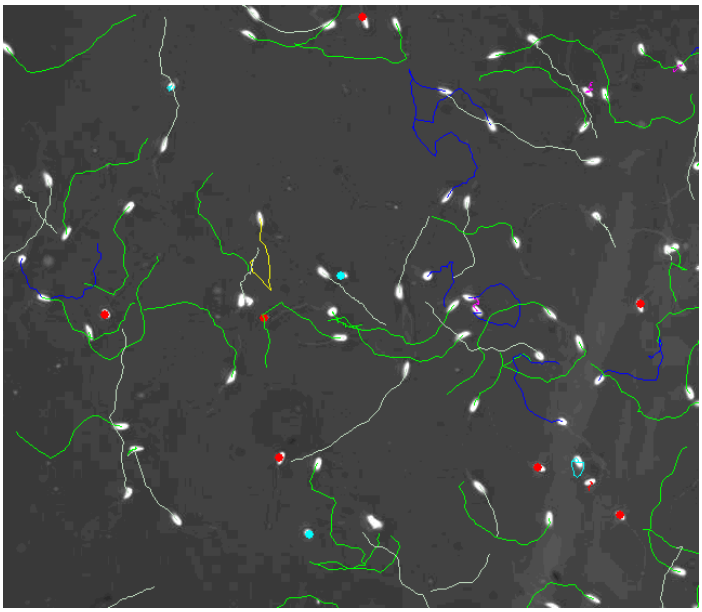
8. ábra. A vágótok-*Acipenser gueldenstaedtii.* (Fotó: Bokor Zoltán)

Mintavétel

A lénai tok és vágótok (**7-8. ábra**) spermamintákat a Neptun Bt. Ercsiben található telephelyén fejték le 2010-ben a Halgazdálkodási Tanszék kollégái. A tárolhatósági vizsgálatot 2012 őszén és 2013 év elején végeztem el. Fajonként 2-2 tejestől sikerült spermát fejni. A halakat a telep munkatársai a fejés előtt szegfűszegolaj oldatával bódították. A mintákat fejés után a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékére szállították.

Motilitásvizsgálat

A frissen lefejt sperma motilitását Zeiss Laboval (Carl Zeiss, Jena, NDK) fénymikroszkóp segítségével határozták meg. A mozgó sejtek arányát vizuálisan becsülték meg. A minták aktiválásához állott csapvizet alkalmaztak. A mélyhűtött, majd felolvasztott minták motilitását CASA berendezés segítségével határoztam meg (**9. ábra**). Az sperma aktivációjához 5 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, (Horváth Ákos szóbeli közlése alapján) összetételű sóoldatot alkalmaztam.



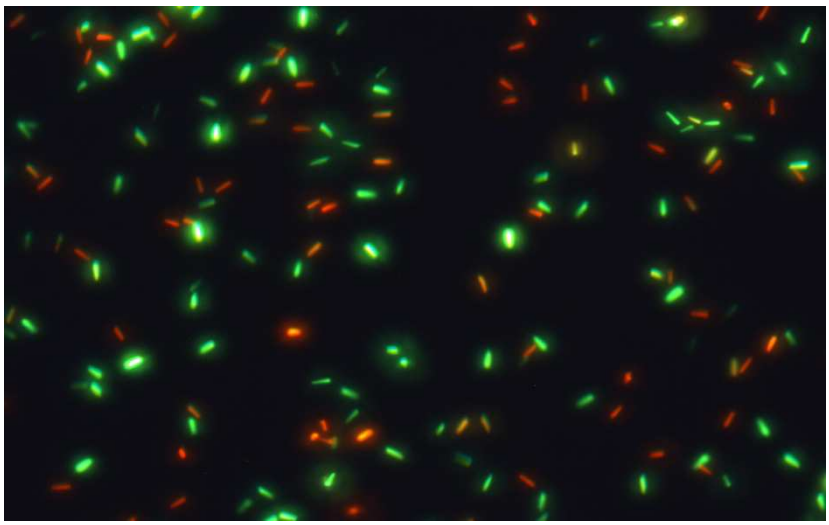
9. ábra. Motilitásvizsgálat CASA berendezéssel. lénai tok felolvasztott spermája haladó mozgást végző (útvonallal jelölt), egy helyben mozgó (kék pont), és statikus sejtekkel (piros pont).

Mélyhűtés és felolvasztás

A mélyhűtést 2010-ben a Halgazdálkodási Tanszék munkatársai végezték el. A lénai tok- és vágótok-sperma mélyhűtésénél úgynevezett módosított Tsvetkova féle hígítót (23,4 mM szacharóz, 0,25 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0, Glogowski et al. 2002), védőanyagot (lásd: **3.1.** fejezet) a spermával összekeverve 1:1 arányban alkalmazták. A polisztirol dobozban lehűtött szalmákat a **3.1.** fejezetben leírtaknak megfelelően tároltam és olvasztottam fel.

A sejtek életképesség-vizsgálata

A sejtek membránszerkezetének állapotát kétféle fluoreszcens sejtfestékkel határoztam meg (**10. ábra**). A sejtek detektálásához egy Nikon Eclipse E600 (Auroscience Kft., Budapest, Magyarország) fluoreszcens fénymikroszkópot, a fényképek rögzítéséhez QImaging MicroPublisher 3.3 digitális kamerát, valamint QCapture Pro 5.1 (QImaging, Surrey, Kanada) szoftvert használtam. A két festék közül a *SYBR green* az élő sejtek membránján áthatolva és a magban működő a DNS-hez kötődve, zöld fluoreszcens fényt bocsát ki. A propídium-jodid (PI) behatolva a sérült membránnal rendelkező (azaz holt) spermiumokba, megfesti a maganyagot és vörös fluoreszcens fényt bocsát ki. A minták életképességét a zöld és vörös sejtek arányával jellemeztem.



10. ábra. Felolvasztott vágótok-sperma életképesség-vizsgálata floureszcens mikroszkóppal. Az ép membránnal rendelkező sejtek zölden, a sérült membránnal rendelkező sejtek pirosan világítanak.

Kísérleti terv

Mélyhűtött toksperma felolvasztás utáni motilitásvizsgálata

Tíz-tíz mélyhűtött lénai tok- és vágótok-spermamintát tartalmazó szalmát a felolvasztás után 12 órán keresztül tároltam nyitott 1,5 ml-es centrifugacsövekben, hűtőszekrényben (4 °C). A spermiumok motilitását óránként rögzítettem.

Mélyhűtött toksperma felolvasztás utáni életképesség-vizsgálata

A két faj 10-10 szalmáját felolvasztottam. A spermát ugyancsak hűtőszekrényben 12 órán át tároltam és 3 óránként festettem meg a fent említett sejtfestékekkel. A spermiumokat fluoreszcens mikroszkóp alatt 200-szoros nagyításon vizsgáltam, majd a zöld és vörös fluoreszcens fényt kibocsátó sejtek arányát meghatároztam (5 kép/minta, 200-1000 spermium).

Adatok elemzése

A mérések eredményeit mindkét faj esetében a vizsgálattól függően 1, illetve 3 órás időintervallumonként átlagoltam. Az adatsorokban a normalitást Kolmogorov-Szmirnov teszt segítségével ellenőriztem (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$). Az értékeket indokolt esetben (nem normális eloszlás) logaritmizáltam, vagy arkusz-szinusz négyzetgyök transzformációt hajtottam végre. Az egyes csoportok összehasonlításánál egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), valamint Tukey vagy Dunett T3 post-hoc teszteket alkalmaztam (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$).

3.2.1. A tokfélékben végzett vizsgálatok eredményei

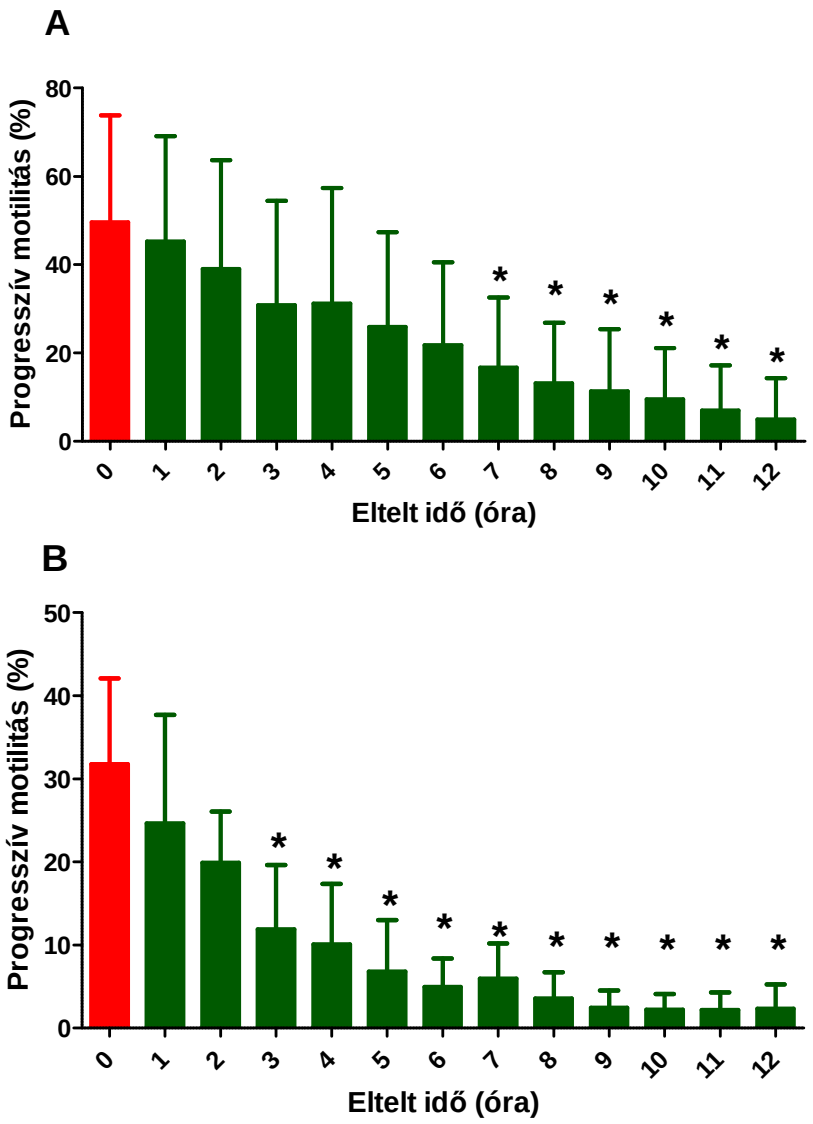
A mélyhűtött lénaitok-sperma motilitása a felolvasztás után eltelt idő hosszával arányosan csökkent. Felolvasztás után átlagosan a sejtek fele mozgott (50±24%), hat órával a felolvasztás után 22±19% átlagos motilitást mértem. A 7. órától kezdődően a mért motilitás értékek statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak a

közvetlenül a 0 óránál mért pMOT értékekhez képest. Felolvasztás után 12 órával a spermiumok progresszív motilitása 5±9% volt.

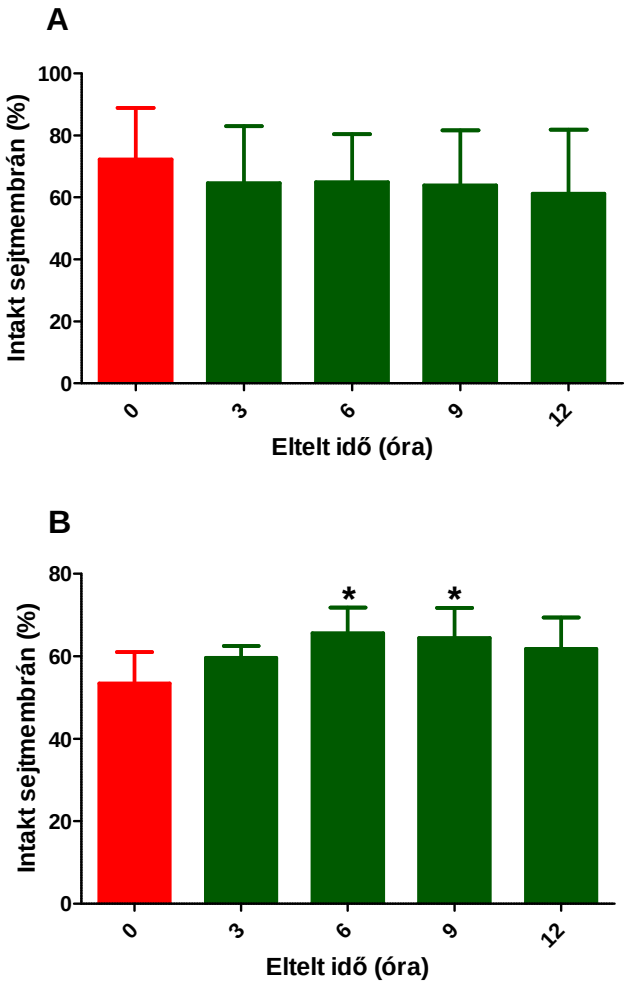
A mélyhűtött vágótok-sperma vizsgálata során a lénai tok esetében tapasztaltakhoz hasonló tendencia volt megfigyelhető. Közvetlenül a felolvasztás után 32±10%-os motilitást mértem, a felolvasztást követő 3. órától kezdődően szignifikáns pMOT csökkenést figyeltem meg. A minta felolvasztása után három órával a progresszív motilitás 12±8% volt, tehát a kiindulási értékhez képest több, mint 50%-ot csökkent. 6 órás tárolási idő után 5±3% motilitást mértem, 12 óra elteltével 2±3% motilitás volt megfigyelhető.

Tizenkét órás hűtve tárolás alatt a felolvasztott lénaitok-spermiumok életképessége nem változott szignifikánsan. Felolvasztás után a sejtek 72±17% rendelkezett ép membránnal. Három, illetve 6 órás tárolás után az életképesség kismértékű csökkenését figyeltem meg (3 óra: 65±18%, 6 óra: 65±15%). A további tárolási idő hatása sem volt jelentős a sejthártya integritására nézve: a sejtek életképessége 9 óra tárolás után 64 ±18%, 12 óra után 61±21 volt.

A felolvasztás utáni hosszútávú tárolás nem volt negatív hatással a mélyhűtött vágótok sperma membránszerkezetére. Közvetlenül a felolvasztás után a spermiumok 53±8%-a rendelkezett ép sejthártyával. Az idő előrehaladtával a sejtek életképessége kismértékben növekvő tendenciát mutatott: a 6, illetve 9 óra tárolás után mért értékek szignifikánsan magasabbak voltak a kiindulási értekhez képest (6 óra: 66±6%, 9 óra: 64±7%). A 12 órával a felolvasztás után mért érték 62±8% volt (**11A és B., 12A és B. ábra**).



11. ábra. A lénai tok (A) és vágótok (B) sperma felolvasztás utáni motilitása az eltelt idő függvényében (*N*=10). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*”-gal jelölt időpontok értékei szignifikánsan különböztek a 0 óránál mért értékektől (*P*≤0,05).



12. ábra. A lénai tok (A) és vágótok (B) sperma felolvasztás utáni membrán integritása (életképessége) az eltelt idő függvényében (*N*=10). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*”-gal jelölt időpontok értékei szignifikánsan különböztek a 0 óránál mért értékektől (*P*≤0,05).

3.2.2. A tokfélékben kapott eredmények értékelése

Eredményeim alapján kijelenthetem, hogy mindkét általam vizsgált tokféle spermája felolvasztás után hosszú ideig tárolható. A lénai tok esetében 7, a vágótoknál 3 órás tárolási idő után tapasztaltam szignifikáns csökkenést, ami tág szállítási vagy felhasználási időintervallumot tesz lehetővé. Dzyuba et al. (1999) mélyhűtött vágótok-, viza- (*Huso huso*), sőregtok- (*Acipenser stel1atus*), kecsege- (*Acipenser ruthenus*), valamint simatok- (*Acipenser nudiventris*) spermával folytatott kutatásaik alapján azt javasolták, hogy a termékenyítést a felolvasztás után azonnal el kell végezni. A szaporítás esetleges elhalasztása esetén a felsorolt fajok felolvasztott spermáját érdemes nagy felületen tárolni. A tárolás során biztosítani kell a 0 °C körüli hőmérsékletet és a sejtek oxigénellátását. Aramli és Nazari 2014-es vizsgálatukban a perzsa tok (*Acipenser persicus*) mélyhűtött spermájának tárolhatóságát vizsgálták felolvasztás után, 30 és 60 percen keresztül. Az eredmények azt mutatták, hogy a minták motilitása és termékenyítő képessége nem csökkent szignifikánsan 30 perc tárolás után a friss kontroll, valamint a felolvasztás után azonnal mért értékekhez képest. Hatvan perc elteltével azonban szignifikáns

csökkenés volt kimutatható a két vizsgált paraméterben. Eredményeimet összevetve az irodalomban leírt adatokkal elmondható, hogy a lénai tok spermája valószínűsíthetően jól, más eddig vizsgált tokfélék spermájához viszonyítva jobban tolerálja a felolvasztás utáni tárolást. A vágótok spermája eredményeim alapján kevésbé tűnik ellenállónak.

A sperma életképesség-vizsgálata (sejtmembrán épségének mérése) során eredményeim azt mutatták, hogy a tárolási idő nem volt hatással a spermiumok sejthártyájának szerkezetére. Horváth et al. (2008) kutatásukban 3 észak-amerikai tokalakú halfaj, a lapátorrú tok (*Polyodon spathula*), a rövidorrú tok (*Acipenser brevirostrum*) és az ásóorrú tok (*Scaphirhynchus albus*) felolvasztott spermájának motilitását, termékenyítő képességét és membránintegritását vizsgálták a mélyhűtés során alkalmazott különböző hígítók és védőanyag koncentrációk függvényében. Eredményeik azt mutatták, hogy a különböző kezelésektől függetlenül, az ép membránszerkezetű sejtek aránya igen alacsony volt a rövidorrú tok esetében és lényegesen magasabbnak bizonyult az ásóorrú tok és a lapátorrú tok fajokban. A motilitás a legtöbb esetben korrelált a sejtek életképességével. Az általunk kapott eredmények és az irodalomi adatok is azt mutatják, hogy a különböző tokfélék spermája eltérő módon képes megőrizni membránja épségét a mélyhűtés során. A spermiumok membrán integritása létfontosságú a termékenyítés során (Horváth et al. 2008). Vizsgálatomban a felolvasztott sperma motilitása az idő előrehaladtával folyamatos csökkenést mutatott. A sejtek életképességének vizsgálatánál nem tapasztaltam hasonló tendenciát.

3.3. Vizsgálatok a sügér fajban (*Perca fluviatilis*)

3.3.1. A sügérsperma minőségvizsgálatának és mélyhűtésének optimalizációja

A halak tartása és a fejése

Vizsgálataimat Lengyelországban, Olsztynban található Warmia és Mazuria Egyetem, Halászati és Környezettudományi Kar, Tavi és Folyóvízi Halászati Tanszékén végeztem 2013. március 11 és április 30 között. A Tanszék halkeltető rendszerében 14 °C-on, egy 100 tejesből (**13. ábra**) és 12 ikrásból álló sügér tenyészállományt tartottak fenn. A halak, a Szczytno városa közelében található Saska folyóból származtak. Fejés előtt csak az ikrás halakat oltották 500 NE/ttkg (Nemzetközi Egység/testtömeg kilogramm) hCG hormonnal (human chorionic gonadotropin, Argent, Egyesült Államok) . Fejés előtt a tejeseket és ikrásokat 150 mg/l MS-222-t (tricain-metánszulfonát, Argent, Egyesült Államok) tartalmazó altató vízben bódítottam. A sperma fejése során katétert alkalmaztam.

13. ábra. Sügér tejes egyed és a lefejt sperma. (Fotó: Kajtár Alexandra)

A friss és mélyhűtött sperma motilitásvizsgálata

A motilitás-vizsgálatokat számítógépes spermavizsgáló rendszer segítségével végeztem. A minták előhígításához és aktivációjához a következő oldatokat alkalmaztam a kísérleti elrendezéstől függően:

Immobilizáló oldatok/hígítók

1. Pér hígító [Ph]: 200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0 (Horváth et al. 2012).

2. Módosított Tanaka hígító [Th]: (137 mM NaCl, 76,2 mM $NaHCO_3$, pH beállítás nem történt, Szabó et al. 2005).

3. Módosított Lahnsteiner-féle immobilizáló oldat [Li]: 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 1 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$, 20 mM Tris, pH 8,0 (Lahnsteiner 2011b).

Aktiváló oldatok

1. Módosított Pontyfélék aktiválóoldata (Pa): 45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0 (Saad et al. 1988).

2. Lahnsteiner-féle általános sügér aktiválóoldat (Sa): 50 mM NaCl, pH 8,0 (Lahnsteiner 2011b).

3. Módosított Lahnsteiner-féle aktiváló oldat (La): 75 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 1 mM $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 20 mM Tris, pH 8,0 (Lahnsteiner 2011b)

4. Woynárovich oldat (Wo): 4 g/l NaCl és 3 g/l karbamid pH 8,0 (Woynárovich és Woynárovich 1980).

A spermavizsgálatot a friss és mélyhűtött sperma esetében egyaránt fejés illetve felovasztás után, vagy kísérlettől függően adott tárolási idő után végeztem el. A progresszív motilitás rögzítéséhez, a frissen lefejt spermát a minta sűrűségétől függően 1:50 és 1:100 arányban hígítottam az adott hígítóban. Az így kihígított és a felolvasztott spermát az adott kísérletben megválasztott aktiváló oldatokban

aktiváltam. Az ettől eltérő módszertant az adott kísérlet tárgyalásakor részletesen is ismertetem.

A sperma mélyhűtése és felolvasztása

A frissen lefejt spermát kísérlettől függően összekevertem az immobilizáló oldattal vagy hígítóval (lásd: A friss és mélyhűtött sperma motilitás vizsgálata), valamint védőanyaggal (lásd: **3.1.** fejezet). A hígítási arányt (sperma illetve hígító és védőanyag aránya) a kísérleti tervnek megfelelően választottam meg. A fagyasztást polisztirol dobozban végeztem. A mintákat a **3.1.** fejezetben leírtaknak megfelelően tároltam és olvasztottam fel.

Kísérleti terv

A kísérletekben egyedi mintákkal dolgoztam.

A legjobb immobilizáló oldat kiválasztása

Munkám során 10 tejes spermáját fejtem le. A vizsgálatban 3, más fajok esetében gyakran alkalmazott hígítót és immobilizáló oldatot teszteltem. A hígítók közül a Th, Ph és Li oldatoknak a motilitásra gyakorolt hatását hasonlítottam össze 6 órás hígított tárolás közben. A mintákat a médiumokkal való kihígítás után 4 °C-on tároltam, és a motilitásukat 2 óránként mértem meg. A sejtek aktiválásához Sa-t alkalmaztam.

A legjobb aktiváló oldat kiválasztása I.

A vizsgálathoz 10 sügér tejest fejtem le. A friss minták előhígításához a fentebb olvasható mérés során legjobbnak bizonyult Li oldatot alkalmaztam. A vizsgálatok során négyféle, aktiváló oldatot (Pa, Sa, La és Wo) hasonlítottam össze. A spermiumok mozgását az aktivációt követően 10, 30, 60, 90 és 120 másodpercnél rögzítettem.

A legjobb aktiváló oldat kiválasztása II.

Vizsgálatomban a fentebbi mérést ismételtem meg a rögzített időintervallumot lecsökkentve, 10 minta felhasználásával. Az aktiváló oldatok sügérsperma motilitására gyakorolt hatását 20 másodpercen keresztül mértem. Az adatokat 10 illetve 20 mp-nél rögzítettem. A minták kihígításához Li oldatot alkalmaztam.

A frissen lefejt sügérsperma tárolhatóságának vizsgálata

A kísérletben 10 tejes hal spermáját használtam fel. A mintákat előhígítatlanul 4 °C-on 6 órán keresztül tároltam, és óránként megmértem motilitásukat. A mozgás rögzítése során a sejteket a Li-ben hígítottam ki és La-val aktiváltam.

A legjobb spermamélyhűtéshez használt hígító kiválasztása

Vizsgálatom során a Th-t és Li-t mint hűtőmédiumot hasonlítottam össze. A legjobb immobilizáló oldat kiválasztása folyamán azt tapasztaltam, hogy e két oldat immobilizálta sejteket a leghatékonyabban. Hét tejes spermáját használtam ebben a vizsgálatban. A mélyhűtés előtt a friss minták motilitását ellenőriztem Li és La oldatok segítségével. A mélyhűtést Th illetve Li oldatokkal egyaránt elvégeztem minden minta esetében. A spermát 1:40 arányban hígítottam.

A legjobb spermamélyhűtésnél alkalmazott hígítási arány kiválasztása

A vizsgálat során a sügérsperma mélyhűtéséhez legoptimálisabb hígítási arányt kerestem. Tíz tejes hal spermáját használtam ebben a vizsgálatban. A friss minták motilitását a Li és La oldatok felhasználásával ellenőriztem. A mélyhűtés során a következő hígítási arányokat teszteltem minden spermaminta esetében: 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40. Hígítóként már a fentebbi vizsgálatban a legjobban működő Th oldatot alkalmaztam.

A felolvasztott sügérsperma tárolhatósága egy, illetve hat órán keresztül

A felolvasztott spermamintákat 4 °C-on külön vizsgálat keretében 1 és 6 órán keresztül tároltam. A kísérletben 10 tejest fejtem le és valamennyi minta motilitását megmértem. A mélyhűtés során a Th oldatot alkalmaztam. A spermát 1:20 arányban hígítottam ki. A felolvasztott minták motilitását minden 15 percben illetve 2 órában megmértem CASA rendszer segítségével.

A felolvasztott sügérsperma termékenyítő képessége

Munkám során 9 tejes mintáját mélyhűtöttem (Th oldat használatával, 1:20-as hígítási aránnyal) és a felolvasztott mintákkal termékenyítést végeztem. A mélyhűtés előtt és a felolvasztást követően megmértem a sperma motilitását. A vizsgálatban a felolvasztott minták motilitását is rögzítettem. A termékenyítéshez 1 ikrást fejtem le. Minden egyes (műszalma/minta) műszalmával 2 ikratételt (kb. 100-200 ikraszem/ikratétel) termékenyítettem meg. Friss spermával kontroll termékenyítéseket végeztem ugyancsak 2 ikratételnél. Mindkét esetben a lengyel keltető rendszervizét használtam aktiváló oldatként. Az embriókat a keltetőben, átfolyó rendszervízben inkubáltam 14 °C-on. A termékenyülést 3 nap elteltével határoztam meg. A vizsgálat során sztereomikroszkóp (Leica MZ16.5, Wetzlar, Németország) alá helyeztem a mintákat és digitális kamera segítségével rögzítettem a felvételeket. Az embriókat Image J 1.46r szoftver (Image J for Windows, National Institutes of Health, Egyesült Államok) segítségével számoltam le. A termékenyülés arányát a termékenyült (neurula stádiumba lépett embrió) és az összes ikraszem hányadosaként határoztam meg.

Az eredmények értékelése

A statisztikai elemzések során ellenőriztem a csoportok normalitását Shapiro-Wilk teszttel $P \leq 0{,}05$ szignifikancia szinten. Az adatok transzformálására arkusz-szinusz négyzetgyök függvényt alkalmaztam. A kezelési csoportokat egyszempontos

varianciaanalízissel (ANOVA), Student féle független kétmintás t-próbával, valamint, Dunnett T3 és Tukey post-hoc tesztekkel hasonlítottam össze (szignifikancia szint: $P \leq 0,05$).

3.3.2. Két spermamélyhűtési módszer összehasonlítása a sügér fajban

A halak tartása és a mintavétel

Vizsgálataimat egy a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén tartott, 7 tejesből álló sügér állományán végeztem 2014 februárjában. A halakat a babati és az isaszegi 1-es tóból, elektromos halászgép segítségével gyűjtötte Dr. Hegyi Árpád tudományos főmunkatárs. A kísérlet megkezdése előtt a sügér tejeseket 250 NE/ttkg (Nemzetközi Egység/testtömeg kilogramm) hCG (human chorionic gonadotropin, Ferring, Saint Prex, Svájc) hormonnal oltottam 1ml-es injekciós tű segítségével. A mintavétel folyamata meggyezett a **3.1.** fejezetben leírtakkal.

A friss és mélyhűtött sperma motilitásának vizsgálata

A sperma motilitásparamétereit, mélyhűtés előtt és után egyaránt CASA rendszer segítségével rögzítettem (lásd: **3.1.** fejezet). A sejtek mozgását La oldattal aktiváltam (lásd: **3.3.1.** fejezet).

Mélyhűtés és felolvasztás

A mélyhűtés megkezdése előtt a hűtési görbét egy digitális hőmérő szenzor (Digi-Sense DualLogR®, Eutech Instruments Pte Ltd, Szingapúr) segítségével mértem meg 3 cm-el a folyékony nitrogén felülete felett (hűtőprogram meghatározása). A mélyhűtés során a spermát kísérlettől függően 1:5, 1:10 vagy 1:20 arányban kevertem össze Th oldattal és védőanyaggal (Lásd: **3.1.** fejezet). Kísérlettől függően az **3.1.** fejezetben ismertetett polisztirol doboz és CRF módszerét (hűtőprogram: **3.1.** fejezet) alkalmaztam a mélyhűtés során.

Kísérleti elrendezés

<u>A két mélyhűtési módszer összehasonlítása</u>

A protokollok összehasonlítása során 5 egyed spermáját használtam fel. Minden egyedi mintából 2-2 műszalmát töltöttem meg. A mélyhűtést a polisztirol dobozzal, valamint a programozható fagyasztó berendezéssel egyaránt elvégeztem. Mindkét csoportból 1-1 műszalmába a már a fentiekben is említett, illetve a programozható fagyasztó berendezésbe beépítve található digitális hőmérő szenzort helyeztem. A mélyhűtés során rögzítettem a sperma hűlési sebességét mindkét módszer esetében. Minden egyed mélyhűtött mintájából 1-1 műszalmát a motilitás paraméterek vizsgálatára használtam fel.

<u>A megfelelő hígítási arány kiválasztása a CRF-hez</u>

A kísérlet során 4 tejes spermáját használtam fel. A mintákat fejést követően összekevertem és megmértem a motilitási paramétereket. A mélyhűtés során a mintát 1:5, 1:10 és 1:20 arányban kevertem össze hígítóval és védőanyaggal. Minden

csoportban 10-10 műszalmát töltöttem meg, majd mélyhűtöttem azokat a programozható fagyasztó berendezéssel. Felolvasztás után rögzítettem a motilitási paramétereket.

Az adatok kiértékelése

Az értékek normális eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztem (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$). A csoportok közötti különbségek bizonyítására egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), és Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmaztam (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$).

3.3.3. Nagy mennyiségű ívási időszakon kívül lefejt sügérsperma mélyhűtése

Halak tartása és fejése

Vizsgálataimat a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén fenntartott, 13 tejes (39-137 g) és 24 ikrás (34-300 g) egyedből álló vadon befogott sügér anyaállományon végeztem. A mélyhűtési kísérleteket ivási időszakon kívül december és február között végeztem el. Vizsgálatomban nem kívántam figyelmet fordítani az ikra szezonon kívüli minőségére, ezért a termékenyítésre március végén került sor. Az anyákat minden esetben hormonálisan indukáltam 500 NE/ttkg hCG (Nemzetközi Egység/testtömeg kilogramm, human chorionic gonadotropin, Ferring, Saint Prex, Svájc) injekcióval. A tejeseket oltás után 6-9 °C-on 6 napig, az ikrásokat kontrollált hőmérsékleten (12 °C) 2 napig inkubáltam. Az ikrásokat, érettségi állapotuk alapján választottam ki és oltottam be, Żarski et al. (2012b) módszertana alapján. Az egyedek ivarnyílásán keresztül a petefészekből biopsziás mintát vettem egy fecskendőhöz (5 ml) csatlakoztatott katéter segítségével. Egy 6 érettségi állapotból álló osztályozási rendszer szerint az olajcseppek elhelyezkedése alapján meghatároztam az oociták érettségi stádiumát. Az ovulációhoz közeli stádiumok (V-VI) esetében egyetlen nagyobb olacsepp volt található az oocitákban, szemben a I-IV stádiummal ahol az olajcseppek szétszórtan helyezkedtek el a citoplazmában. A 24 ikrásból kísérletemhez hármat jelöltem ki (V-VI. stádium, 150 g feletti testtömeg). Az ikrások ivarnyílását oltás után bevarrtam. A mintavétel megegyezett a **3.1-es** fejezetben leírt módszertannal.

A sperma motilitásvizsgálata

A motilitás paramétereket mélyhűtés előtt, valamint felolvasztás után egyaránt CASA berendezés segítségével elemeztem (lásd: **3.1.** fejezet). Vizsgálataimban a korábban a **3.3.1.** fejezetben már ismertetett 4 különböző aktiváló oldatot alkalmaztam.

Sejtkoncentráció meghatározása

Az egyedileg lefejt mintákat módosított Tanaka hígítóban (Lásd**: 3.3.1.**-es fejezet) immobilizáltam (1:999 sperma:hígító arányban). A kihígított spermát Bürker-típusú sejtszámláló kamrába töltöttem (Marienfield Superior, Paul Marienfield GmBH & CO. KG, Németország). A spermáról digitális kamera és fénymikroszkóp segítségével 200-szoros nagyításon felvételeket készítettem. A sejtkoncentrációt, az Image J 1.48v program (Image J for Windows, National Institutes of Health,

Egyesült Államok) és a következő képlet alkalmazásával álapítottam meg: *Sejtsűrűség/minta = Kapott átlag×25×10×1000×hígítási arány* (Bokor 2009, Horváth 2001).

Mélyhűtés és felolvasztás

Az ívási időszakon kívül lefejt sperma mintákat a kísérlettől függően programozható fagyasztó berendezésben, valamint a polisztirol mélyhűtő hűtődobozban mélyhűtöttem (**3.1.** fejezet). A spermát a kísérleti elrendezésnek megfelelően 1:5, 1:10, vagy 1:20 arányban hígítottam Th oldatban (**3.3.1.** fejezet), amihez védőanyagot (**3.1.** fejezet**)** adagoltam.

Termékenyítés

A termékenyítés során 3 ikrást fejtem le. Az ikraszalagból 23 kísérleti egységet alakítottam ki (kb. 100-200 ikra/egység). Az ívási időszakon kívül mélyhűtött műszalmákból 10-et használtam fel. Minden műszalmával 2 egységet (220 µl hígított sperma/egység) termékenyítettem meg (20 csoport). Az ívási időszakban frissen lefejt spermával (kontroll, 20 µl) 3 csoportot termékenyítettem meg. Aktiváló oldatként az általános sügér aktiválót alkalmaztam (lásd: **3.3.1.** fejezet). A megtermékenyített ikrát 4 napig inkubáltam (10-12 °C-on) műanyag poharakban, ahol a víz áramlása biztosított volt. A vizet napi rendszerességgel frissítettem. A termékenyülést, a gerinchúros állapotba lépett ikraszemek és az összes ikraszem hányadosaként határoztam meg sztereomikroszkópos vizsgálatot követően (Carl Ceiss Jena Technival, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Németország) (**14. ábra**).

Kísérleti elrendezés

<u>Az ekvilibrációs idő, kihígított és felolvasztott sperma motiltitására kifejtett hatásának vizsgálata</u>

Öt egyed friss spermáját külön 1:20 arányban hígítottam. A mintákat polisztirol dobozban mélyhűtöttem az ekvilibrációs időnek megfelelően 0, 30 majd 60 perc elteltével. A motilitás paramétereket rögzítettem fejés után (kontroll), a kihígított sperma esetében 0, 30 és 60 perc elteltével, végül a különböző időpontokban fagyasztott minták esetében a felolvasztást követően. Az aktiváció során, La-t alkalmaztam (lásd: **3.3.1.** fejezet).

<u>A felolvasztás utáni progresszív motilitás, hígítási arány és sejtkoncentráció közötti összefüggés vizsgálata</u>

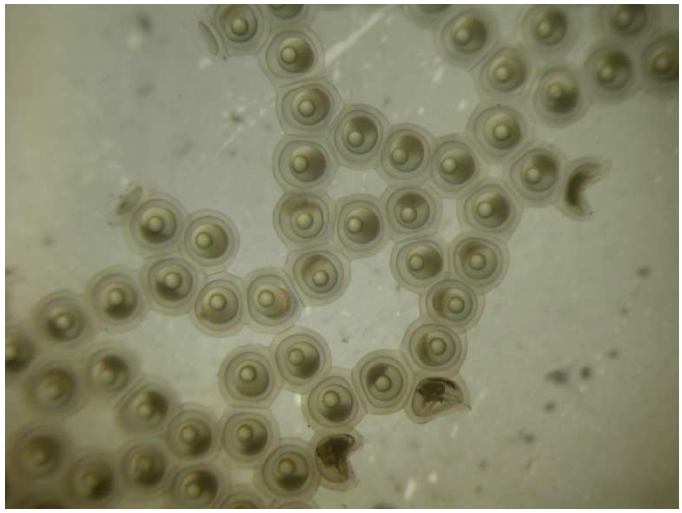
Az öt tejestől származó spermaminták sejtkoncentrációját egyedileg meghatároztam, majd azokat CRF segítségével 1:5, 1:10 és 1:20 hígítási aránnyal mélyhűtöttem. Vizsgáltam a statisztikai összefüggést a felolvasztott minták progresszív motilitása, hígítási aránya és sejtsűtrűsége között. A sejteket La-val aktiváltam (lásd: **3.3.1.** fejezet).

Felolvasztás utáni mozgás időtartamának összehasonlítása négy féle aktiváló oldatban

Hat, egyenként 1:10 arányban (a fentebbi kísérlet eredménye alapján) CRF felhasználásával mélyhűtött mintát felolvasztás után 4 különböző aktiváló oldatban egyedileg aktiváltam (lásd: **3.3.1.** fejezet). A motilitás paramétereket aktiváció után 10, 20, 30, 60, 90 és 120 másodperccel mértem meg.

Szezonon kívül, nagy mennyiségben mélyhűtött sperma felhasználása a termékenyítés során

Hat, ívási időszakon kívül lefejt tejes egyed kevert mintáját (3,05 ml) 1:10 arányban mélyhűtöttem CRF segítségével. A 67 db lefagyasztott műszalmából az ívás időszakban tizet véletlenszerűen kiválasztottam és termékenyítési kísérleteket végeztem velük. A lefejt ikra minőségének ellenőrzésére kontroll termékenyítéseket végeztem 3 tejes frissen lefejt spermamintájával. A mélyhűtést az ívási időszakon kívül februárban, a termékenyítést az ívási időszakban, márciusban hajtottam végre. A megmaradt 57 műszalma motilitási paramétereit felolvasztás után rögzítettem. Az aktivációt Sa-val végeztem el (a fentebbi kísérlet eredménye alapján).



14. ábra. Megtermékenyített ikraszalag. A termékenyült szemek morula állapotban láthatók. (Fotó: Bokor Zoltán)

Az adatok elemzése

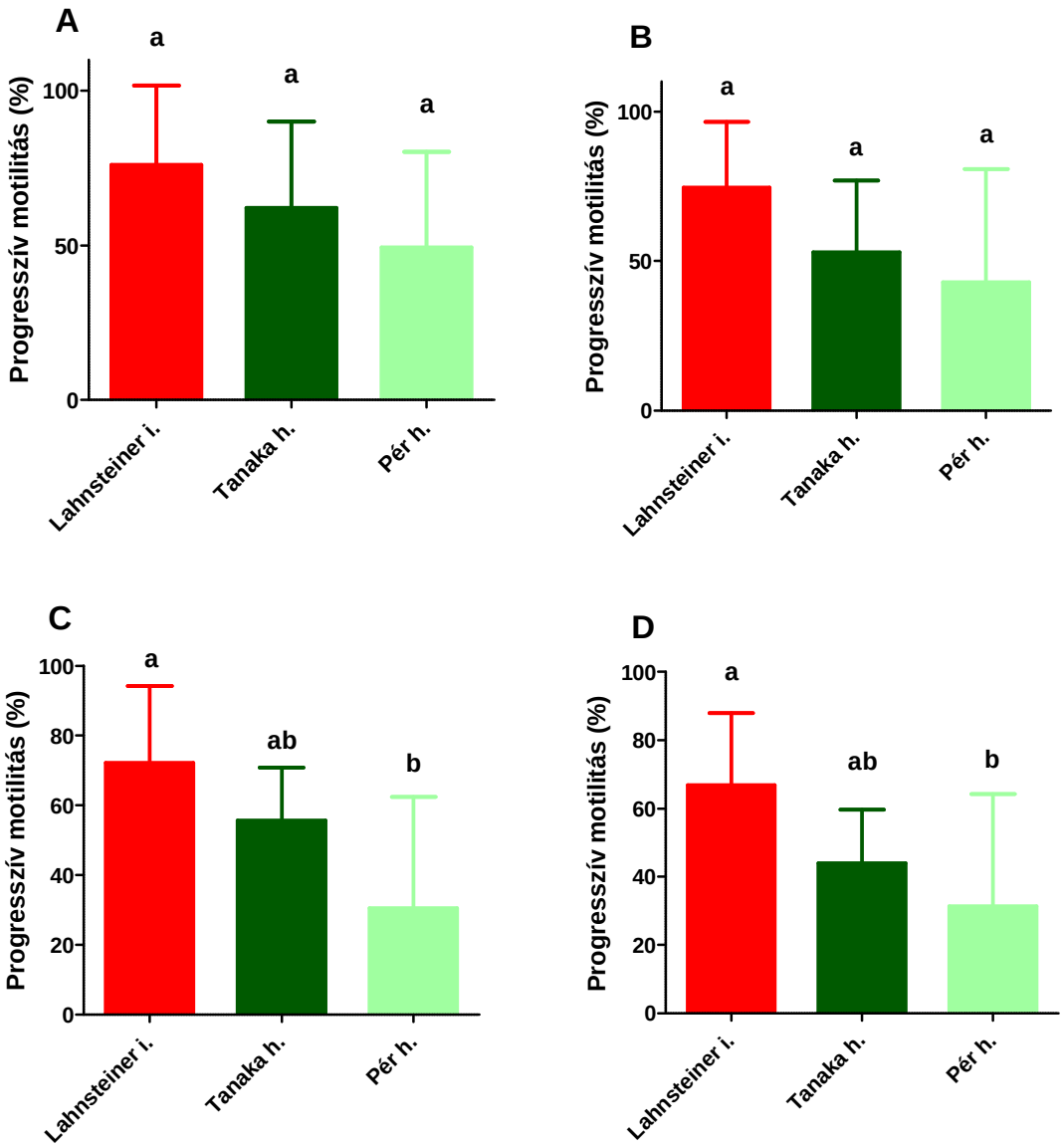
Az adatsorok normalitását Kolmogorov-Smirnov- és Jarque-Berraval-próbákkal ellenőriztem (szignifikancia szint $P \leq 0{,}05$). Az értékeket indokolt esetben (nem normális eloszlás) logaritmizáltam, vagy arkusz-szinusz négyzetgyök transzformációt hajtottam végre. A korrelációszámítás során általánosított lineáris modellt és többtényezős regressziót alkalmaztam (szignifikancia szint $P \leq 0{,}05$). A csoportok összehasonlítása során egyszempontos variancianalízist, Student-féle független kétmintás t-próbát, valamint Welch és Mann Whitney teszteket használtam fel $P \leq 0{,}05$ szignifikancia szinten. A páronkénti összehasonlításra Tukey és Dunett T3 teszteket alkalmaztam $P \leq 0{,}05$ szignifikancia szinten.

3.3.4. A sügér fajban végzett vizsgálatok eredményei

A sügérsperma minőségvizsgálatának és mélyhűtésének optimalizálása

Az optimális immobilizáló oldat kiválasztása

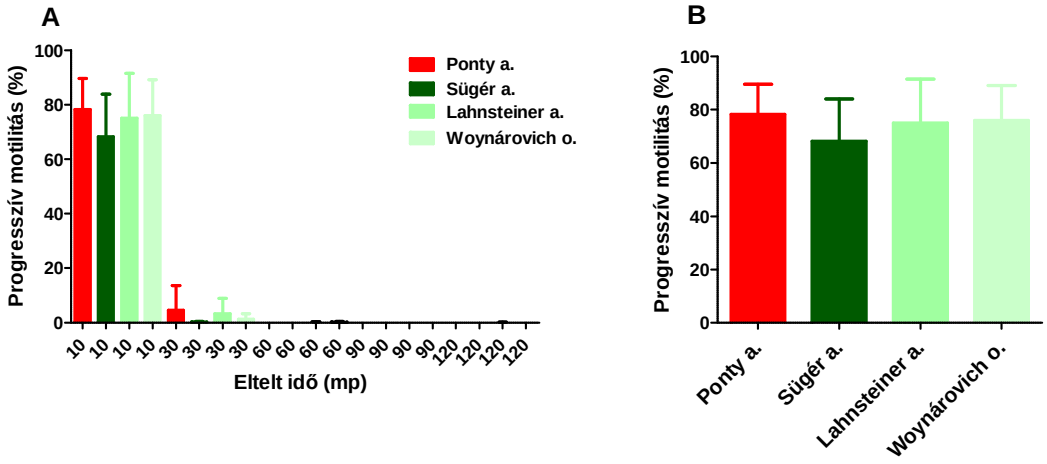
A legmagasabb pMOT mind a négy mérési időpontban Lahnsteiner féle immobilizáló oldat használatakor volt megfigyelhető. A motilitás csökkenése a tárolási idő során kisebb mértékű volt Li-nél, mint Ph és Th használata során. A Li esetében 4 (72±22%), illetve 6 (67±21%) óránál szignifikánsan magasabb értékeket tapasztaltam, mint a Ph 4 (31±32%), illetve 6 (31±33%) óra elteltével (**15A-D. ábra**).



15. ábra. Sügérsperma progresszív motilitása Lahnsteiner féle immobilizáló oldatban, Tanaka és Pér hígítóban történő tárolás során 0 (A), 2 (B), 4 (C), illetve 6 (D) óra elteltével (*N*=10). Az ábrákon átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

Az optimális aktiváló oldat kiválasztása I.

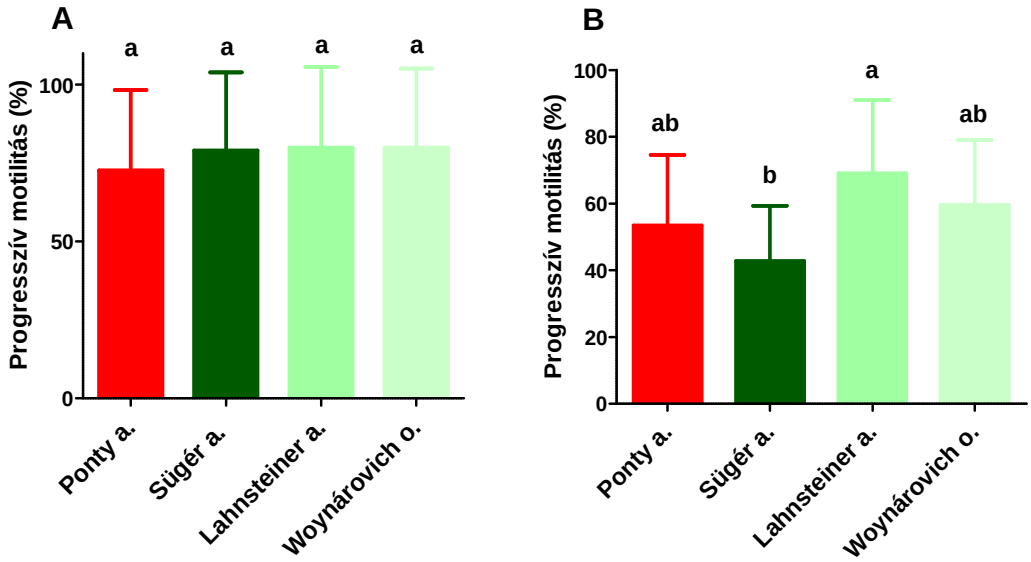
Az aktivációt követő 10. másodpercben mért progresszív motilitás nem különbözött szignifikánsan Pa (78±11%), La (75±16%), Wo (76±13%) és Sa (68±16%) aktiváló oldatok használatakor. Harminc másodperc eltelte után a pMOT 5% alá csökkent minden vizsgált aktiváló oldat esetében (**16A és B. ábra**).



16. ábra. Sügérsperma motilitása 120 másodperces mozgás időtartam mérése során (A). Progresszív motlitás 10 másodperc elteltével (B). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók (*N*=10).

A legjobb aktiváló oldat kiválasztása II.

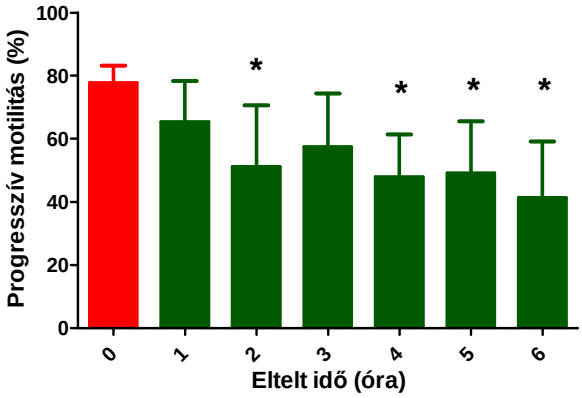
Az aktivációt követő 10. másodpercben mért progresszív motilitás La (80±26%) és Wo (80±25%) használatával volt a legmagasabb. Az aktivációt követő 20 másodperc eltelte után a legkisebb mértékű pMOT-csökkenés La használatával volt tapasztalható (Pa: 73±26-53±21%, Sa: 79±25-43±17%, La: 80±26-69±22%, Wo: 80±25-60±20%). Az aktivációt követő 20 másodperc eltelte után Sa használatával mért motilitás (43±17%) szignifikánsan alacsonyabb volt a La-nál tapasztalt értéknél. Sa esetében a 10, illetve 20 másodpercnél mért motilitás értékek közötti csökkenés szignifikáns volt (**17A és B. ábra**).



17. ábra. Sügér sperma progresszív motilitása 10 (A) és 20 (B) másodpercperc elteltével, 20 másodperces mozgás időtartam mérése során (*N*=10). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

A friss sügérsperma tárolhatóságának vizsgálata

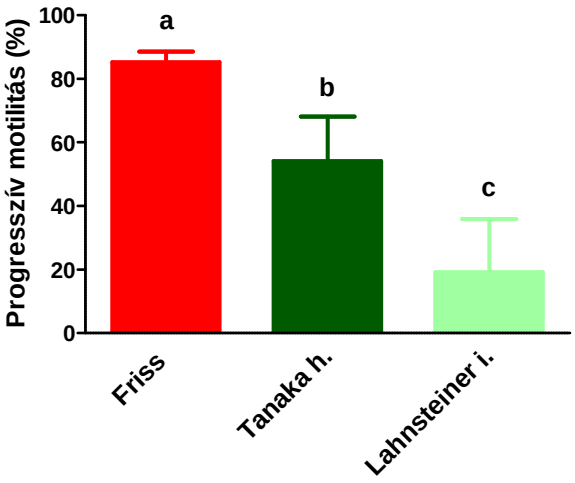
A sperma motilitása a fejést követő 2 óra tárolást követően szignifikánsan csökkent. További két óra elteltével a csökkenés mértéke nem volt olyan jelentős (**18. ábra**).



18. ábra. A sügérsperma 6 órás tárolása során mért progresszív motilitás értékek. Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók (*N*=10). A „*”-gal jelölt időpontok értékei szignifikánsan különböztek a 0 órás mérés értékétől (*P*≤0,05).

Az optimális hígító kiválasztása sperma mélyhűtéséhez

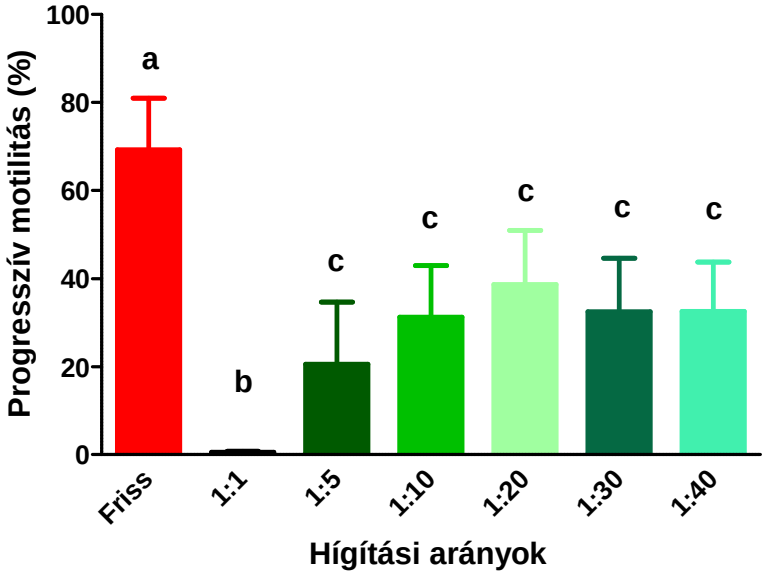
A Th (54±14%) esetében a pMOT szignifikánsan magasabb volt a felolvasztás után, mint Li használatakor (19±17%). A mélyhűtött minták progresszív motilitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll sperma motilitása (85±3%) (**19. ábra**).



19. ábra. Különböző hígítók tesztelése során mért progresszív motilitás értékek. Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók (*N*=7). A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

Az optimális hígítási arány kiválasztása a sperma mélyhűtéséhez

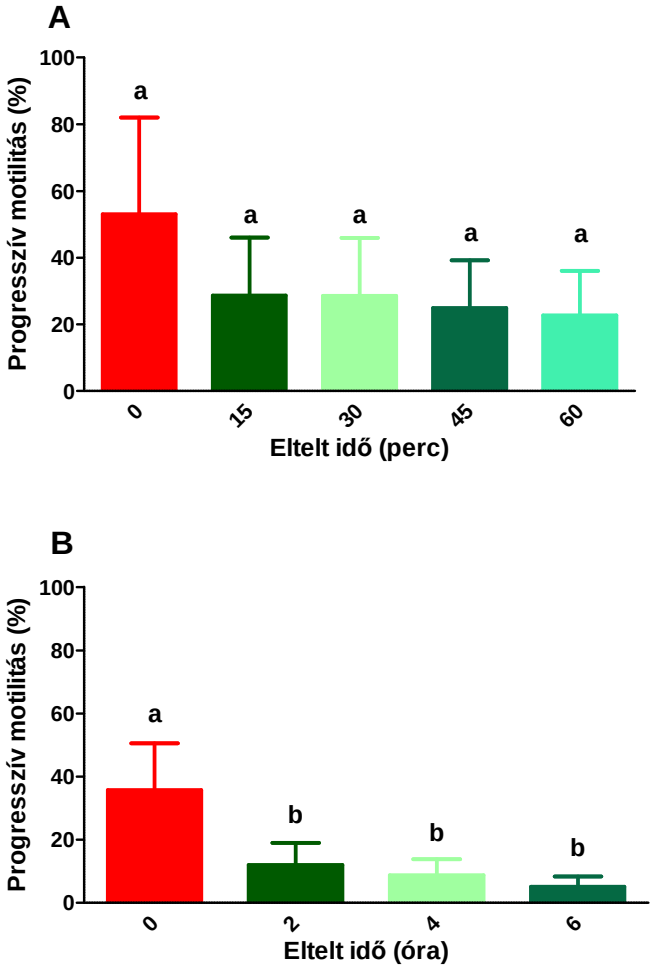
Az 1:1 hígítási aránnyal mélyhűtött mintákban szignifikánsan alacsonyabb motilitást (0.6±0.6%) mértem, mint a nagyobb hígítási aránnyal mélyhűtött mintákban (1:5 hígítás: 21±14%, 1:10 hígítás: 31±12%, 1:20 hígítás: 39±12%, 1:30 hígítás: 33±12%, 1:40 hígítás: 33±11%). A legmagasabb pMOT-t az 1:20-as hígítási aránynál mértem. A friss kontrollhoz viszonyítva az összes mélyhűtött minta progresszív motilitása szignifikánsan csökkent (**20. ábra**).



20. ábra. Különböző hígítási arányok tesztelése során rögzített progresszív motilitás értékek (*N*=10). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

A felolvasztott sügérsperma tárolhatóságának vizsgálata egy illetve hat órán keresztül

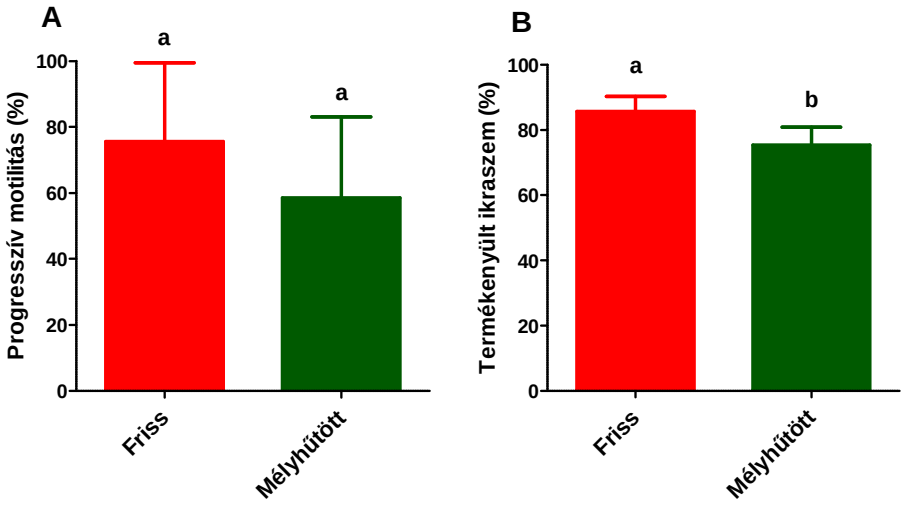
Hatvan perces tárolás során nem tapaszatltam szignifikáns pMOT csökkenést. A felolvasztva tárolt minták motilitása 2 óra elteltével szignifikánsan csökkent (0 óra: 36±15, 2 óra: 12 ±7%, 4 óra: 9±5%, 6 óra 5±3%). A pMOT értéke a következő 4 órában már nem csökkent drasztikusan (**21A és B. ábra**).



21. ábra. 1 (A) illetve 6 (B) órás felolvasztás utáni tárolás során rögzített progresszív motilitás értékek (*N*=10). Az ábrán átlagértékekés a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

A mélyhűtött sügérsperma felolvasztás utáni termékenyítő képességének vizsgálata

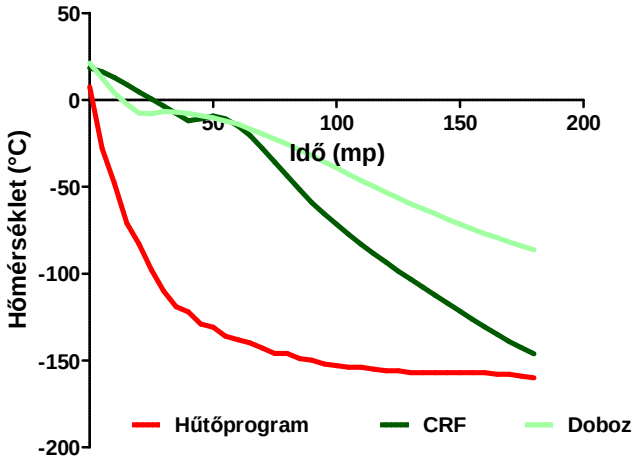
A mélyhűtés során szignifikánsan csökkent a sperma termékenyítő képessége, de a termékenyítési tesztek során még így is magas termékenyülési arányt értem el (friss sperma: 86±5%, mélyhűtött sperma: 75±6%). A pMOT értékek nem mutattak szignifikáns különbséget (friss sperma: 76±24%, mélyhűtött sperma: 58±25%) (**22A és B. ábra**).



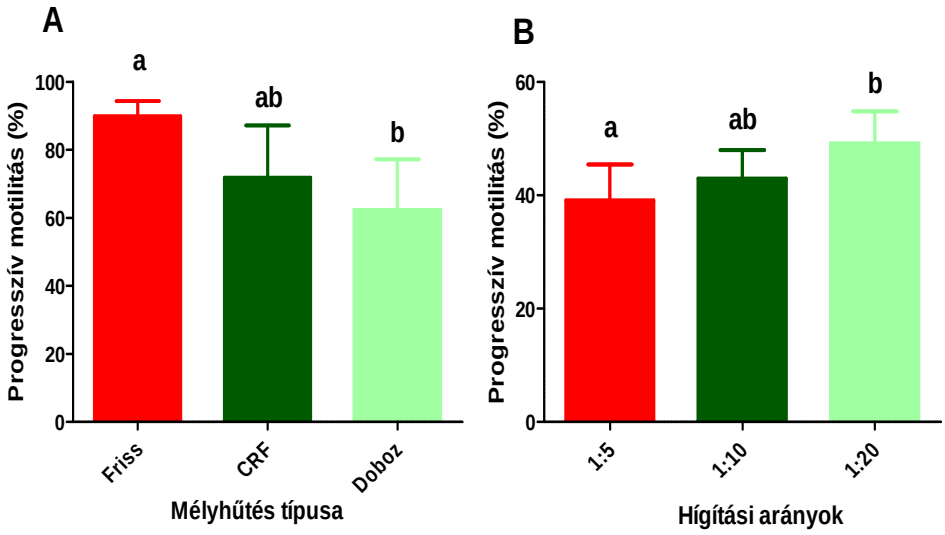
22. ábra. A felolvasztott sügérsperma esetében mért progresszív motilitás (A) és termékenyülés értékek (B). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók (*N*=9). A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

Két spermamélyhűtési módszer összehasonlítása sügér fajban

A két fagyasztási módszer összehasonlítása során egymáshoz hasonló hűtési görbéket rögzítettem. Különbségként megfigyeltem, hogy a CRF használatakor a hűtés kezdetét követő 3. percre -146 °C-ra csökkent a minta hőmérséklete, szemben a dobozban mért -86 °C-kal. A CRF esetében a pMOT (72±15%) és VCL (146±11 µm/s) értékek a friss sperma értékeihez viszonyítva [pMOT (90±4%), VCL (173±24 µm/s)] nem mutattak szignifikáns csökkenést. A dobozban fagyasztott mintáknál rögzített értékek [pMOT (62±15%), VCL (120±21 µm/s)] szignifikánsan különböztek a friss kontrolltól. A két mélyhűtött csoport mintáiban magasabb STR értékeket mértem [CRF (84±4%), doboz (84±2%)], mint a friss kontrollban (68±4%). Egy CRF-fel fagyasztott műszalma esetében kiemelkedően magas, 90%-os progresszív motilitást figyeltem meg. A második kísérletben az 1:20 hígítási aránnyal CRF-fel mélyhűtött mintákban a pMOT (49±6%) szignifikánsan magasabb volt, mint 1:5 hígítás esetében (39±6%). Szignifikánsan magasabb VCL értékeket mértem 1:20 hígítási arány alkalmazása során (129±11 µm/s), mint 1:5 (115±9 µm/s) és 1:10 (112±17 µm/s) arányok esetében. A mélyhűtött csoportok összehasonlítása során, az STR értékek között nem találtam szignifikáns különbséget a (**23., 24A és B. ábra**).



23. ábra. A fagyasztó berendezés (CRF) hűtőprogramjának, a fagyasztó berendezéssel mélyhűtött sügérsperma, valamint a polisztirol dobozban (doboz) mélyhűtött sügérsperma hűtési görbéje.



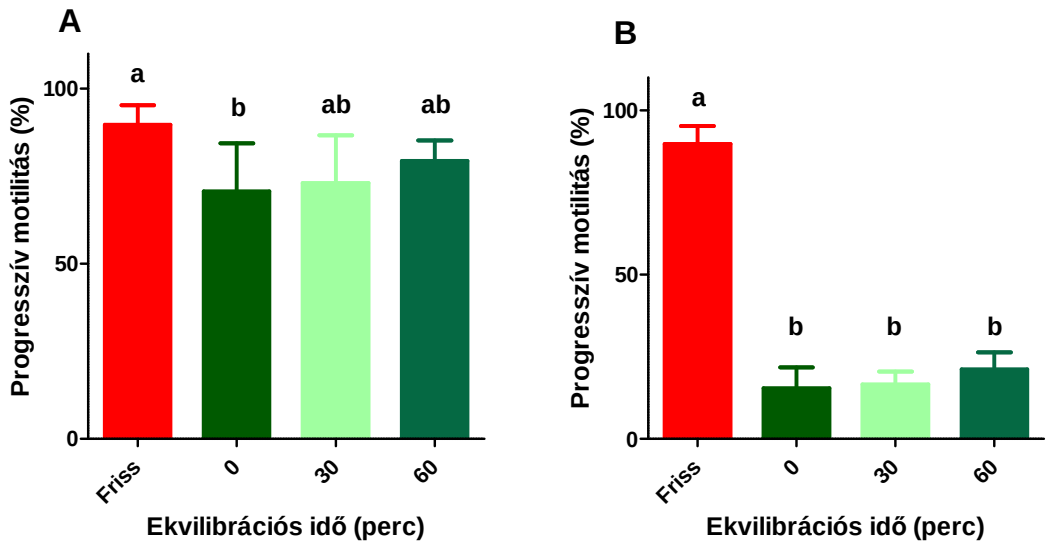
24. ábra. Programozható fagyasztó készülékkel (CRF) és polisztirol dobozban (doboz) mélyhűtött sügérsperma progresszív motilitása (A, *N*=5) és különböző hígítási arányok alkalmazásával mélyhűtött (CRF) sügérsperma felolvasztás utáni progresszív motilitása (B, *N*=10). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0.05).

Szezonon kívül lefejt sügérsperma nagy mennyiségű mélyhűtése

<u>Az ekvilibrációs idő hatásának vizsgálata kihígított és felolvasztott sperma motiltitására</u>

A pMOT és STR értékek esetében nem találtam szignifikáns különbséget a friss, és kihígított minták között 60 perc elteltével. A VCL értékek szignifikánsan csökkentek a friss kontroll csoporthoz (174±9 µm/s) képest az ekvilibrációs idő hatására 30 (146±15 µm/s) illetve 60 (124±18 µm/s) perc elteltével. Minden mélyhűtött mintában szignifikáns csökkenést figyeltem meg mélyhűtött pMOT (0 perc: 15±6%, 30 perc: 17±4%, 60 perc: 21±5%) és VCL (0 perc: 68±5 µm/s:, 30 perc: 75±9 µm/s, 60 perc: 69±10 µm/s) értékekben a friss kontrollhoz viszonyítva

(pMOT: 90±6%:, VCL: 174±9 µm/s). A felolvasztott csoportok motilitás paramétereiben mért értékek között szignifikáns különbséget nem találtam (**25A és B. ábra**).



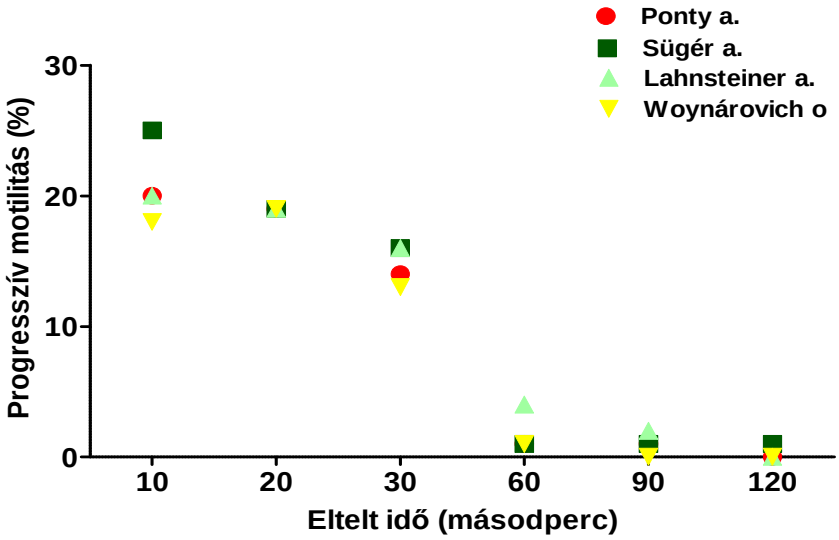
25. ábra. Kihígított (A) és felolvasztás utáni (B) pMOT értékek a különböző ekvilibrációs idők vizsgálata során sügér fajban (*N*=5). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

<u>A felolvasztás után mért progresszív motilitás, hígítási arány és sejtkoncentráció közötti összefüggések vizsgálata</u>

Nem volt szignifikáns különbség a különböző hígítási arányokkal mélyhűtött minták pMOT, STR és VCL értékei között. A pMOT értékek- hígítási arány (p=0,7), és pMOT értékek-sejtkoncentráció (p=0,1) között korrelációt nem tapasztaltam.

Felolvasztás utáni mozgás időtartamának összehasonlítása 4 féle aktiváló oldatban

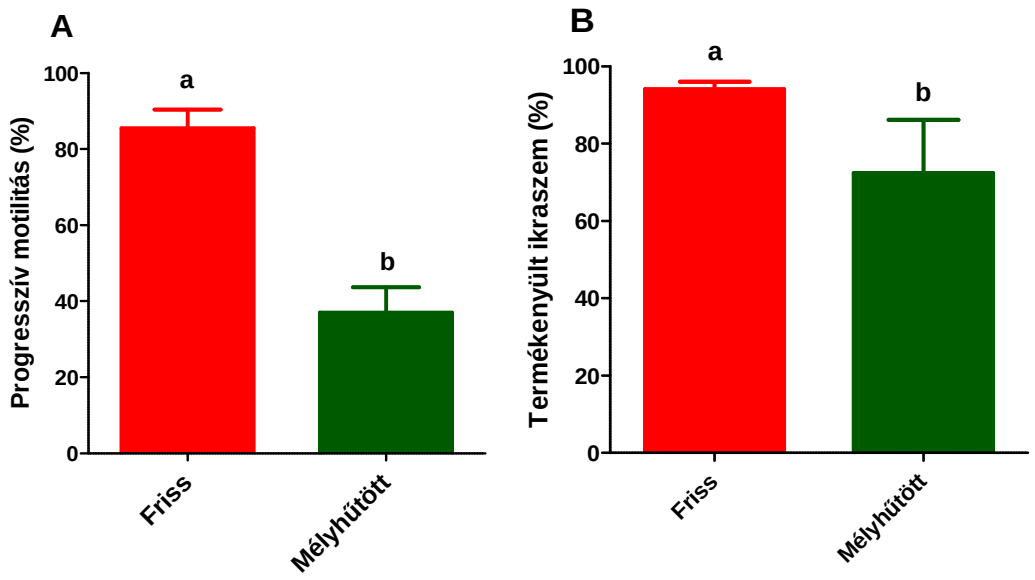
A tesztelt aktiválók között nem találtam különbséget a különböző időpontokban rögzített pMOT, VCL és STR paraméterek vizsgálata során. A felolvasztott sperma motilitása 30 másodperc elteltével lecsökkent mind a 4 aktiváló használata esetében (**26. ábra**).



26. ábra. Négy féle spermaaktiváló összehasonlítása során rögzített felolvasztás utáni pMOT értékek sügér fajban (*N*=6). Az ábrán átlagértékek láthatók.

Ívási időszakon kívül, nagy mennyiségben mélyhűtött sperma felhasználása a termékenyítés során

A nagy mennyiségű szalma mélyhűtése során optimális pMOT (37±7%), VCL (92±10 µm/s) és STR (89±3%) értékeket rögzítettem megfelelő, nem túl magas szórás értékekkel. A fagyasztás hatására a pMOT és VCL értékek szignifikánsan csökkentek a kontrollhoz képest (pMOT: 85±5% és VCL: 139±7 µm/s). Az STR szignifikáns növekedést mutatott (friss kontroll: 75±8%). A felovasztott spermával való termékenyítési teszt során kiváló, 72±14%-os termékenyülést mértem, de ez az érték szignifikánsan alacsonyabb volt a friss spermával való termékenyítéshez képest (94±2%) (**27A és B. ábra**).



27. ábra. Nagy mennyiségű műszalma mélyhűtése során mért pMOT (A), termékenyülés (B), értékek sügér fajban (*N*=6). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

3.3.5. A sügérben végzett vizsgálatok eredményeinek értékelése

A megfelelő immobilizáló oldat kiválasztása kulcsfontosságúnak bizonyult a sügérsperma motilitásvizsgálatának sztenderdizációjában, mert a túl sűrű minták esetében a CASA rendszer nem tudott pontos méréseket végezni. A legalkalmasabb immobilizáló oldatnak az Li bizonyult a 6 órás vizsgálat eredményei alapján. Az oldat a spermiumok ozmotikus viszonyainak szempontjából értékes sókat tartalmaz. Habár az immobilizáló a motilitás megőrzése szempontjából elengedhetetlen K^+ és Ca^{2+} tartalommal bír, az oldat megfelelő ozmolalitása (331 mosmol/kg) és az alkalmazott hígítás (1:50 és 1:100) együttesen eredményezték a sperma sikeres immobilizálását (Alavi et al. 2007).

A sügérsperma aktiváció utáni mozgásának időtartama kulcsfontosságú a precíz motilitás vizsgálati protokoll meghatározásához. A sügérsperma pMOT értékét nem befolyásolta 10 másodperces időintervallum mellett a vizsgált aktiváló oldatok összetétele. Az aktiválás után 30 másodperc elteltével azonban már szignifikáns csökkenés mutatkozott az oldatok között. A mozgás időtartamának növelésére egyik oldat sem volt képes. Alavi et al. (2007) szintén drasztikus motilitáscsökkenésről számolt be a felolvasztás utáni aktivációs idő mérése során. A megismételt rövidebb távú vizsgálatomban azonban La, Pa, és Wo 20 másodperc elteltével eredményességében elkülönült a Sa-tól. Az La esetében Lahnsteiner (2011b) kutatásában beszámolt egy egyedülálló jelenségről, mely szerint a sügérsperma az oldattal történő aktiváció után még 2 óra elteltével is mozgásra képes. A Wo-t Zarski et al. (2012a) vizsgálatukban eredményesen alkalmazták termékenyítésre 180 másodperccel az aktivációt követően. A motilitás mérésére rövid idő (20 másodperc) áll rendelkezésre, de a mérés során Pa, La és Wo azonos sikkerrel alkalmazható.

A sügérsperma fejést követő tárolása nagy jelentősséggel bír a keltetőházi szaporítás, illetve a sperma vizsgálat szempontjából egyaránt. A minták motilitását 2 óra tárolás számottevően befolyásolta. Sarosiek et al. (2013) megállapították, hogy a

sügérsperma natív formában napokig tárolható 4°C-on. Vizsgálataim esetében valószínűsíthető, hogy a tároláshoz használt Eppendorf-típusú centrifugacső nem volt alkalmas a sperma motilitásának megőrzésére. Több kutatásban bizonyították, hogy a halsperma estében a megfelelő oxigénellátottság a tárolás során elengedhetetlen a spermiumok minőségének megőrzéséhez (Cloud és Patton 2009, Saad et al. 1988). Kísérletemben a mintatároló csövek függőleges elhelyezése nem tette lehetővé a sejtek jelentős részének oxigén-utánpótlását (a mérés során felkevertem a mintákat). A tárolás kivitelezése nagyban befolyásolhatja annak sikerességét a sügérsperma esetében.

Kísérleteim során eredményesen alkalmaztam a sügérsperma mélyhűtésésre a korábban az európai angolna sperma fagyasztására használt módosított Tanaka hígítót (Szabó et al. 2005). Korábban hatékonyan mélyhűtötték a sügér spermát Rodina et al. (2008), valamint Dzyuba et al. (2010) 300 mM glükóz tartalmú hígító alkalmazásával. A kapott eredményeim alapján kijelenthetem, hogy a só alapú Tanaka hígító szintén hatékony megoldást jelentethet a fagyasztás során.

Az 1:5 hígításnál magasabb arányok mellett nagyobb felolvasztás utáni progresszív motilitást tapasztaltam, mint 1:1 aránynál. Lahnsteiner (2011a) vizsgálataiban számos lazacfélében [maréna (*Coregonus* sp.), dunai galóca (*Hucho hucho*), szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*), pénzes pér (*Thymallus thymallus*), sebes pisztráng (*Salmo trutta* m. *fario*)] fedezte fel, hogy legalább 3-7-szeres (fajtól függően) hígításra van szükség a sperma sikeres mélyhűtéséhez. Dziewulska és Domagala (2013) tengeri pisztráng (*Salmo trutta m. trutta*) faj esetében bizonyították, hogy a sejtkoncentráció és hígítási arány összefügg az elért motilitással, tehát egy minimális sejtsűrűség ($3\text{-}4\times10^9$/ml) szükséges a magas felolvasztás utáni motilitás eléréséhez. Basavaraja és Hegde 2004-ben leírták, hogy az általuk vizsgált *Tor kudhree* faj spermájának mélyhűtésére hatszorosnál magasabb hígítási arány volt a legeredményesebb. Vizsgálataim során a sügérsperma nagyobb mértékű toleranciát mutatott a fagyasztás okozta sérülésekkel szemben magasabb hígítási arányok mellett (Cloud és Patton 2009).

A felolvasztott sügérsperma motilitására erős negatív hatással volt hosszabb időtartamú tárolás. Egy korábbi kutatásban a nagy rombuszhal (*Scophthalmus maximus*) spermája is hasonló tendenciát mutatott. A szerzők következtetése alapján termékenyítést a felolvasztást követő 1 órán belül kell elvégezni (Dreanno et al. 1997). Babiak et al. (2012) kutatásukban azt találták, hogy fél órás tárolás még nem volt negatív hatással az atlanti tőkehal (*Gadus morhua*) felolvasztott spermájának motilitására. Vizsgálatom alapján a sügérsperma érzékenynek bizonyult a tárolási időre, mivel 2 óra elteltével már szignifikáns csökkenés volt mérhető a progresszív motilitásban.

A mélyhűtött spermát sikeresen használtam fel a termékenyítés során. Közel kétszer akkora termékenyülést értem el a felolvasztott sperma használatakor, mint Rodina et al. (2008) korábbi vizsgálatukban. A magas, 75%-os átlagos termékenyülés az általam kifejlesztett és optimalizált protokoll alkalmazhatóságát támasztotta alá.

A CRF és a doboz egyaránt alkalmasnak bizonyult a sügérsperma mélyhűtésére. Mindkét módszer esetében 50% feletti átlagos pMOT értéket rögzítettem. A sügérsperma magas toleranciát mutatott a CRF-fel történő gyors mélyhűtéssel szemben (hűtés kezdete: 7,5 °C, hűtés befejezése: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc). Aramli et al. (2015a) viza (*Huso huso*) spermán végzett vizsgálatában különbözű hűtési sebességek (10-40 °C) összehasonlításakor a legmagasabb felolvasztás utáni motilitást és termékenyülést, a leggyorsabb

fagyasztás (40 °C/perc) mellett érték el. Esetemben a CRF feltehetően a kontrollált környezetnek köszönhetően működött eredményesebben, mint a hűtőkeret (Butler és Pegg 2012). Viveiros et al. 2000-ben közölt vizsgálatukban az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) spermáját mélyhűtötték kriocsövekben programozható fagyasztó berendezéssel. A felolvasztott sperma minősége – a sügér fajon elért eredményeimhez hasonlóan – nem különbözött a kontrollcsoport értékeitől. A mélyhűtött afrikaiharcsa-sperma a friss spermával azonos arányú termékenyülést eredményezett a keltetőházi szaporítás során.

A fagyasztó berendezés 1:20 hígítási arány mellett működött a legeredményesebben. A kapott eredmény újszerűnek bizonyult az irodalmi adatok ismeretében, hiszen a különböző édesvízi és tengeri halfajok esetében eddig kidolgozásra került specifikus módszerek alapján az effektív hígítási arány átlagosan 1:1-1:9 között alakult (Cabrita et al. 2010). Az 1:10 hígítási arány nem mutatott szignifikáns különbséget az 1:20-tól a pMOT és STR értékek összehasonlítása során.

Az ekvilibrációs idő vizsgálata fontos lépésnek bizonyult az ívási időszakon kívül gyűjtött sügérsperma mélyhűtésénél, a gyakorlati alkalmazás megalapozásához. A progresszív motilitás és STR értékeket nem befolyásolta az 1 órás ekvilibrációs idő. A kihígítva tárolás toxikus lehet a sejtek számára az őket érő ozmotikus sokk miatt (Mazur 1977). A nem megfelelően megválasztott védőanyag és annak helytelenül alkalmazott koncentrációja szintén hátrányos lehet a spermiumok számára (Christensen és Tiersch 2005, Cloud és Patton 2009). Az ekvilibrációs idő, a sejtek fent említett stresszhatásokkal szembeni kitettségét növelheti. Az állítást alátámasztja a gangeszi levélhalban (*Nandus nandus*) végzett kutatás, ahol a spermára 5, 10 és 15% DMSO vagy metanol toxikus hatással volt, hiszen a motilitás már 35 perc elteltével csökkenést mutatott (Sarder et al. 2012). A sügérsperma ellenállónak bizonyult a stresszhatásokkal szemben a kidolgozott mélyhűtési protokoll használatával. A tesztelt időintervallum elegendő időt biztosíthat a jövőben, számos szalma megtöltésére a fagyasztás során.

Az effektív hígítási arány, és optimális sejtkoncentráció közötti összefüggés vizsgálata a sügérsperma mélyhűtésének egységesítésében, az átlagos mintán belüli sejtszám, és a felolvasztás utáni motilitás maximalizálása céljából elengedhetetlen volt. A felolvasztás utáni spermamotilitás mérése folyamán, a különböző hígítási arányok között, az ívási időszakon kívül gyűjtött sügérsperma esetében sem találtam jelentős különbséget. A pMOT, hígítási arány, és sejtkoncentráció között összefüggést nem fedeztem fel. Eredményemmel szemben állnak korábbi kutatások eredményei, ahol bizonyították pisztrángfélékben és a csukában is, a felolvasztás utáni minőség, valamint sejtkoncentráció és a hígítási arány közötti összefüggést (Dziewulska és Domagala 2013, Lahnsteiner 2000). Fentebb leírt vizsgálatomban azt tapasztaltam, hogy a sügérsperma mélyhűtés CRF-re való adaptációja során az 1:20 hígítás statisztikailag igazolhatóan eredményesebb volt, mint az 1:5 hígítás, azonban a 1:10 hígítási aránytól szignifikánsan nem különbözött. Az ívási időszakon kívül gyűjtött tej vizsgálata alapján elmondhatjuk, az 1:10-es hígítás mellett magas sejtkoncentrációval, kiváló átlagos motilitás értékek mellett sikeresen mélyhűthetjük a sügér spermát. Az alacsonyabb hígítási arány eredményesebben alkalmazható a gyakorlatban, hiszen magasabb sejtkoncentrációval és kevesebb felolvasztott mintával végezhetjük el a termékenyítést.

A felolvasztás utáni aktivációs időtartam meghatározása, és a megfelelő oldat kiválasztása a termékenyítési protokoll egységesítését szolgállta. A felolvasztás utáni aktivációs idő vizsgálata hasonló tendenciát mutatott, mint a frissen lefejt sperma esetében (lásd: a legjobb aktiváló oldat kiválasztása), 30 másodperc elteltével a

motilitási paraméterek jelentős csökkenést mutattak. Hasonló eredményt rögzített Dzyuba et al. (2010), ahol a felolvasztott sügérsperma sebessége 30 mp elteltével közel 0-ra csökkent. Az adatok elemzése során a friss sperma vizsgálatához képest eltérő eredményt kaptam az aktiválók összehasonlítása során. Egyik mért időpontban sem rögzítettem szignifikáns különbséget a tesztelt oldatok között. Bár a friss sperma esetében a Sa hatékonysága elmaradt a többi aktiválóval szemben, felovasztás után a különbség nem volt igazolható. Az Sa egyszerű összetételének köszönhetően könnyen adatptálható és sztenderdizálható aktiváló a sügér termékenyítési kísérletekben és a keltetőházi szaporításban egyaránt. Számos irodalmi adat alátámasztja azt az állítást, hogy különböző szintetikus oldatok a laboratóriumi munkák során és a termelésben egyaránt jól alkalmazhatók (Brand et al. 2002, Haffray et al. 2008, Woynárovich and Woynárovich 1980).

Nagy mennyiségű műszalma mélyhűtésével, majd termékenyítési kísérlet elvégzésével igazoltam a fagyasztó berendezés alkalmazhatóságát és használatának ismételhetőségét. A több egyedtől származó, kevert sügérsperma kísérletemben felolvasztás után hasonló progresszív motilitást mutatott, mint Dzyuba et al. (2010) egyedi mintákkal végzett kísérletüknek eredményei. A CRF-fel tömegesen fagyasztott spermát sikeresen alkalmaztam a termékenyítés folyamán. Korábban, Hu et al. (2014) a csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*) spermáját fagyasztották nagy mennyiségben CRF alkalmazásával. A felolvasztott mintákkal való termékenyítés után magas termékenyülést értek el a kék harcsa (*Ictalurus furcatus*) ikrával történő hibrid harcsa előállítása során. A kevert mintával, korábbi vizsgálatomban egyedi mintával rögzített eredményhez hasonlóan magas termékenyülést mértem. Kísérletem eredménye alapján, a CRF és a kifejlesztett protokoll nagy biztonsággal és eredményesen használható a sügérsperma mélyhűtésére, ívási időszakon belül és kívül egyaránt. A feolvasztott sperma alkalmas a termékenyítésre.

3.4. Pontyfélékben (*Cyprinidae*) végzett vizsgálatok

3.4.1. A pontysperma (Cyprinus carpio) mélyhűtésének sztenderdizációja

28. ábra. A ponty. (Fotó: Hegyi Árpád)

A halak tartása és a mintavétel

A vizsgálataimat Gödöllőn, a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszéken végeztem 2014 és 2015 májusában. A Tanszéken tartott 16 tejes egyedből (átlagos súly: 0,77-1,9 kg) és 9 ikrás egyedből (2-3,5 kg) álló ponty állományt (**28. ábra**) az Aranyponty Zrt. gödöllői telephelyéről szereztem be . A tejesek spermiációját 24-48 órával a tervezett fejés előtt 2,5 mg/ttg kg hipofízis injekcióval indukáltam. Az ikrásokat a keltetőházi gyakorlatnak megfelelően két adagban oltottam (előadag 24 órával a tervezett fejés előtt: 0,4 mg/ttkg (testtömeg-kiloramm), döntőadag 12 órával a fejés előtt: 3,6 mg/ttkg). A porított hormonkészítményt 0,5 ml desztillált vízben oldottam fel és 1 ml-es injekciós tűbe töltöttem. A halakat a hasúszó tövénél oltottam be. Az ikrásokat az ivarnyílás bevarrását követően, kontrollált hőmérsékleten tartottam (22-23 °C). A mintavételt a **3.1-es** fejezetnek megfelelően végeztem el.

A friss és mélyhűtött sperma motilitásának vizsgálata

A pontysperma motilitás paramétereit közvetlenül a fejés után (kontroll csoport), valamint mélyhűtés és felolvasztás után egyaránt megmértem. A vizsgálatokat a többi halfajnál leírt módon számítógépes spermavizsgáló berendezéssel végeztem. A sperma aktiválása során a kísérlettől függően desztillált vizet (Dv) vagy a pontyfélékre kifejlesztett aktiváló oldatot (lásd: **3.3.1.** fejezet) alkalmaztam.

A sperma mélyhűtése és felolvasztása

A pontysperma mélyhűtése során a frissen lefejt mintákat a kísérlettől függően különböző összetételű hígítókkal és védőanyagként 10 % metanollal kevertem össze.

<u>A vizsgálatok során használt hígítók:</u>

1. Pér hígító [Ph]: 200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0 (Horváth et al. 2012).

2. Módosított pér hígító [MPh]: 100 mM glükóz, 100 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0.

3. Ponty szeminális folyadék (Szf): pontysperma centrifugálva 20817 g-n, 5 percen keresztül, 4 °C-on (Eppendorf 5810R, Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Németország).

4. Hanks-féle sóoldat (HBSS, 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,19 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 0,1 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 0,05 g Na_2HPO_4, 0,06 g KH_2PO_4, 0,35 g $NaHCO_3$, 1 g $C_6H_{12}O_6$, 0,01 Phenol Red Na, pH 7,5, Sigma-Aldrich, H9269).

A kísérleti elrendezéstől függően kétféle mélyhűtési eljárást alkalmaztam a **3.1-es** fejezetben már leírt módon. A minták tárolására és felolvasztására szintén a fent leírt módon került sor.

Kísérleti terv

Az ekvilibráció hatásának vizsgálata a friss és felolvasztott sperma motilitására

A mélyhűtést megelőző ekvilibrációs idő vizsgálata során 6 tejestől lefejt mintát egyedileg kevertem össze pér hígítóval és védőanyaggal 1:9 arányban. Az előhígított mintákat 0, 30 és 60 perccel az összekeverés után polisztirol hűtődoboz segítségével hűtöttem le. Megmértem a minták progresszív motilitását mindhárom időpontban előhígított állapotban, valamint felolvasztás után. A sperma aktivációjához desztillált vizet alkalmaztam.

Két mélyhűtési módszer összehasonlítása

A két módszer tesztelése során 4 tejes egyedi mintáját kevertem össze pér hígítóval és védőanyaggal 1:9 arányban. Minden egyed mintájából egy-egy műszalmát mélyhűtöttem mindkét módszerrel. Felolvasztás után megmértem a két módszerrel mélyhűtött spermaminták progresszív motilitását. Az aktiváció során desztillált vizet használtam.

Háromféle hűtőmédium vizsgálata a spermamélyhűtés során

Vizsgálatom során 5 tejes spermáját egyedileg kevertem össze pér hígítóval, szeminális folyadékkal, Hanks-féle sóoldattal valamint védőanyaggal. Minden csoportból egy műszalmát mélyhűtöttem le programozható mélyhűtő berendezés segítségével. Felolvasztás után megmértem a különböző hígítókban mélyhűtött minták progresszív motilitását. A sperma aktivációját desztillált vízzel végeztem.

Kétféle pér hígító és négyféle hígítási arány vizsgálata spermamélyhűtés során

Vizsgálatomban 6 tejes spermáját fejtem le, majd összekevertem pér hígítóval, módosított pér hígítóval, valamint védőanyaggal 1:1, 1:5, 1:9, and 1:20 arányban. Minden egyedi mintából programozható mélyhűtő berendezéssel fagyasztottam le egy-egy műszalmát. Felolvasztás után desztillált víz felhasználásával megmértem a minták progresszív motilitását.

Felolvasztás utáni mozgási időtartam vizsgálata

A kísérlet során 6 tejes egyedi mintáját hűtöttem le pér hígító, védőanyag valamint 1:9-es hígítási arány felhasználásával programozható mélyhűtő berendezésben. Felolvasztás után megmértem a minták motilitását. Az aktiváció során a desztillált vizet és a pontyféle aktiválót hasonlítottam össze. Rögzítettem a pillanatnyi motitilitást 10, 20, 30, 60, 90, 120 mp-el az aktiváció után.

A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata egy illetve hat órán keresztül

Vizsgálatomban 6 tejes spermáját mélyhűtöttem CRF segítségével és pér hígító alkalmazásával. A tárolási idő hatásának megfigyelésére minden egyedi mintából külön-külön 1-1 műszalmát olvasztottam fel. Az 1 órás tárolás során felolvasztás

után 0, 15, 30, 45 és 60 perccel rögzítettem a mozgó spermiumok arányát. A 6 órás tárolási idő vizsgálata folyamán megmértem a minták progresszív motilitását 0., 2., 4., illetve a felolvasztást követő 6. órában. A sejtek aktivációjánál desztillált vizet alkalmaztam.

Nagymennyiségű pontysperma mélyhűtése és alkalmazása termékenyítés során

Hat tejes spermáját összekevertem 1:9 arányban pér hígítóban, 10% metanol védőanyagot adagoltam hozzá és mélyhűtöttem CRF-ben. A minták friss motilitás paramétereit az összekeverést megelőzően egyedenként rögzítettem. Összesen 5,2 ml (104 műszalma) spermát fagyasztottam le (**29. ábra**). Tíz-tíz műszalmát használtam fel a termékenyítés teszt és a felolvasztás utáni motilitás vizsgálat során. A termékenyítés és motilitásvizsgálat során pontyféle aktiválót alkalmaztam (lásd: **3.3.1.** fejezet). Három oltott ikrás közül egy haltól sikerült ikrát lefejnem. Kezelési csoportonként 0,2 g ikrát (100-200 ikraszem) termékenyítettem meg 500 µl felolvasztott (hígított) és 50 µl friss (arányosan a mélyhűtött sperma mennyiségével) kontroll spermával (3 egyedi friss minta). A megtermékenyített ikraszemeket 22-23 °C-on állott csapvízben inkubáltam és 24 óra elteltével gerinchúros állapotban meghatároztam a termékenyülés arányát (gerinchúros embrió/összes ikraszem×100). A számlálást sztereomikroszkóppal, szabad szemmel végeztem (**30. ábra**).

29. ábra. Száznégy darab műszalma belehelyezése a programozható mélyhűtő berendezésbe.

30. ábra. Fejlődő pontyembriók jól látható gerinchúrral. (Fotó: Kollár Tímea)

Az adatok elemzése

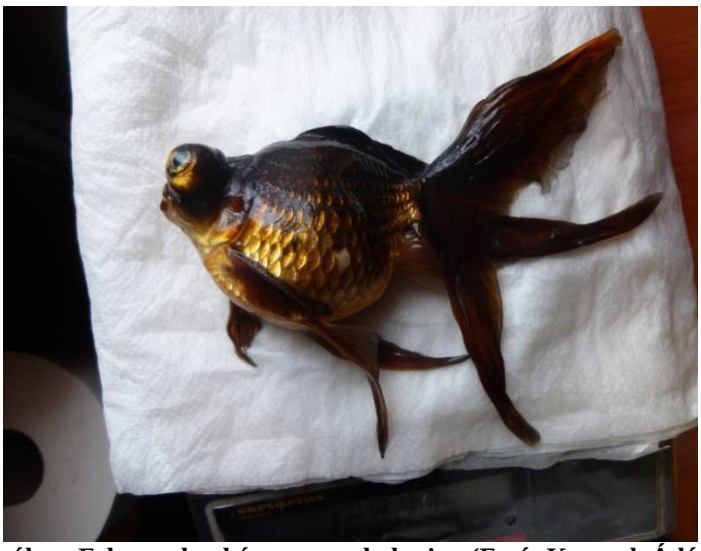
Értékeim normális eloszlását Kolmogorov-Smirnov- és Shapiro-Wilk-próbákkal ellenőriztem (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$). A kezelési csoportok közötti különbségek bizonyítására egytényezős és kéttényezős varianciaanalízist (ANOVA), Kruskal-Wallis, Welch és Mann Whitney teszteket, valamint Tukey, Dunn, Dunnett T3, illetve Bonferroni post-hoc teszteket alkalmaztam (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$).

3.4.2. Különböző aranyhal változatok (Carassius auratus) spermáján végzett kísérletek

A kísérletekben egyedi mintákat alkalmaztam.

A halak tartása és mintavétel

Elővizsgálatokat végeztem Lengyelországban, a Warmia és Mazuria Egyetem, Halászati és Környezettudományi Kar, Tavi és Folyóvízi Halászati Tanszékén 2014 januárjában. A lengyel kísérleti tejes-állomány, különböző típusú aranyhal változatokból állt. A halakat recirkulációs rendszerben tartották 20 °C-on. A tejesek spermációját 1 egység/ttkg Ovopellel ((D-Ala6 Pro9NEt)-mGnRH + metoclopramide)) indukálták az egyetem munkatársai. Vizsgálataimat Magyarországon, 2014 őszén folytattam. Egy nagykarácsonyi tenyésztő által fenntartott állomány tejes (26) és ikrás (6) halait használtam fel a kísérletekhez. A kutatás során 3 aranyhalváltozat (fekete teleszkópszemű, Oranda és Calico változatok) spermáját vizsgáltam (**31-33. ábra**). Mintavételezés előtt a tejesek spermiációját 2 mg/ttkg dózisban hipofízis injekcióval két részletben indukálta a telep vezetője. A teljes mennyiség 10%-át 24 órával, 90%-át pedig 12 órával oltották a halakba. Az ikrásokat 1 fázisban 12 órával a fejés előtt oltották be (4 mg/ttkg hipofízis). Az oltást követően a halak vizének hőmérséklete 21-23 °C volt. A mintavétel minden esetben megegyezett a **3.1.** fejezetben leírtakkal. Felhasználásig a mintákat, kísérlettől függően nyitott 1,5 ml-es centrifugacsövekben 4, vagy 20 °C-on szobahőmérsékleten tároltam.



31. ábra. Fekete teleszkópos aranyhal tejes. (Fotó: Koncsek Ádám)

32. ábra. Oranda aranyhal tejes. (Fotó: Koncsek Ádám)

33. ábra. Calico aranyhal tejes. (Fotó: Koncsek Ádám)

Spermavizsgálat

A friss és felolvasztott sperma motilitását számítógépes spermavizsgáló berendezéssel rögzítettem (lásd: **3.1.** fejezet). A lengyelországi kísérletben az aktivációhoz a halak tartására használt rendszervizet alkalmaztam. A nagykarácsonyi tenyészállományon végzett méréseim során pontyféle aktiválót (lásd: **3.3.1.** fejezet) használtam.

Kísérleti terv

Különböző aranyhal változatok spermájának tárolhatósága 4 °C, illetve 20 °C-on

A Lengyelországban végzett vizsgálat során 5 tejes (több féle változat vegyesen) spermáját fejtem le. A mintákból egyenként 40-40 µl-t 4 °C-on (hűtőszekrényben) illetve 20 °C-on (szobahőmérséklet) tároltam nyitott centrifuga-csőben, 27 órán keresztül. A minták progresszív motilitását mindkét csoportban rögzítettem 2 óránként 10 órán keresztül. Az utolsó mérést azonban 27 órával a fejést követően végeztem, mivel a 10. órában kapott eredmények indokolttá tették a lefejt aranyhalsperma további tárolását. A vizsgálatban 10-27 óra között nem rögzítettem adatot. A 27. órában már csak a hűtőben tárolt minták motilitását mértem meg.

A fekete teleszkópszemű, az Oranda és a Calico aranyhal változatok spermájának fejés utáni tárolhatóságának vizsgálata

A vizsgálat során 4 fekete teleszkópszemű, illetve 3-3 Oranda és Calico változat spermáját tároltam 4 °C-on (hűtőszekrényben) nyitott centrifuga-csőben 48 órán keresztül. A progresszív motilitást 6 óránként rögzítettem.

A három aranyhalváltozat spermasűrűségének összehasonlítása

A tárolási vizsgálatban említett különböző változatoktól lefejt spermamintákból 1µl spermát kihígítottam 999 µl pérhígítóban (lásd: **3.3.1.** fejezet). A sejtkoncentráció megállapítása a sügér faj esetében ismertett módszer alapján történt (**34. ábra**).

34. ábra. Fáziskontraszt objektívvel vizsgált spermiumok a kísérleti négyzetben koncentráció számítás során.

A három aranyhalváltozat spermájának mélyhűtése

A kísérlet során 5 tejest fejtem le minden változat esetében. A mélyhűtésnél, a sejtkoncentráció számolás során alkalmazott pér hígítót (lásd: **3.3.1.** fejezet) és védőanyagot kevertem a spermamintákhoz 1:9 arányban. A fagyasztás (polisztirol doboz módszer), tárolás és felolvasztás a **3.1.** fejezet alapján történt.

A három aranyhalváltozat spermájának felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata

A vizsgálat során a mélyhűtött mintákból változatonként 1-1 műszalmát használtam fel. Felolvasztás után 0, 2, 4, illetve 6 óránál rögzítettem a spermiumok progresszív motilitását.

Termékenyítési kísérlet

A kísérlet során 1-1 ikrást, valamint a kontroll termékenyítéshez 3 Oranda és Calico tejest fejtem le. A Calico esetében a limitált ikramennyiség miatt csak 2 kontroll termékenyítést végeztem. Az ikrát szobahőmérsékleten, a tejet megközelítőleg 4 °C-on tároltam. A mintákat elszállítottam Gödöllőre, a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékére. A termékenyítést 3 órával a fejést követően, 5-5 felolvasztott és a kontroll sperma mintákkal végeztem el. Átlagosan 100-200 ikraszemhez (0,125 g) egy műszalmából 300 µl-t, és a felolvasztott spermával arányosan 50 µl friss mintát kevertem. Pontyféle aktiválót alkalmaztam termékenyítő oldatként (lásd: **3.3.1.** fejezet). A megtermékenyített csoportokat állott csapvízben 2 napig 24-25 °C-on inkubáltam. A vizet naponta cseréltem, és szűrő berendezéssel forgattam. A termékenyülés eredményességét gerinchúros állapotban határoztam meg sztereomikroszkóp segítségével (gerinchúros állapotba lépett ikraszem/összes ikraszem×100).

Az adatok elemzése

Az adatsorok normal eloszlását Kolmogorov-Smirnov-próbával ellenőriztem (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$) A különböző kezelési csoportok közötti különbségek vizsgálatához az egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), Kruskal-Wallis tesztet, Student féle párosítatlan egymintás t-probát, Mann Whitney tesztet, valamint Tukey, Dunn és Dunnett T3 post-hoc teszteket alkalmaztam (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$).

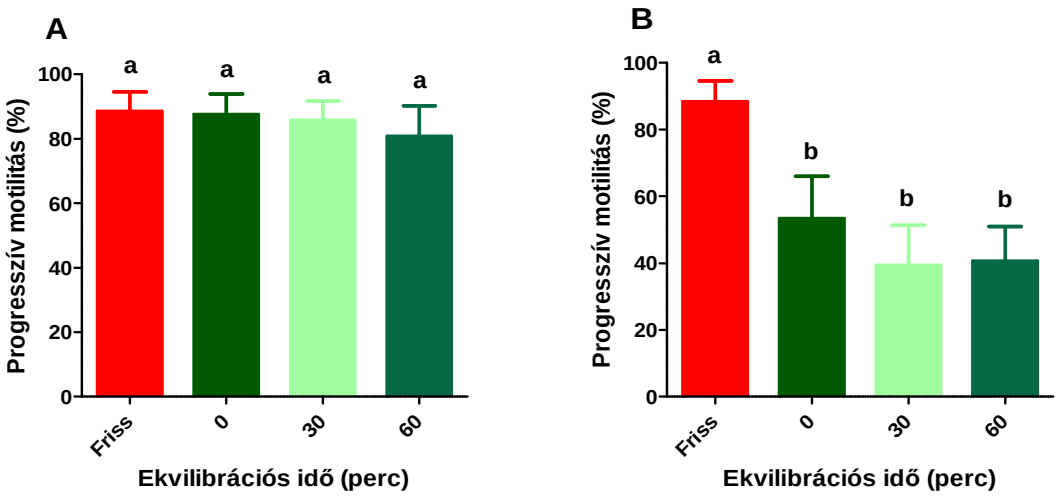
3.4.3. Pontyfélékben végzett vizsgálatok eredményei

A ponty sperma mélyhűtésének sztenderdizációja

A felolvasztott sperma pér és módosított pér hígító használatakor minden esetben 1:1 arányban agglutinált spermát (zselés képletet) és sejtszuszpenziót tartalmazott.

Ekvilibráció hatása a friss- és felolvasztott sperma motilitására

A kihígítás és felolvasztás után mért pMOT, VCL és STR értékek nem csökkentek szignifikánsan az ekvilibráció hatására. A mélyhűtés hatására a pMOT és a VCL szignifikánsan csökkent mindhárom csoportban (kontroll: pMOT: 88±6%, VCL: 126±22 µm/s, mélyhűtött: pMOT 0 perc: 53±13%, 30 perc: 39±12% 60 perc: 41±10%, VCL 0 perc: 63±10 µm/s, 30 perc: 53±8 µm/s, 60 perc: 51±6 µm/s) (**35A és B. ábra**).



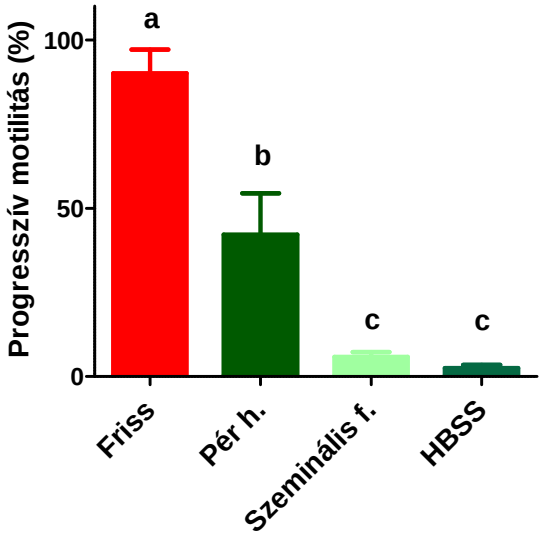
35. ábra. Az sperma ekvilibrációs idejének vizsgálata során mért kihígított (A) és felovasztott (B) pMOT értékek ponty fajban (*N*=6). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($P \leq 0{,}05$).

Két mélyhűtési módszer öszehasonlítása

Hasonló motilitás értékeket rögzítettem a kétféle módszerrel lefagyasztott sperma esetében [doboz: pMOT (33±16%) VCL (47±5 µm/s) és STR (88±2%), CRF: pMOT (32±13%) VCL (54±10 µm/s) és STR (89±1%)].

Három különböző hűtőmédium tesztelése a spermamélyhűtés során

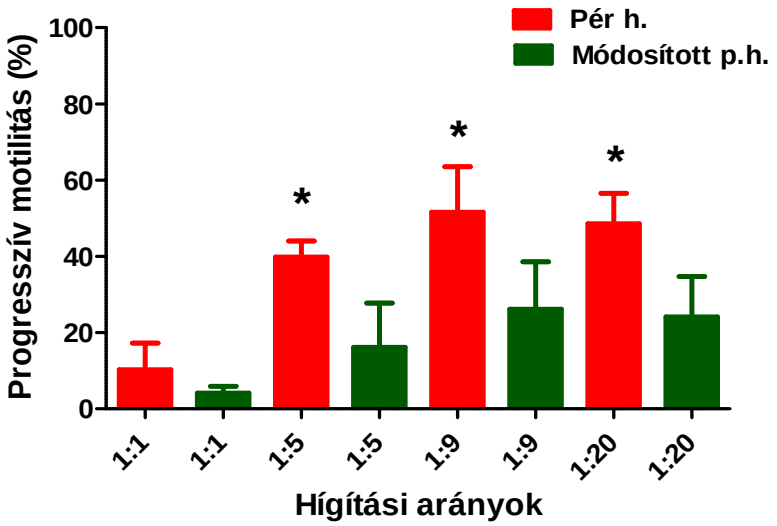
Szignifikánsan magasabb pMOT (42±12%) és VCL (69±4 µm/s) értékek voltak megfigyelhetők pér hígító használatakor, mint Szf (pMOT:6±2%, VCL: 37±7µm/s) és HBSS (pMOT: 3 ±1%, VCL: 32±9 µm/s) esetében. A mélyhűtés hatására mindhárom fagyasztott csoportban szignifikánsan alacsonyabb pMOT és VCL értékeket rögzítettem, mint a kontrollban (pMOT: 90±7%, VCL: 147±13 µm/s). Az STR értékek növekedtek a fagyasztás hatására (**36. ábra**).



36. ábra. Különböző hígítók (*N*=5) összehasonlítása során mért pMOT értékek ponty fajban. Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

Két eltérő összetételű pér hígító és négy különböző hígítási arány tesztelése spermamélyhűtés során

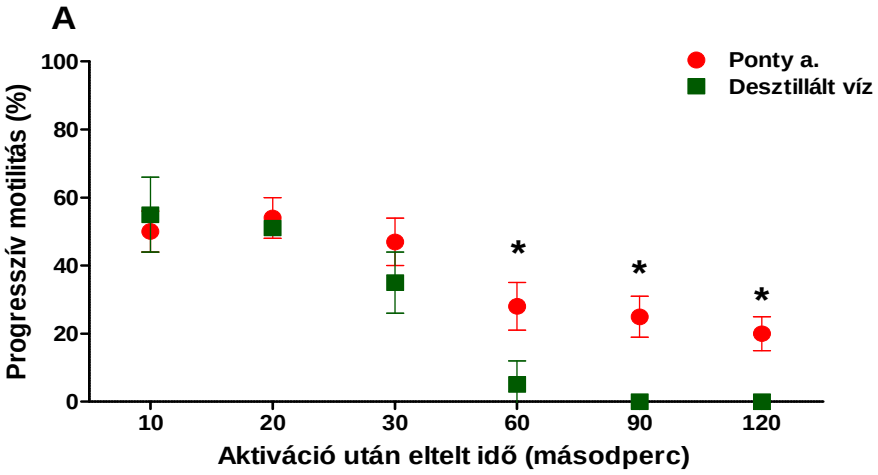
A legmagasabb felolvasztás utáni pMOT és VCL a Ph esetében 1:9 (pMOT: 52±12%, VCL: 76±9 µm/s) és 1:20 (pMOT: 49±8%, VCL: 76±6 µm/s) hígítás mellett volt megfigyelhető. A legmagasabb STR értéket a mélyhűtött csoportok között 1:5 hígítási arány alkalmazása során tapasztaltam. A mélyhűtés hatására mindkét hígító és az összes hígítási arány használatakor szignifikánsan csökkent a pMOT és a VCL a friss kontrollhoz képest. A Ph esetében szignifikánsan magasabb pMOT illetve VCL értékeket mértem 1:5, 1:9 és 1:20 hígítási arányok mellett, mint MPh használatakor. Az STR értékek nem különböztek szignifikánsan az egyes kísérleti csoportokban, valamint nem csökkentek a fagyasztás hatására (**37. ábra**).



37. ábra. Két eltérő hígító és négy különböző spermahígítási arány alkalmazása során mért felolvasztás utáni pMOT értékek ponty fajban (*N*=6). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*”-gal jelölt hígító csoportok adott hígítási arányon belül szignfikánsan különböznek (*P*≤0,05).

Felolvasztás utáni mozgási időtartam vizsgálata

A vizsgálat során az aktivációt követően 60 másodperc elteltével Pa (28±7%) és Dv (5±7%) esetében egyaránt szignifikánsan alacsonyabb pMOT értékeket rögzítettem, mint 10 másodpercnél (Pa: 50±6%, Dv: 55±11%). A VCL értékek szignifikáns csökkenése Pa esetében 60 másodperc után (40±13 µm/s), Dv esetében már 20 másodperc után (52±9 µm/s) bekövetkezett (10 mp: Pa: 71±8 µm/s, Dv: 75±7 µm/s). Az STR Pa esetében nem csökkent 120 másodperccel az aktivációt követően, Dv használatakor 120 másodperc után tapasztaltam szignifikáns csökkenést. A ponty aktiváló alkalmazása során szignifikánsan magasabb értékeket mértem pMOT és VCL esetében az aktivációt követő 60 másodperc, STR esetében 90 másodperc elteltével, mint desztillált vízzel. (**38. ábra**).



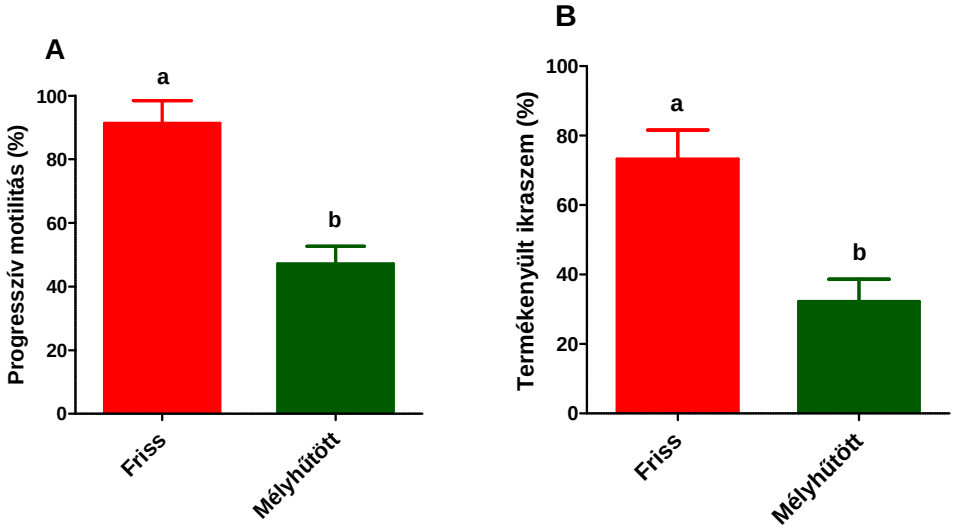
38. ábra. Két eltérő aktiváló oldat és a sperma felolvasztás utáni mozgás időtartamának tesztelése során mért pMOT értékek ponty fajban (*N*=6). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*”-gal jelölt időpontokban az egyes aktiváló oldatokhoz tartozó motilitás értékek szignfikánsan különböznek (*P*≤0,05).

A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata egy, illetve hat órán keresztül

A mélyhűtött pontysperma pMOT, VCL, STR értékei nem csökkentek 1, illetve 6 órás felolvasztás utáni tárolás során. Közvetlenül a felolvasztás után a pMOT és VCL értékek szignifikánsan csökkentek a kontrollhoz viszonyítva.

Nagy mennyiségű pontysperma mélyhűtése és a mélyhűtött sperma alkalmazása termékenyítés során

A nagy mennyiségű műszalma mélyhűtése során a termékenyítés szempontjából ideális pMOT (47±5%) VCL (62±9 µm/s) és STR (91±1%) értékeket rögzítettem. A pMOT és VCL értékek a mélyhűtés hatására szignifikánsan csökkentek (kontroll: pMOT: 91±7%, VCL 129±37 µm/s, STR: 83±5%). A fagyasztott sperma esetében 32±6%-os termékenyülést tapasztaltam. A termékenyülés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoport termékenyülési százaléka (73±8%) (**39. ábra**).



39. ábra. Nagy mennyiségű műszalma mélyhűtése során mért pMOT (A), termékenyülés (B), értékek ponty fajban (*N*=6). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

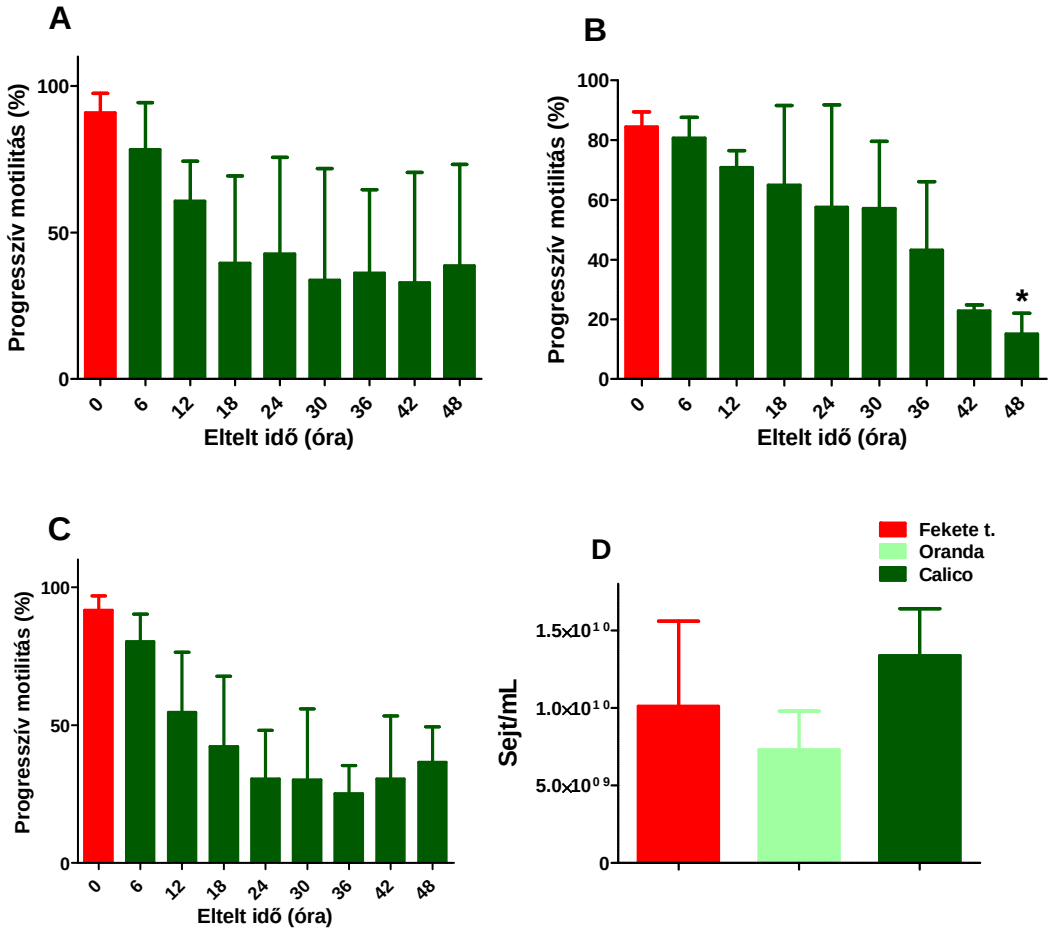
Különböző aranyhal változatok spermáján végzett kísérletek eredményei

Különböző aranyhal változatok spermájának tárolhatósága 4 °C, illetve 20 °C-on

A frissen lefejt sperma minták pMOT értékei nem csökkentek szignifikánsan a 10 órás tárolás alatt. A két tárolási hőmérséklet között egyik időpontban sem mértem szignifikáns különbséget. A 4 °C-on tárolt minták esetében még 27 óra elteltével is progresszív motilitást mértem (64±15%). A 20 °C-on tárolt spermaminták a 10, illetve 27 órás tárolási idő között beszáradtak.

Fekete teleszkópszemű, Oranda és Calico változatok spermájának sejtsűrűség mérése és fejés utáni tárolhatósági vizsgálata

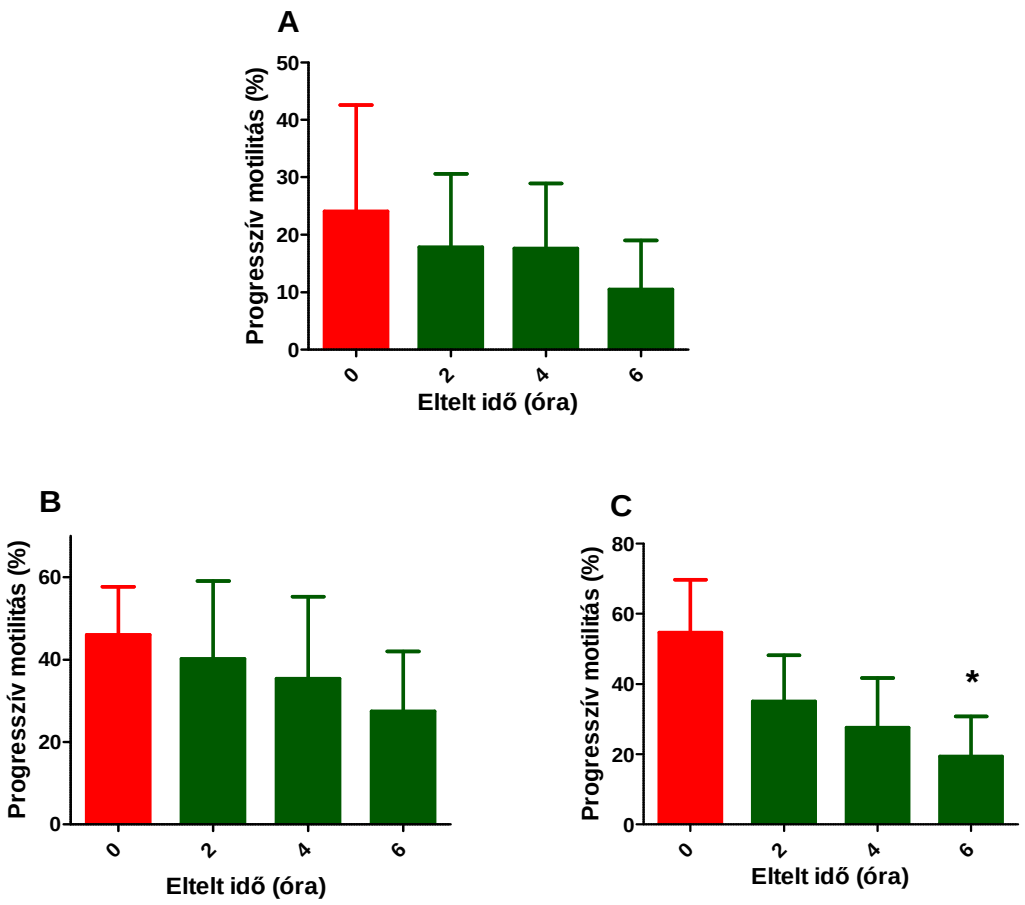
A fekete teleszkópszemű és Calico változat spermájának motilitás paraméterei nem csökkentek szignifikánsan a tárolás hatására. Az Oranda változat esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltam a pMOT (15±7%) és VCL (68±14 µm/s) értékekben 48 óra elteltével a kontrollhoz képest (friss: pMOT 84±5%, VCL 150±11 µm/s). A három aranyhal változat spermájának sejtkoncentrációja nem különbözött egymástól szignifikánsan (**40A-D. ábra**).



40. ábra. Fekete teleszkópszemű (A, *N*=4), Oranda (B, *N*=3) és Calico (C, *N*=3) aranyhalak spermájának 48 órás tárolása során mért pMOT értékek. Sejtkoncentráció a különböző aranyhal változatokban (D). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*”-gal jelölt időpontok szignifikánsan különböztek a 0 órától (*P*≤0,05).

A három aranyhalváltozat spermájának felolvasztás utáni tárolhatósági vizsgálata

A felolvasztott sperma minden esetben 1:1 arányban zselés képletet és sejtszuszpenziót tartalmazott. A fekete teleszkópszemű és Oranda változatok mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni pMOT, VCL és STR értékei 6 órás tárolás során nem csökkentek szignifikánsan. Calico aranyhalban 6 óra elteltével a pMOT (19±11%) szignifikánsan csökkent (kontroll: 55±15%). A VCL és STR értékek nem csökkentek szignifikánsan a tárolási idő alatt a fent említett változatban (**41A-C. ábra**).



41. ábra. A fekete teleszkópszemű (A), Oranda (B) és Calico (C) aranyhal változatok folvasztott spermájának 6 órás tárolás során rögzített pMOT értékek (*N*=5). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*”-gal jelölt időpont szignifikánsan különbözött a 0 órától (*P*≤0,05).

Két aranyhalváltozat mélyhűtött spermájának felhasználása a termékenyítés során

A felolvasztott sperma mindkét változat esetében 1:1 arányban zselés képletet és sejtszuszpenziót tartalmazott. Az Oranda változat mélyhűtött spermájával termékenyítve a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb termékenyülést tapasztaltam (Oranda friss: 72±9%, mélyhűtött: 14±2%). A Calico esetében az alacsony mintaelemszám miatt nem tudtam staisztikai elemzést végezni friss: 63±17%, mélyhűtött: 23±6%).

3.4.4. A ponytfélékben kapott eredmények értékelése

A pontysperma felolvasztás előtti és utáni motilitási paramétereire nem volt hatással az ekvilibrációs idő. Lahnsteiner et al. (2000) szintén egy pontyféle, az állas küsz (*Chalcalburnus chalcoides*) sperámáján vizsgálta az ekvilibrációs idő mélyhűtött spermára kifejtett hatását. Tíz perces, 4 °C-on és 15 °C-on történő ekvilibráció szignifikáns csökkenést eredményezett a felolvasztás utáni motilitásban. A szivárványos pisztráng fajban (*Oncorhynchus mykiss*) tesztelt 1 és 60 perces ekvilibrációs idők negatív hatása volt megfigyelhető különböző koncentrációkban alkalmazott DMSO alkalmazása során, a felolvasztott sperma termékenyítő-képességére nézve (Stoss és Holtz 1983). Babiak et al. (2001) vizsgálatukban a 10

perces ekvilibrációs idő negatív hatását írták le a szivárványos pisztrángnál. A mélyhűtés sikerességének csökkenése azonban összefüggést mutatott a védőanyag típusával. A dimetil-acetamidnál nem, míg a DMSO és etilénglikol esetében mérhető volt a káros hatás. A fent említett irodalmi adatokkal szemben vizsgálatomban a pontysperma ellenállt a kihígítás okozta ozmotikus stressznek Mazur (1977). A metanol, mint védőanyag, nem volt toxikus a sejtek számára az ekvilibrásció során (Cloud és Patton 2009). Az egy órás tárolási idő, a sügérhez hasonlóan, elegendő lehet a műszalmák tömeges megtöltésére, ezzel is lehetővé téve a pontysperma nagy mennyiségű mélyhűtését.

A pontysperma esetében bebizonyosodott, hogy a gyors fagyasztás (56 °C/perc), valamint az egy lépcsős fagyasztási eljárás magas felolvasztás utáni motilitást eredményez. Az irodalmi adatok korábban főként 2 lépcsős, relatíve lassabb hűtési módszerek sikeres alkalmazásáról számoltak be. Cognie et al. (1989) 5 °C/perc-et eredményesen használták (2 °C-tól -7 °C-ig) és 25 °C /perc (-7 °C-tól -70 °C-ig: 25 °C/perc) a pontysperma esetében. Magyary et al. 1996-ban szintén 2 lépcsős (lassú) módszert alkalmazták sikeresen (0 °C-tól -4 °C-ig: 4 °C/perc és −4 °C-tól –80 °C-ig: 11 °C/perc). Hasonló hűtési programot (4 °C tól -9 °C-ig: 4 °C/perc, -9 től -80 °C-ig: 11 °C/perc, végül tárolás -80 °C-on 6 percig és áthelyezés folyékony nitrogénbe) alkalmazva a fagyasztást sikeresen végezték el, egy dél-csehországi pontytörzs esetében (Linhart et al. 2000). Warnecke és Pluta (2003) kutatásukbanban 3 különböző módszert használtak. Két módszerben 3 hűtési lépcsőt (1. 2-től -7 °C-ig, 2. -7-től -30 °C-ig, 3. -30-tól -80 °C-ig, áthelyezés folyékony nitrogénbe) és lassú átlagos sebességet (3 és 6 °C/perc) állítottak be. Ezzel szemben a 3. eljárásnál (a korábbiakkal ellentétben) egy lépésben (2-től -50 °C-ig) végezték el a mélyhűtést 10/perces (gyorsabb) sebességgel. Az eredmények azt mutatták, hogy a gyorsabb sebesség (6 illetve 10 °C/perc) eredményesebbnek bizonyult. Kísérletemben a lefejt tej ellenállt a mélyhűtés okozta stressznek (Denniston et al. 2000) az egylépcsős, gyors fagyasztás során. A kísérlet (ismereteim alapján) első ízben bizonyítja, hogy a pontysperma eredményesen hűthető egy korábban még nem alkalmazott hűtési sebességgel (56 °C/perc).

Horváth et al. 2003-ban közölt munkájukban a cukortartalom fontosságáról számoltak be. Eredményeik alapján 3 féle, eltérő glükóz tartalmú hígítót hasonlítottunk össze. Az irodalmi adatoknak megfelelően és az általam leírt összetétel alapján, a pér hígító (glükóz 36,04 g/l, Horváth et al. 2012) eredményesebbnek bizonyult a pontysperma mélyhűtése során, mint az alacsony glükóztartalmú HBSS (1g/l, Sigma Aldrich, H9269) és a ponty szeminális folyadék (0,009-0,1 g/l, Gosh 1985, Kruger et al. 1984). Hasonló tendencia mutatkozott a kétféle összetételű (több és kevesebb glükóz tartalmú) pér hígító összehasonlításánál. A HBSS számos halfaj spermájának mélyhűtésében jól használható, többek között: zebradánió (*Danio rerio*, Yang et al. 2007), kék harcsa (*Ictalurus furcatus*, Hu et al. 2014), csatorna harcsa (*Ictalurus punctatus*, Christensen és Tiersch 1997), óriás laposhal (*Hippoglossus hippoglossus*, Ding et al. 2011), fehér sügér (*Morone chrysops*, Devireddy et al. 2006) és csíkos sügér (*Morone saxatilis*, Thirumala et al. 2006) fajok esetében. A halak szeminális folyadéka fiziológiás közeget biztosít a spermiumok számára és immobilizálja azokat a külvilágba (pl. víz) kerülést megelőzően (Alavi et al. 2007, Billard et al. 1995a). Kutatásom azonban bizonyította, hogy a pontysperma esetében a mélyhűtésre használt hígító összetételében a glükóz tartalom mellett, annak mennyisége szintén nagy jelentőséggel bír.

Eredményeim alapján a pontyspermát 1:5, 1:9 és 1:20 hígításban ajánlott a magasabb glükóz tartalmú pér hígítóban kihígítani a mélyhűtést megelőzően. Linhart et al. (2000) és Lahnsteiner et al. (2003) szintén eredményesen alkalmaztak magasabb hígítási arányt ponty faj esetében (1:5). Munkájukban azt tapasztalták, hogy az 1:7-nél magasabb arány már szignifikánsan alacsonyabb kelést eredményezett az állas küsz (*Chalcalburnus chalcoides*) esetében. A felolvasztott pontysperma spontán aktivációjának kutatása során Dzyuba et al. (2010) a spermát 1:1 aránnyal fagyasztották sikerrel. Horváth et al. (2003) kutatásukban 1:9 hígítással (glükóz hígító) a kontrollhoz hasonló termékenyülés és kelés eredményeket értek el. Vizsgálataim igazolták, hogy a pontysperma fagyasztható magasabb hígítási arányok alkalmazásával is (1:9 és 1:20). A termékenyítés szempontjából azonban az 1:9-ben kihígított, sűrűbb felolvasztott sperma alkalmazása optimálisabb a keltetőházi szaporítás során.

A pontysperma felolvasztás utáni motilitása drasztikusan lecsökkent az aktivációt követő 30 másodperc elteltével, de a csökkenés nem volt azonos mértékű a 2 eltérő aktiválóban. A minták progresszív motilitása Pa-val két perc elteltével 30% és 20% között volt. Linhart et al. (2000) kutatásukban hasonló eredményt írtak le, a dél-csehoszági ponty törzsből származó sperma esetében 120 másodperces motilitásidőtartamot mértek. Ögretmen et al. (2014) azonban, a propoliszt különböző mennyiségben tartalmazó hígítók tesztelése során a Pa alkalmazásával az aktivációt követően csak 39 másodpercig tapasztaltak motilitást. A desztillált vizet friss és felolvasztott sperma aktiválására korábban már sikeresen alkalmazták zebradánió (*Danio rerio*) és csuka (*Esox lucius* L.) (Alavi et al. 2009, Yang et al. 2007) fajokban. A pontysperma esetében a termékenyítés során azonban a Pa alkalmazása indokolt, hiszen a hosszabb mozgási időtartam, nagyobb esélyt biztosít a termékenyítésre.

A 6 órás feolvasztás utáni tárolás nem volt negatív hatással a pontysperma motilitás értékeire. Boryshpolets et al. (2009a) kutatásukban bizonyították, hogy 10 perces tárolás nincs hatással a felolvasztott pontysperma termékenyítő képességére. Kovács et al. (2010) afrikai harcsán (*Clarias gariepinus*) végzett vizsgálatukban a felolvasztott spermát 24 órán keresztül tárolták. A tárolás nem befolyásolta a minták termékenyítő képességét. Esetemben a pontysperma motilitása magas maradt 6 óra elteltével is, ami lehetővé teszi a termékenyítésre való felhasználásának meghosszabbítását.

A pontyspermára általam optimalizált mélyhűtési módszer ismételhetőségének tesztelése során a CRF egy körben, eredményesen mélyhűtött le 104 szalmát. Az eredményekben optimális átlagos pMOT-ot rögzítettem, a szalmák közötti alacsony különbséggel. Ez az eredmény a módszer ismételhetőségét igazolta. A termékenyülésben tapasztalt csökkenés a felolvasztott sperma agglutinációjával állhatott összefüggésben. A tendencia ellentmond a Horváth et al. (2003) vizsgálatukban levont következtetéseknek, amelyek szerint az agglutináció nem befolyásolta a termékenyülést. Állításuk szerint kísérleteikben az összetapadt régióból a spermiumok ki tudtak szabadulni az ikrával való összekeverés során. Vizsgálatomban azonban az agglutinálódott rész rátapadt kívülről az ikraszemekre, ami meggátolhatta azok termékenyülését.

A keltetőházi szaporításban, problémát jelent a spermiáció és ovuláció időben történő szinkronizálásának megoldása (Cabrita et al. 2010). A 10 órás elővizsgálatban a 4 °C, illetve 20 °C-on történő fejést követő tárolás nem volt negatív hatással az aranyhalsperma motilitására. A szobahőmérsékleten tárolt minták esetében 10 óra elteltével azonban végzetes dehidratáció következett be. A másik

csoport spermája a hűtve tárolás hatására, tolerálta a 27 órás kitettséget is. A fekete teleszkópszemű, Oranda és Calico aranyhal változatok különböző módon reagáltak az alacsony hőmérsékleten történő tárolásra. Bár alacsony mintaszám állt rendelkezésre, az eredmények alapján az Oranda változat spermája kevésbé bizonyult ellenállónak a 48 órás tárolási idő során, mint a fekete teleszkópszemű, vagy a Calico változatoké. Glenn et al. (2011) eredményeket közöltek tárolási kísérletből, ahol 3 féle hígtót [Calcium-Free HBSS (8g NaCl, 0,4g KCl, 0,2g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,06g Na_2HPO_4, 0,06g KH_2PO_4, 0,35g $NaHCO_3$, 1g glükóz), NaCl és $NaHCO_3$] alkalmaztak a tárolás során. Eredményeik alapján a hígítatlan kontroll 3 napig őrizte meg motilitását, míg a sperma a legmagasabb motilitást 6 nap elteltével a leghatékonyabban működő C-F HBSS hígítóban mutatta. A hatodik napot követően már nem volt mérhető motilitás egyik csoportban sem. A kísérletben azonban nem vizsgálták, a különböző változatok közötti különbséget. A tárolási idő meghosszabbításával megoldható a natív sperma nagy távolságokra történő szállítása (Glenn et al. 2011). A külön vizsgált változatokban az irodalmi adatok hiányossága miatt a kapott eredmények az alapkutatás szempontjából is jelentőséggel bírnak. A legalacsonyabb sejtkoncentrációt az Oranda változatban rögzítettem, bár az eredmény statisztikailag nem különbözött a másik két csoporttól. Számos kutatás született az említett témában az elmúlt évtizedekben (Fauvel et al. 2010). A szaporítás szempontjából, az úgy nevezett „rátermett” tejesek kiválasztásához elengedhetetlen a sperma minőségjelző tulajdonságainak vizsgálata (pl. morfológia, mozgásidőtartam, sejtsűrűség, membránintegritás, stb.) (Cabrita et al. 2011). A különböző változatok spermájának átlagos sűrűségének kiszámítása továbbá szükségszerű az effektív sperma:ikra arány jövőbeni meghatározásához.

A különböző aranyhal változatok spermájának mélyhűtése során eredményesnek bizonyult a metanol védőanyagként történő alkalmazása. Nathanailides et al. 2011-ben a DMSO eredményes használatát közölték az aranyhal spermájának mélyhűtése során. Esetemben a 10% metanol a ponty mellett az aranyhal esetében is sikeresnek bizonyult. Kutluyer et al. (2015) igen magas, 45%-os pMOT-t rögzítettek a felolvasztást követően. Esetemben a Calico változat spermája, még a fent említett értéknél is magasabb, közel 55%-os pMOT-t mutatott, mely a mélyhűtési módszer alkalmazhatóságát igazolja. A különböző változatok felolvasztott spermája ellenállt a 6 órás tárolás során, azonban a Calico aranyhal spermája ebben az esetben érzékenyebbnek bizonyult, mint a másik két változaté. Esetemben a 6 órás tárolási idő nem volt negatív hatással a mélyhűtött sperma motilitására a fekete teleszkópszemű és Oranda változatokban. A felovasztás utáni tárolás szintén megkönnyítheti a keltetőházi szaporítást, kiküszöbölve az aszinkron ivarsejtérésből adódó problémákat. (Cabrita et al. 2010 és 2011).

A termékenyítési kísérlet során alacsony termékenyülést találtam az Oranda és Calico változatok esetében, mely feltételezésem szerint az ikra szállítása során adódó tárolási idő miatt következett be. Bozkurt és Yavas (2012) vizsgálatukban a ponty ikra esetében 90 perc elteltével 8 és 12 °C-os hőmérsékleten történő tárolás után is 80% körüli termékenyülést tapasztaltak. Bozkurt et al. (2010) amur (*Ctenopharyngodon idella*) ikrán végzett kísérletében glükóz alapú hígítóban 60%-nál magasabb termékenyülést értek el 8 óra 4 °C-on történő tárolás után. Az említett fajokhoz viszonyítva, az Oranda és Calico ikra feltehetően érzékenyebb a tárolási időre. Az alacsony termékenyülést emellett a pontysperma esetében már tárgyalt agglutináció is eredményezhette.

3.5. Vizsgálatok lazacfélékben (*Salmonidae*)

A kísérletekben egyedi mintákat alkalmaztam.

3.5.1. A sebes pisztrángban (Salmo trutta **m.** *fario) végzett vizsgálatok*

Mintavétel

A mintavétel során a sebes pisztráng (**42. ábra**) tejeseket (6 db) és ikrásokat a Lillafüredi Pisztrángtelep (Hoitsy & Rieger Kft.) tenyészállományából válogattam ki a szaporítási időszak során Hoitsy György telepvezető segítségével 2013 januárjában. A tejesek (10 egyed) spermáját 2:1 (sperma:hígító) arányban a korábban leírt pér-hígítóba (lásd: **3.3.1.** fejezet) fejtem. A termékenyítési kísérlethez 3 ikrást fejtem le. A mintavétel folyamatát a **3.1.** fejezetnek megfelelően hajtottam végre.

42. ábra. A sebes pisztráng. (Fotó: Kaczkó Dániel)

Spermavizsgálat

A hígítóba fejt, valamint felolvasztott sperma progresszív motilitását számítógépes spermavizsgáló berendezéssel mértem meg (lásd: **3.1.** fejezet). A sejteket Billard-féle termékenyítő oldattal (2,42 g Tris, 3,76 g glicin, 5,5 g NaCl 1 liter vízben) aktiváltam (Billard 1977). A kihígított sperma vizsgálata alapján a 6 legjobb mintát választottam ki mélyhűtésre. Felolvasztás után 0, 10, és 60 perc elteltével rögzítettem a progresszív motilitást.

Mélyhűtés és felolvasztás

A hígítóba fejt mintákat 1:4 arányú (sperma: hígító+védőnyag) végső hígításban mélyhűtöttem pér hígítóban (lásd: **3.3.1.** fejezet). Minden mintából 4-4 műszalmát (hármat a termékenyítési kísérlethez és egyet a motilitás vizsgálatához) fagyasztottam le polisztirol dobozban. A tárolás és felolvasztás a korábban már ismertetett módon történt.

Termékenyítési kísérlet

Vizsgálatomban 3 ikrás kevert ikratételét használtam fel. A sperma felolvasztása és a különböző ikratételekre helyezése után a termékenyítést Billard-féle oldattal, 0, 10 és 60 perc elteltével végeztem el (3 műszalma). Minden időpontban 15 g ikrához (170 db ikraszem) 300 µl felolvasztott spermát kevertem. A kontroll csoport esetében 60 µl kihígítatlan friss spermát alkalmaztam (a mélyhűtött sperma mennyiségével arányosan). Az ikrát a pisztrángtelepen, sandforti típusú keltetőedényekben inkubáltuk. A termékenyülést szabad szemmel, 42 nap elteltével szempontos stádiumban határoztam meg (szempontos ikra/összes ikra mennyiség × 100).

Az adatok elemzése

Értékeim normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov-próbával ellenőriztem (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$). A csoportok összehasonlításánál egyszempontos varianciaanalízist és Tukey-próbát alklmaztam (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$).

3.5.2. A márványpisztrángban (Salmo marmoratus) végzett vizsgálatok

A márványpisztráng (**43. ábra**) esetében vizsgálataimat Szlovéniában, Tolmin városában működő Tolmini Horgász Egyesület telephelyén fenntartott márványpisztráng tenyészállományon végeztem el 2012 novemberében. A mintavételt a korábbiakban ismertett módon hajtottam végre (lásd: **3.1.** fejezet).

43. ábra. A márványpisztráng (*Salmo marmoratus*). (Fotó: Helena Gužvinec)

Spermavizsgálat

Mélyhűtés előtt a frissen lefejt minták motilitását Szlovéniában fénymikroszkóp segítségével szabad szemmel, 200-szoros nagyításon határoztam meg. A 10 mintából, a sperma motilitása alapján, az 5 legkiválóbbat választottam ki a kísérlethez. Felolvasztást követően már Magyarországon a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén számítógépes spermavizsgáló berendezést alkalmaztam. A márványpisztráng spermájának motilitását a sebes pisztráng fajban végzett kísérleteknél már leírt módszertan szerint határoztam meg.

Mélyhűtés és felolvasztás

Az öt spermamintát pér hígítóban (lásd: **3.3.1.** fejezet) hígítottam ki 1:4 arányban, majd védőanyagként 10% metanolt vagy 10% dimetil-szulfoxidot (DMSO) adagoltam hozzá. A mélyhűtést polisztirol hűtődobozban végeztem (**3.1.** fejezet). Minden egyedtől 8-8 műszalmát hűtöttem le, amiből a vizsgált védőanyagnak megfelelően 3-3 műszalmát a termékenyítési kísérletben, 1-1 műszalmát pedig a felolvasztás utáni motilitás vizsgálatára használtam fel. A mintákat a **3.1.** fejezetben leírt módon tároltam.

Termékenyítés

Öt egyed lefejt ikráját összekevertem. A kétféle védőanyaggal fagyasztott mintákból 3-3 műszalmával termékenyítést végeztem 0, 10 és 60 perccel a felolvasztást követően. Az egyes kísérleti egységekben 15 g (135 db ikraszem) ikrához 200 µl felolvasztott spermát kevertem. A kontroll csoportok megtermékenyítésére a mélyhűtött minták spermamennyiségével arányos mennyiségű friss spermát (40 µl) használtam. A termékenyülés sikerességét a szempontos stádiumba lépett ikraszemek és kikelt lárvák aránya (szempontos ikra vagy kikelt lárva/összes ikra) alapján állapítottam meg. Az ikraszemek és lárvák számlálását a telep dolgozói végezték 42 nap elteltével, míg a kelést 56 nap elteltével határozták meg.

Az adatok elemzése

Az értékek normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov-próbával ellenőriztem (szignifikancia szint: $P \leq 0{,}05$). A különböző csoportok összehasonlításánál többszempontos varianciaanalízist és Bonferroni-próbát alkalmaztam.

3.5.3. Az adriai pérben (Thymallus thymallus) végzett vizsgálatok

Mintavétel

Vizsgálataimat 2014-2015 között Tolminban, a Tolmini Horgász Egyesület telepén végeztem. Kutatásaim során, a telepen található adriai pér (**44. ábra**) tenyészállomány ivarérett ikrás (általában 5-10) és tejes halait (10-15) használtam. A mintavételt a fentebb ismertett módon végeztem.

44. ábra. Az adriai pér (*Thymallus thymallus*). (Fotó: Horváth Ákos)

Spermavizsgálat

A frissen lefejt és felolvasztott sperma kiindulási motilitását számítógépes spermavizsgáló berendezés segítségével határoztam meg a sebes pisztráng fajban leírt módon. Minden esetben az öt legmagasabb motilitást mutató spermamintát választottam ki termékenyítési kísérleteimhez.

Sejtkoncentráció meghatározása

Vizsgálatomban a megfelelő sperma ikra arány teszteléséhez (2014) és alkalmazásához (2015) meghatároztam mélyhűtésre és termékenyítésre kiválasztott mintáim sejtkoncentrációját. A sejtkoncentráció meghatározására a sügér fajban végzett vizsgálatoknál leírt módszert használtam 100-szoros vagy 1000-szeres hígításban. A sejteket szabad szemmel, fénymikroszkóp segítségével számoltam le (Olympus BX 41, Olympus Corporation, Egyesült Államok).

Mélyhűtés és felolvasztás

2014-es vizsgálatomban az 5 kiválasztott spermamintát 1:1 arányban hígítottam ki pér hígítóban (lásd: **3.3.1.** fejezet), amihez védőanyagot adagoltam (lásd: **3.1.** fejezet). Minden egyedtől 5-5 műszalmát fagyasztottam le, amiből 4-et termékenyítésre, egyet pedig a motilitás ellenőrzésére használtam fel. A mélyhűtést hűtődobozban végeztem. A műszalmákat kézmeleg vízben 13 mp-ig olvasztottam fel.

2015-ös vizsgálatomban 3 publikált mélyhűtési módszer eredményességét hasonlítottam össze (Horváth et al. 2012, Lahnsteiner et al. 1996d, Nynca et al. 2015b). A módszerek leírását a **2. táblázat** tartalmazza. A mintákat hűtődobozban fagyasztottam le. A mintákat vízfürdőben olvasztottam fel 40 °C-on a műszalma méretével arányos időintervallumban (0,5 ml: 13 másodperc, 0,25 ml: 5 másodperc).

2. táblázat: Különböző spermamélyhűtési módszerek a pér fajban.

	Horváth et al. 2012 (Hm)	Lahnsteiner et al. 1996d (Lm)	Nynca et al. 2015b (Nm)
Hígító összetétele	200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0	103 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM CaCl2, 0,8 mM MgSo4, 20 mM Hepes, 1,5 % BSA, 7% tojássárgája, 0,5 % szacharóz pH 7,8	180 mM glükóz
Védőanyag típusa	metanol	metanol	metanol
Védőanyag koncentráció (%)	10	10	9
Hígítási arány	1:1	1:3	1:5
Műszalma mérete (ml)	0,5	0,5	0,25
Hűtés magassága (cm)	3	1,5	3
Hűtés időtartama (perc)	3	5	5
Ekvilibráció (perc)	0	0	15

Termékenyítési teszt

2014-es kísérletemben 10 ikrás kevert ikratételéből alakítottam ki csoportokat a négy tesztelni kívánt sperma:ikra arány alapján (10^3, 5×10^3, 10^4, 5×10^4 spermium/ikraszem). A spermaminták egyedi sejtkoncentrációja alapján a mélyhűtött és kontroll csoportokban meghatároztam a megfelelő sperma mennyiséget. A termékenyítéshez 10 g ikrát (840 ikraszem) használtam csoportonként. A termékenyítést Billard-féle (lásd: **3.5.1.** fejezet) oldattal végeztem. 2015-ös kutatásomban a háromféle protokollal mélyhűtött mintákat, az egyedi sejtkoncentráció alapján, azonos arányban ($1{,}5\times10^5$ spermium/ikraszem) termékenyítettem a felolvasztott (5 minta) és friss spermával (3 minta) a 3 egyedtől származó kevert ikratételeket 10 g (800 ikraszem). Aktiválóként vizsgálatomban, a fentebb említett kísérlethez hasonlóan, Billard-féle oldatot alkalmaztam. A termékenyülés sikerét a márványpisztráng fajban leírt módszertan alapján határozták meg a telep munkatársai (termékenyülés: 10 nap, kelés: 14 nap).

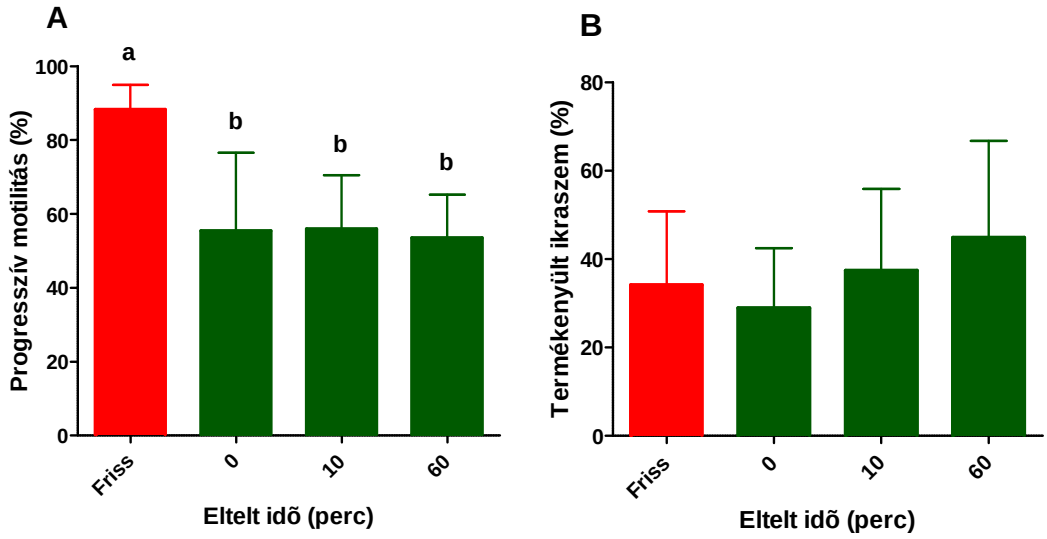
Eredmények értékelése

Az átlagok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov-próbával vizsgáltam (szignifikancia szint: $P\leq0{,}05$). A kezelés csoportok összehasonlítása során független kétmintás t-próbát, egyszeres varianciaanalízist, és Tukey-tesztet alkalmaztam.

3.5.4. Lazacfélékben végzett vizsgálatok eredményei

A sebes pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

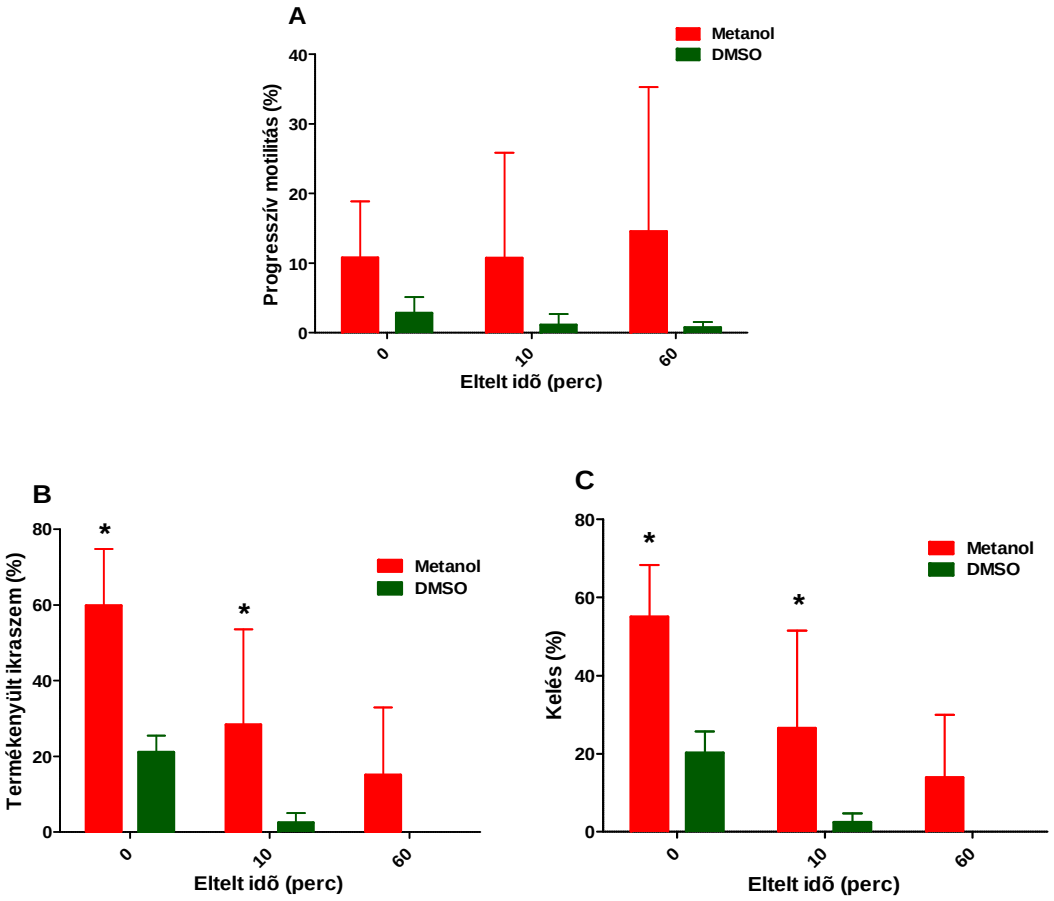
A felolvasztás utáni tárolás során a mélyhűtött minták között sem a pMOT, sem pedig a termékenyülés értékekben nem találtam szignifikáns különbséget. A termékenyülés eredmények a kontrollhoz képest sem mutattak szignifikáns csökkenést. A legmagasabb pMOT értéket (56±15%) 10, termékenyülést (45±22%) 60 perccel a felolvasztást követően rögzítettem. Minden mélyhűtött csoportban rendkívül magas, 50% feletti progresszív motilitást tapasztaltam, ami azonban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a kontroll csoporthoz (88±7%) viszonyítva. (**45A és B. ábra**).



45. ábra. A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolása során mért pMOT (A) és termékenyülés (B) eredmények (*N*=6) sebes pisztráng fajban. Az ábrákon átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

A márványpisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

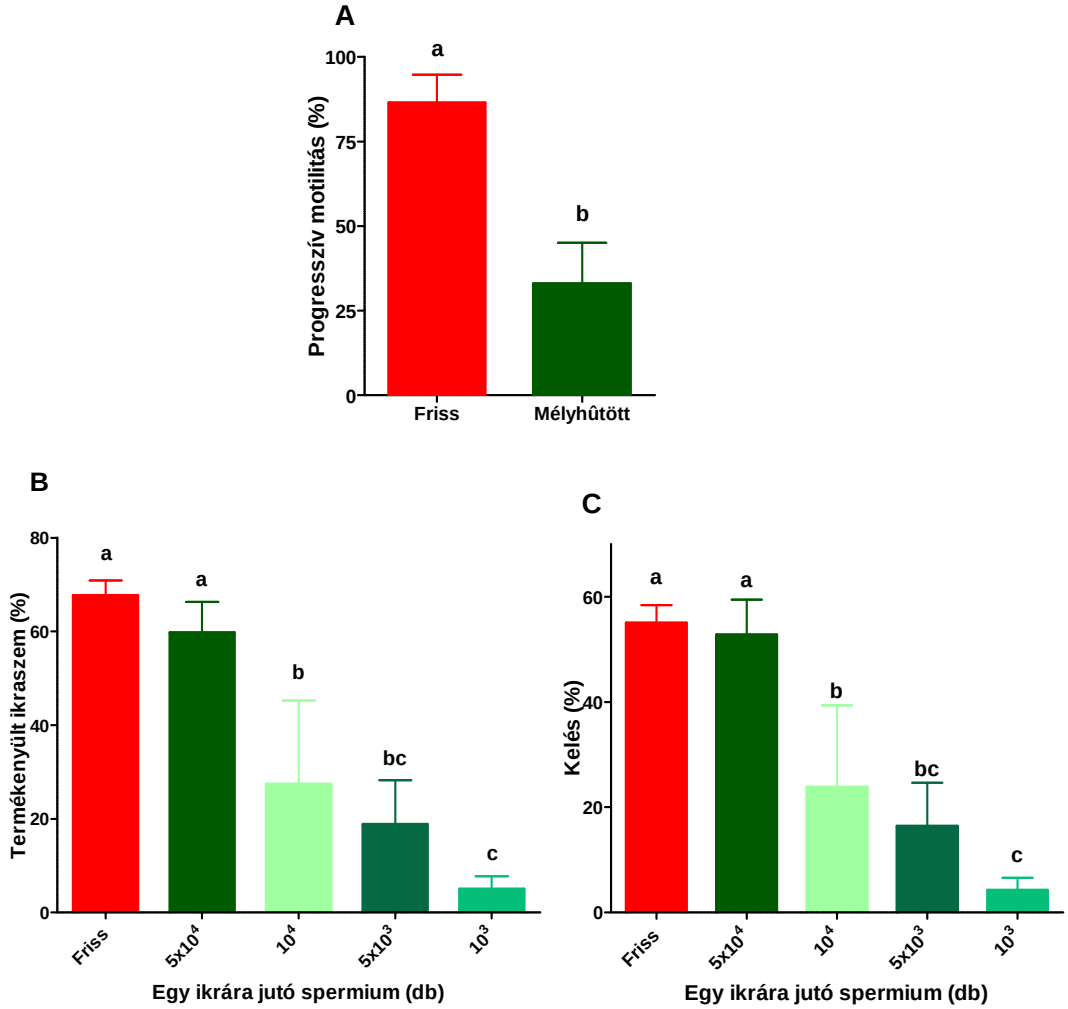
Szignifikánsan különböző termékenyülési és kelési értékeket állapítottam meg a metanollal fagyasztott csoport esetében a 0 perces (termékenyülés: 60±15%, kelés: 55±13%) és 60 perces (termékenyülés: 15±18%, kelés: 14±16%) tárolás között. A DMSO esetében szignifikáns különbséget tapasztaltam a 0 perces (termékenyülés: 21±4%, kelés: 20±5%) és 10 perces (termékenyülés: 3±2%, kelés: 2±2%), valamint a 0 és 60 perces (0% termékenyülés) csoportok között. A metanol esetében szignifikánsan magasabb termékenyülést és kelést rögzítettem 0 és 10 perc elteltével, mint a DMSO-val. A motilitás értékek tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két hígító használatával kapott értékek között (**46A-C. ábra**).



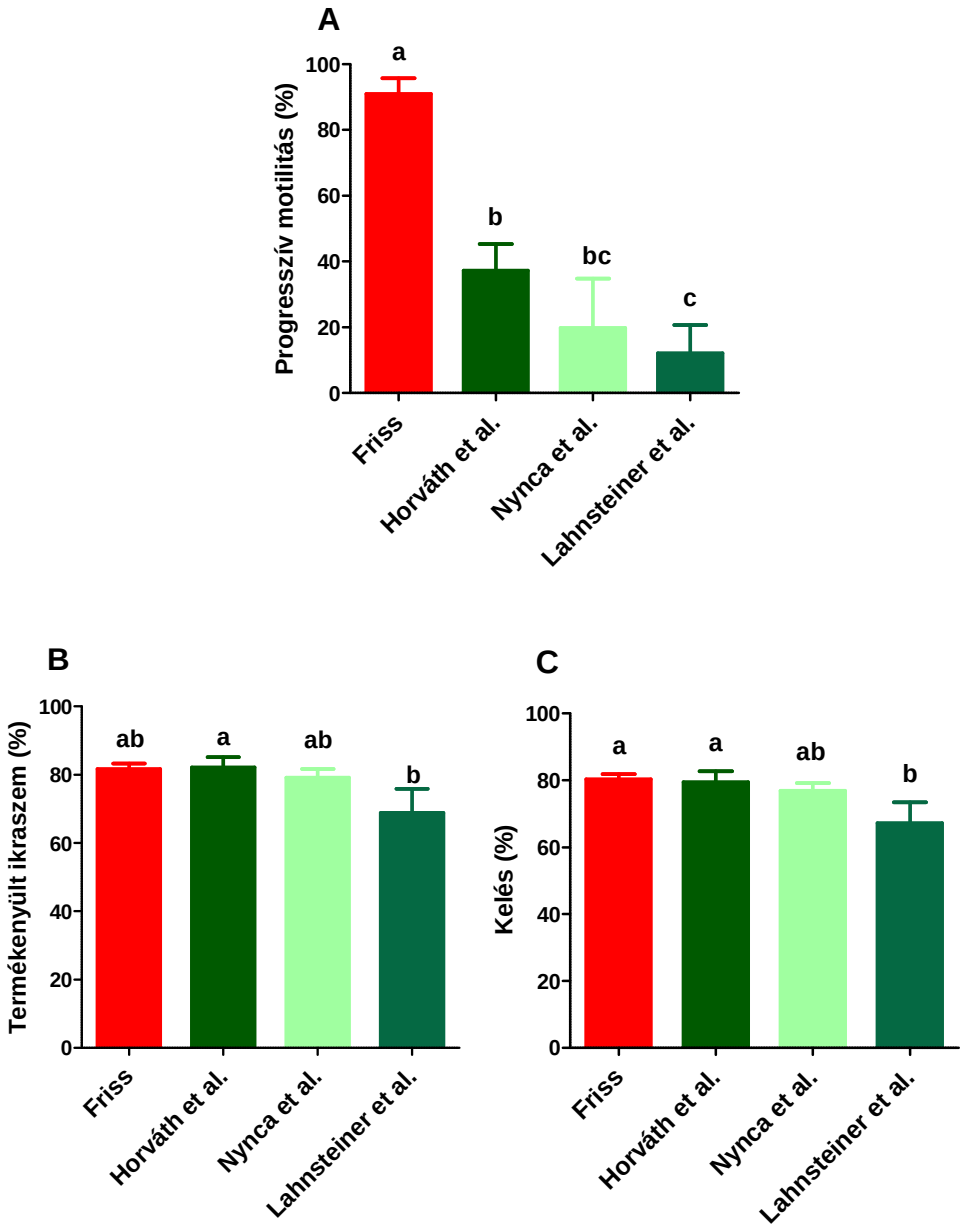
46. ábra. Két eltérő hígító és 60 perces felolvasztás utáni tárolási idő tesztelése során rögzített pMOT (A), termékenyülés (B) és kelés (C) eredmények (*N*=5) márványpisztráng fajban. Az ábrákon átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*”-gal jelölt védőanyagok, adott időpontban szignifikánsan különböznek a másiktól (*P*≤0,05).

Az adriai pérben végzett vizsgálatok eredményei

A legmagasabb termékenyülést (60±7%) és kelést (53±7%) a mélyhűtött csoportok közül az átlagosan 5×10^4 spermiumot számláló csoportban értem el, mely a kontrolltól szignifikánsan nem különbözött (termékenyülés: 68±3%, kelés: 55±3%). Az átlagosan 10^4, 5×10^3 és 10^3 sejtszámú csoportokban szignifikánsan alacsonyabb termékenyülési és kelési értékeket rögzítettem. A pMOT a mélyhűtés hatására szignifikánsan csökkent (friss: 86±8%, mélyhűtött: 33±12%). Szignifikánsan alacsonyabb termékenyülést mértem Lm-el (69±7%), mint a Hm-el (82±3%), és alacsonyabb kelést (67±6%), mint a kontrollban (80±2%) valamint ugyancsak Hm-el (79±3%). Szignifikánsan alacsonyabb pMOT-ot rögzítettem Lm-el (12±9%), mint Hm-el (37±8%). A mélyhűtés következtében, minden módszer esetében szignifikánsan csökkent a pMOT (**47 és 48A-C. ábra**).



47. ábra. A sperma-ikra arány meghatározása során rögzített pMOT (A), termékenyülés (B), és kelés eredmények (C) adriai pér fajban (*N*=5). Az ábrákon átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).



48. ábra. A három különböző mélyhűtési módszer összehasonlítása során mért pMOT (A), termékenyülés (B), és kelés (C) (*N*=5). Az ábrákon átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek (*P*≤0,05).

3.5.5. A lazacfélékben kapott eredmények értékelése

A sperma felolvasztása utáni tárolási idő a pisztrángfélék esetében is nagy gyakorlati jelentőséggel bír a mélyhűtés keltetőházi szaporításban való alkalmazásának előkészítésében (Golshahi et al. 2015, Nynca et al. 2015a). Eredményeim alapján a sebes pisztráng (*Salmo trutta* m. *fario*) sperma esetében a tárolási idővel szemben mutatott tolerancia kiemelkedőnek bizonyult. Az irodalomban több mint 30 éve tartotta magát a megállapítás, hogy pisztrángfélék esetében 30 másodperccel a felolvasztás után már jelentősen csökken a sperma termékenyítőképessége (Lahnsteiner et al. 1996c, Stoss és Holtz 1981a). Kísérletemben a sebes pisztráng esetében 60 perccel a felolvasztás után is jó

termékenyülést tudtam elérni. Nynca et al. (2015a) a pataki szajbling (*Salvelinus fontinalis*), Golshahi et al. (2015) a kaszpi sebes pisztrángban (*Salmo trutta caspius*) esetében ért el hasonló eredményt 60 perces tárolás során. A márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) sperma nem mutatott hasonló ellenállóképességet, érzékenynek bizonyult a tárolási időre. A sebespisztráng-spermában mért magas motilitás kimagasló eredménynek bizonyult. Korábbi irodalmi adatok a pisztrángfélék esetében jelentkező alacsony felolvasztás utáni mozgási képességről számoltak be (Dziewulska és Domagala 2013). Kutatásom, valamint a Nynca et al. (2014) által közölt eredmények bizonyították a sebes pisztráng esetében a mélyhűtés alkalmazhatóságát. Vizsgálataim a sebes- és márványpisztráng-sperma eltérő toleranciáját igazolták a mélyhűtés és a felolvasztás utáni tárolás során.

Az adriai pér (*Thymallus thymallus*) esetében az optimális felolvasztott sperma:ikra arány meghatározása és a mélyhűtési módszerek összehasonlítása együttesen a fagyasztás módszerének egységesítését szolgálta. Az 5×10^4:1 spermium/ikra arány a kontrollhoz hasonló magas termékenyülést eredményezett. Az eredménnyel bizonyítottam, hogy a Nynca et al. (2015b) által használt $1{,}5\times10^5$:1 spermium/ikra aránynál jóval alacsonyabb mennyiségű spermium is sikeres termékenyülést eredményezhet.

A különböző módszerek összehasonlítása során Lahnsteiner et al. (1996d) által közölt mélyhűtési protokoll működött a legkisebb hatékonysággal. Az általam használt (Horváth et al. 2012) és Nynca et al. (2015b) módszere a kontrollhoz hasonló termékenyülési eredményt hozott, mely a pérsperma-mélyhűtés alkalmazhatóságát bizonyította két különböző eljárással. Gyakorlati szempontból gazdaságosabb az általam alkalmazott 0,5 ml-es műszalma méret, szemben a Nynca et al. által alkalmazott 0,25 ml-es műszalmával, hiszen egyidejűleg több spermium mélyhűtését teszi lehetővé a kétszeres kapacitás. A módszeremben használt 1:1-es hígítási arány, szemben az 1:5 aránnyal, sűrűbb fagyasztott mintát eredményez, mely tovább növelheti a spermabank hatékonyságát (több spermium áll rendelkezésre a termékenyítés során).

3.6. Új tudományos eredmények

1. Meghatároztam a lénai és vágótok sperma felolvasztás utáni felhasználhatóságának időben korlátait (lénai tok: 6 óra, vágótok: 2 óra).
2. Kidolgoztam egy hatékony spermavizsgálati (módosított Lahnsteiner féle immobilizáló illetve aktiváló és általános sügér aktiváló) és két mélyhűtési módszert a sügér fajban [módosított Tanaka hígító, 1:10 és 1:20 hígítási arány, 3 cm-en a folyékony nitrogén gőzében 3 percig, vagy programozható fagyasztó berendezéssel (hűtés kezdete: 7,5 °C, hűtés befejezése: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc)]. A fagyasztás kis és nagy mennyiségű minta esetében egyaránt magas termékenyülést eredményezett.
3. Egységesítettem a pontysperma mélyhűtésének egyes paramétereit (pér hígító, 1:9 hígítási arány). A módszert sikeresen teszteltem nagy mennyiségű sperma mélyhűtése során (programozható fagyasztó berendezés, hűtés kezdete: 7,5 °C, hűtés befejezése: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc).
4. Meghatároztam a sebes pisztráng és márványpisztráng mélyhűtött spermájának fejés utáni felhasználhatóságának időbeni korlátait (60, illetve 10 perc). Utóbbi esetében kísérletesen bizonyítottam, hogy a metanol eredményesebben alkalmazható védőanyag a spermamélyhűtés során, mint a DMSO. Az adriai pér sperma esetében eredményesen alkalmazható, felolvasztás utáni alacsony spermium/ikra arányt (5×10^4:1) megállapítottam, valamint kísérletesen kiválasztottam a fagyasztás során jól működő leggazdaságosabb módszert (Horváth et al. 2012).

3.7. Javaslatok

Eredményeim alapján, a gyakorlati alkalmazás, illetve a kísérletes körülmények között végzett vizsgálatok elősegítése céljából a következő javaslatokra szeretném felhívni a figyelmet:

1. Javaslom a mélyhűtött lénai toksperma felhasználását legfeljebb 6 órával, míg a vágótokét legfeljebb 2 órával a felolvasztást követően.
2. A sügérsperma minősítése során a minták kihígítására javaslom a módosított Lahnsteiner féle immobilizáló, aktiválására pedig a módosított Lahnsteiner féle aktiváló vagy az általános sügéraktiváló alkalmazását.
3. A sügérsperma mélyhűtése során javaslom az 1:10-es hígítási arány, a módosított Tanaka hígító és a programozható berendezés használatát.
4. A ponty esetében az 1:9-es hígítási arány és a pér hígító alkalmazását, valamint a programozható berendezés felhasználását.
5. Javaslom a mélyhűtött márvány- és sebes pisztráng sperma felhasználást legfeljebb 1 órával a felolvasztást követően.
6. Az adriai pér sperma mélyhűtésére javaslom Horváth et al. módszerét, továbbá termékenyítésnél az 5×10^4:1-es spermium-ikra aránya alkalamazását a felolvasztást követően.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásom során két tokféle (lénai tok (*Acipenser baerii*) és vágótok (*Acipenser gueldenstaedtii*)), ponty (*Cyprinus carpio*), sebes pisztráng (*Salmo trutta* m. *fario*) és márványpisztráng (*Salmo marmoratus*), valamint adriai pér (*Thymallus thymallus*) fajok esetében a sperma tárolhatóságát vizsgáltam és a mélyhűtés egységesítését végeztem el. A sügér (*Perca fluviatilis*) és különböző aranyhal (*Carassius auratus*) változatok esetében a sperma minőségvizsgálatának, tárolhatóságának optimalizálását és effektív fagyasztásának fejlesztését hajtottam végre.

A lénai tok és vágótok esetében a felolvasztás után mértem a sperma motilitását és membrán-integritását 12 órán keresztül. A mintákat 4 °C-on tároltam. A lénai tok sperma felolvasztása után átlagosan a sejtek fele mozgott (50±24%). A 6 és 12 két óra között mért motilitás értékek statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak a közvetlenül a felolvasztás után mért átlagos motilitáshoz képest. A spermiumok életképessége jelentősen nem változott. Közvetlenül a vágótok sperma felolvasztása után 32±10%-os motilitást mértem. Az átlagos motilitási értékek 2, illetve 12 óra tárolási idő között már szignifikánsan alacsonyabbak voltak a közvetlenül felolvasztás után mért eredményhez képest. A hosszú idejű tárolás nem volt negatív hatással a vágótok mélyhűtött spermiumainak membránszerkezetére.

A sügérben végzett kutatásaim során meg kívántam határozni egy, a spermavizsgálathoz elengedhetetlen, jól működő immobilizáló és aktiváló oldatot. Teszteltem a frissen lefejt sperma tárolhatóságát (4 °C) kihígított (6 óra) és natív állapotban (1 óra). A mélyhűtési módszer kidolgozása és optimalizálása során összehasonlítottam különböző hígítókat, hígítási arányokat, valamint aktiválókat. Megvizsgáltam a sperma felolvasztás utáni tárolhatóságát, a sejtkoncentráció és az ekvilibrációs idő hatását. Átültettem a laboratóriumi körülmények között hűtőkereten és polisztirol dobozban jól működő módszert egy kontrollált körülményeket biztosító, nagy mennyiségű műszalma mélyhűtésére alklamas fagyasztó berendezésre. Termékenyítést végeztem kis- és nagy mennyiségben mélyhűtött sperma alkalmazásával. Az immobilizáló kiválasztása során a legmagasabb progresszív motilitás értékeket 0, 2, 4, és 6 órás kihígított tárolást követően Lahnsteiner féle immobilizáló (Li) esetében rögzítettem. A motilitás csökkenése a tárolási idő során kisebb mértékű volt a Lahnsteiner féle immobilizáló oldat esetében, mint pér hígító (Ph) és Tanaka hígító (Th) használata során. Az aktiváló oldatok összehasonlítása során a ponty aktiváló (Pa, 78±11%), Lahnsteiner féle aktiváló (La, 75±16%), Woynárovich oldat (Wo, 76±13%) és sügér aktiváló (Sa, 68±16%) esetében a 10 másodpercnél mért progresszív motilitás nem különbözött szignifikánsan. Harminc másodperc elteltével mindegyik vizsgált aktiváló oldat esetében 5 % alá csökkent a motilitás. Húsz másodperc alatt a legkisebb mértékű motilitáscsökkenést La-nál mértem. A 6 órás natív tárolás során a motilitás 2 óra elteltével szignifikánsan csökkent. A Th (54±14 %) eredményesebbnek bizonyult a sügérsperma mélyhűtésénél, mint a Li (19±17%). A legmagasabb motilitást az 1:20 hígítási aránynál mértem. A felolvasztott sperma tárolásánál a motilitás negyed óra után csökkent, ám szignifikáns csökkenést csak 2 óra elteltével tapasztaltam. A kis mennyiségben mélyhűtött sperma termékenyítő-képessége szignifikánsan csökkent, de az elért termékenyülési arány magas volt (friss sperma: 86±5% és mélyhűtött sperma: 75±6%). A vizsgálatban mért progresszív motilitás értékek nem mutattak szignifikáns különbséget (friss sperma: 76±24% és mélyhűtött sperma: 58±25%). A CRF esetében a pMOT és VCL értékek a friss spermához viszonyítva nem mutattak

szignifikáns csökkenést. A hűtődobozban fagyasztott mintáknál a paraméterek (pMOT, VCL) értékei szignifikánsan különböztek a kontroll csoportétól. Az 1:20 hígítási arány mellett a CRF-fel mélyhűtött csoportban a pMOT szignifikánsan magasabb volt, mint 1:5 hígítás esetében. Szignifikánsan magasabb VCL értékeket mértem 1:20 hígítási arány alkalmazása során, mint 1:5 és 1:10 arányok esetében. A pMOT és STR értékek esetében nem találtam szignifikáns különbséget a kihígított minták között a különböző ekvilibrációs idők (0, 30 illetve 60 perc) esetében. A felolvasztott sperma motilitás paraméterei nem csökkentek a 60 perces ekvilibrációs idő hatására. A pMOT értékek-hígítási arány (p=0,7), és pMOT értékek-sejtkoncentráció (p=0,1) között korrelációt nem tapasztaltam. A tesztelt aktiválók között nem fedeztem fel különbséget a különböző időpontokban (0,10,20,30,60,90,120 mp) rögzített pMOT, VCL és STR paraméterek vizsgálata során. A felolvasztott sperma motilitása minden esetben csökkent 30 másodperc elteltével mind a négy aktiváló használatakor. A nagy mennyiségű szalma mélyhűtése során optimális pMOT (37±7%), VCL (92±10 µm/s), és STR (89±3%) értékeket rögzítettem megfelelő szórás értékekkel. A felolvasztott sperma esetében kiváló, 72±14%-os termékenyülést mértem.

A pontysperma fagyasztásának optimalizálása során a 60 perces ekvilibrációs idő, különböző hígítók, hígítási arányok, aktiváló oldatok, és mélyhűtési módszerek hatását vizsgáltam. Meghatároztam egy lehetséges felolvasztás utáni tárolási időtartamot, valamint fagyasztó berendezés alkalmazhatóságát teszteltem nagymennyiségű pontysperma mélyhűtése során. A hígítás és felolvasztás után mért pMOT, VCL és STR értékek nem csökkentek szignifikánsan az 60 perc ekvilibrációs idő hatására. A mélyhűtés hatására a pMOT és VCL csökkenése volt megfigyelhető mindhárom felolvasztott csoportban. Hasonló motilitás értékeket rögzítettem a hűtődoboz és a fagyasztó berendezés segítségével mélyhűtött sperma esetében. Szignifikánsan magasabb pMOT és VCL értékek voltak megfigyelhetőek pér hígítóval, mint a HBSS-el és a szeminális folyadékkal. A legmagasabb felolvasztás utáni pMOT és VCL a pér hígító esetében 1:9 (pMOT: 52±12%, VCL: 76±9 µm/s) és 1:20 (pMOT: 49±8%, VCL: 76±6 µm/s) hígítás mellett volt megfigyelhető. A pér hígító esetében szignifikánsan magasabb pMOT és VCL értékeket mértem 1:5, 1:9 és 1:20 hígítási arányok mellett, mint a módosított változatban. A vizsgálat során 60 másodperc elteltével a ponty aktiváló (Pa, 28±7%) és desztillált víz (Dv, 5±7%) esetében egyaránt már szignifikánsan alacsonyabb pMOT értékeket rögzítettem, mint 10 másodpercnél (Pa: 50±6%, Dv: 55±11%). A ponty aktiváló alkalmazása során a desztillált vizes aktiváláshoz képest szignifikánsan magasabb értékeket mértem pMOT és VCL esetében 60 másodperc, STR esetében 90 másodperc elteltével. A Pa-val aktivált csoportokban még 120 perc elteltével is mértem aktív mozgást. A mélyhűtött pontysperma pMOT, VCL, STR értékei nem csökkentek 1, illetve 6 órás felolvasztás utáni tárolás során. A nagymennyiségű műszalma mélyhűtése során a termékenyítés szempontjából ideális pMOT (47±5%) VCL (62±9 µm/s) és STR (91±1%) értékeket rögzítettem. A fagyasztott sperma esetében 32±6%-os termékenyülést tapasztaltam.

Különböző aranyhal változatok spermáján végzett kutatások során egy kevert állományon elővizsgálat keretében a frissen lefejt sperma tárolhatóságát teszteltem 4 °C-on illetve 20 °C-on, 27 órán keresztül. A fekete teleszkópszemű, Oranda, és Calico aranyhalak esetében a sperma tárolhatóságát 4 °C-on vizsgáltam fejés után 48; felolvasztást követően 6 órán keresztül. Összehasonlítottam a három változatra jellemző sejtsűrűséget, valamint az Oranda és Calico aranyhalaknál termékenyítést végeztem. A kevert állományon végzett vizsgálatban, a lefejt sperma minták pMOT

értékei nem csökkentek 10 órás tárolás alatt. A 4 °C-on tárolt minták esetében még 27 óra elteltével is pMOT-t mértem (64±15%). A fekete teleszkópszemű és Calico aranyhal sperma motilitás paraméterei nem csökkentek a tárolás hatására. Az Oranda változat esetében pMOT és VCL 48 óra óra elteltével a kontrollhoz képest szignifikáns csökkenést mutatott. A 3 féle aranyhal sperma sejtsűrűsége szignifikánsan nem különbözött. A fekete teleszkópszemű és Oranda változatok mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni pMOT, VCL és STR értékei 6 órás tárolás során nem csökkentek szignifikánsan. Calico aranyhalban 6 óra elteltével szignifikánsan alacsonyabb pMOT-t rögzítettem, mint 0 óránál. Az Oranda (friss: 72±9%, mélyhűtött: 14±2%), illetve Calico (friss: 63±17%, mélyhűtött: 23±6%) változatok mélyhűtött spermája alacsony termékenyülést eredményezett.

A sebes pisztrángban végzett kutatásban a felolvasztás utáni tárolhatóságot (0,10, illetve 60 perc) vizsgáltam. A márványpisztráng esetében különböző védőanyagok, valamint a felolvasztás utáni tárolhatóság (lásd: sebes pisztráng) hatását mértem. Az adriai pérben különböző sperma-ikra arányok és mélyhűtési protokollok hatását vizsgáltam a mélyhűtés során. A sebes pisztráng esetében a legmagasabb pMOT (56±15%) és termékenyülés (45±22%) értékeket a felolvasztás után 10 illetve 60 perc elteltével rögzítettem. Minden mélyhűtött csoportban rendkívül magas, 50% feletti pMOT-t mértem. A márványpisztrángban a metanol esetében szignifikánsan magasabb termékenyülést és kelést rögzítettem a felolvasztás után 0 és 10 perc elteltével, mint a DMSO használatakor. Szignifikáns csökkenést rögzítettem a termékenyülés és kelés értékeknél a metanol alkalmazásával a 0 és 60 perces tárolás között. A DMSO esetében hasonló eredményt tapasztaltam a 0 és10 perces, valamint a 0 és 60 perces csoportok között. A pérben végzett vizsgálatok során a legmagasabb termékenyülést (60±7%) és kelést (53±7%) az átlagosan $5x10^4$ spermiumot számláló csoportban értem el, amely a friss kontrolltól szignifikánsan nem különbözött (termékenyülés: 68 ± 3%, kelés: 55 ± 3%). Lm-el szignifikánsan alacsonyabb pMOT-ot és termékenyülést mértem, mint a Hm esetében. Lm ugyan csak alacsonyabb kelést mutatott, mint Hm és a kontroll.

10.14751/SZIE.2016.014

5. SUMMARY

In my study, the standardization of sperm cryopreservation and the evaluation of effective post-thaw storage period were carried out in various sturgeon (Siberian sturgeon-*Acipenser baerii*, Russian sturgeon-*Acipenser gueldenstaedtii*), cyprinids (common carp-*Cyprinus carpio*, goldfish-*Carassius auratus*), salmonids (brown trout- *Salmo trutta* m. *fario*, marble trout-*Salmo marmoratus*, Adriatic grayling-*Thymallus thymallus*) and in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). The objective of our experiments to improve or establish cryopreservation methods and to optimize the factors which can affect the process. The results obtained from the investigation can support the successful integration of the sperm cryopreservation into the hatchery practice.

Sperm quality in the endangered Siberian sturgeon and the critically endangered Russian sturgeon was investigated for 12 hours following thawing using a CASA (Computer assisted sperm analysis) system and a viability (live/dead staining–cell membrane integrity) assay. pMOT was analyzed in 1-hour, while viability in 3-hour intervals. A sucrose-based extender and 10% methanol was used for sperm cryopreservation. pMOT of Siberian sturgeon sperm decreased from 50% at the moment of thawing to 5% at 12 hours post-thaw. In case of Russian sturgeon, we found the same results, whereas the motility decreased from 32% to 2%. A significant reduction in Siberian sturgeon was observed already after 6 hours whereas in Russian sturgeon after 2 hours in comparison with 0 hour. Drastic reduction of motility during post-thaw storage was not accompanied with decrease of viability of sturgeon spermatozoa.

In the Eurasian perch, the selection of an efficient immobilizing and activating solution for CASA analysis was carried out. The possible storage time (4 °C) of stripped undiluted native (1 hour) and prediluted sperm (6 hours) were tested. Through standardization of the cryopreservation process, an optimal extender, dilution ratio and activating solution were selected. In our work, the effective storage time following thawing was measured as well. The effects of equilibration time and cell concentration on fresh and thawed sperm quality were investigated. The technique developed for a Styrofoam box, was adapted to a controlled rate freezer. Fertilization rate was performed both in small- and increased-scale. Modified Lahnsteiner immobilizing solution showed the highest pMOT at 0, 2, 4 and 6 h of storage. Progressive motility showed lower decrease in case of modified Lahnsteiner immobilizing solution during 6 hours storage than in modified Tanaka extender or grayling extender. Sperm activated with activating solution for cyprinids (78±11%), modified Lahnsteiner activating solution (75±16%), Woynárovich solution (76±13%) and common activating solution for perch (68±16%) showed similar pMOT at 10 seconds after activation. At 30 seconds after activation progressive motility decreased with every activating solutions below 5%. The lowest reduction in progressive motility was measured during 20 seconds with modified Lahnsteiner activating solution. pMOT decreased significantly already after 2 hours of storage. Perch sperm cryopreserved with modified Tanaka extender (54±14 %) showed significantly higher progressive motility after thawing than with modified Lahnsteiner immobilizing solution (19±17%). The dilution ratio of 1:20 showed the highest pMOT. Post-thaw sperm was sensitive to storage time however the reduction of progressive motility was statistically significant only after 2 hours. Thawed sperm (small-scale) resulted in a high fertilization rate (75±5%) compared to that with fresh sperm (86±5%). Although, fertilizing capacity has reduced as a result of

cryopreservation, progressive motility did not show a significant reduction in the same experiment (76±24% in fresh sperm and 58±24% in cryopreserved sperm). Progressive motility and curvilinear velocity of sperm cryopreserved with CRF did not reduce significantly compared to fresh sperm parameters. On the other hand, progressive motility and VCL of sperm cryopreserved with the conventional Styrofoam box technique were significantly lower when compared to the fresh control. Perch sperm cryopreserved with CRF at a dilution ratio of 1:20 showed significantly higher pMOT than at a ratio of 1:5 and showed significantly higher VCL than at dilution ratios of 1:10 and 1:5. Significant decrease was not recorded in pMOT and STR among equilibrated groups for 0, 30, and 60 minutes in diluted sperm. After thawing, no decreasing tendency was observed among different equilibration times in all analyzed groups. No correlation was observed among progressive motility, dilution ratio (p=0.7) and cell concentrations (p=0.1). Similar pMOT and VCL was measured with different activating solutions during a 120 seconds post-thaw activation time. Nevertheless, sperm motility reduced notably after 30 seconds using all activators. Repeatable motility parameters with a moderate variability were recorded after thawing of 57 straws (pMOT: 37±7%, VCL: 92±10 µm/s, STR: 89±3%). Ten randomly selected straws from increased-scale cryopreservation resulted in a very high fertilization rate (72±14%).

Basic parameters of carp sperm cryopreservation were standardized using a controlled-rate freezer. The effect of different equilibration times, cryopreservation methods, extenders, dilution ratios, activating solutions on the post-thaw motility of common carp sperm was investigated. The suitable post-thaw storage time-interval as well as fertilizing capacity of cryopreserved sperm was also examined. The pMOT, VCL and STR values did not decreased significantly during 60 minutes of equilibration both in prediluted and thawed groups. Motility parameters of thawed sperm were similar for the two cryopreservation techniques. A significantly higher pMOT and VCL was measured in thawed sperm cryopreserved with grayling extender compared to Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and seminal fluid. Using grayling extender, pMOT and VCL were significantly higher at a dilution ratio of 1:5, 1:9 and 1:20 than with the modified grayling extender. The highest pMOT and VCL was measured with grayling extender at a ratio 1:9 (pMOT: 52±12%, VCL: 76±9 µm/s) and 1:20 (pMOT: 49±8%, VCL: 76±6 µm/s). A reduction in pMOT was recorded after 60 seconds using both activators (activating solution for cyprinids: 28±7%, distilled water: 5±7%) compared to 10 seconds (activating solution for cyprinids: 50±6%, distilled water: 55±11%). The pMOT and VCL were significantly higher using activating solution for cyprinids after 60 seconds than with distilled water. STR was notably higher after 90 seconds with activating solution for cyprinids compared to distilled water. Six hours storage time did not have a significant effect on the motility parameters of thawed carp sperm. Agglutination was observed during cryopreservation of elevated volume of milt. Optimal pMOT (47±5%), VCL (62±9 µm/s) and STR (91±1%) was measured after thawing. A fertilization rate 32±6% with thawed sperm was observed. In a mixed goldfish population, the effective storage time (stored on 4 and 20 °C) after stripping was measured for 27 hours.

The effective storage time after stripping (for 48 hours in 6 hours intervals) and after thawing (for 6 hours in 2 hours intervals) in Black moor, Oranda, and Calico goldfish types was also investigated. The variability of sperm density was also investigated in all lines. Fertilization was carried out with cryopreserved sperm in Oranda and Calico types. pMOT did not reduced significantly trough 10 hours

storage in the mixed goldfish types, however motility was measurable after 27 hours only in the group stored at 4 °C (64±15%). A significant reduction was detected in pMOT and VCL in Oranda type at 48 hours. pMOT, VCL, and STR did not decreased significantly for 48 hours in Black moor and Calico goldfish. A similar cell concentration was calculated among the three varieties. In Calico, pMOT decreased significantly 6 hours after thawing compare to 0 hour whereas VCL and STR showed no reduction. pMOT, VCL and STR was similar in Oranda through 6 hours of post-thaw storage. A parallel tendency was observed in Black moor. A low fertilization rate was revealed in Oranda (control: 72±9%, cryopreserved: 14±2%) and Calico (control: 63±17%, cryopreserved: 23±6%) goldfish using cryopreserved sperm.

The applicable post-thaw storage time (0, 10, 60 min) was investigated in the brown and marble trout. The effects of different cryoprotectants (DMSO and methanol) on the sperm quality following thawing in the marble trout was also measured. Various sperm to egg ratios and reported freezing protocols were compared in the Adriatic grayling. The highest pMOT (56±15%) and fertilization rate (45±22%) were measured in the brown trout at 10 and 60 minutes after thawing. Furthermore, cryopreserved groups showed a high pMOT (above 50%) following thawing. In the marble trout, significantly higher fertilization and hatching rate were measured at 0 and 10 minutes after thawing in the case of methanol compared to DMSO. A significant reduction in fertilization and hatching rate was recorded using methanol between 0 and 60 minutes. The similar tendency was observed with DMSO between 0 and 10, and 0 and 60 minutes. The highest fertilization (60±7%) and hatching rate (53±7%) were measured in the Adriatic grayling using a sperm to egg ratio $5x10^4$:1 whereas a similar result was observed in the fresh control (fertilization rate: 68 ± 3%, hatching rate: 55 ± 3%). The method reported by Lahnsteiner et al. (1996d) showed a significantly lower pMOT and fertilization rate compare to the method presented Horváth et al (2012). Likewise, a significantly lower hatching rate was recorded using the method published by Lahnsteiner et al. (1996d) than with the method presented by Horváth et al. (2012) and the fresh control.

10.14751/SZIE.2016.014

6. IRODALOMJEGYZÉK (MELLÉKLET)

Alavi, S.M.H., Mojazi, Amiri, B., Cosson, J., Karami, M., Abdoulhay, H.A., Pourkazemi, M., and Akhoundzadeh, M.A., (2006): Determination of some seminal plasma indices, sperm density and sperm motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. In: *Iranian Journal of Fisheries Science*, 5 (2), 1–18. p.

Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M., and Linhart, O., (2007): Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. In: *Theriogenology*, 68, 276–283. p.

Alavi, S.M.H., Linhart O., Coward, K., and Rodina, M., (2008): Fish Spermatology: Implications for Aquaculture Management. 397-460. p. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., and Rafiee, G., (Eds.): *Fish spermatology*. Oxford, United Kingdom: Alpha Science International Ltd., 465. p.

Alavi, S.M.H., Rodina, M., Viveiros, A.T.M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S., and Linhart, O., (2009): Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). In: *Theriogenology*, 72, 32–43. p.

Alvarez, B., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Cabrera, E., Pimentel, E., and Arenal, A., (2003): High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. In: *Aquaculture*, 220, 195–201. p.

Aramli, M.S., (2014): ATP content, oxidative stress and motility of beluga (*Huso huso*) semen: effect of short-term storage. In: *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 636–640. p.

Aramli, M.S., (2015): Study of enzyme activities and protein content of beluga (*Huso huso*) semen before and after cryopreservation. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 13–16. p.

Aramli, M.S., and Nazari, R.M., (2014): Motility and fertility of cryopreserved semen in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, stored for 30–60 min after thawing. In: *Cryobiology*, 69, 500–502. p.

Aramli, M.S., Kalbassi, M.R., Nazari, R.M., and Aramli, S., (2013): Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. In: *Animal Reproduction Science*, 143, 112–117. p.

Aramli, M.S., Kalbassi, M.R., and Nazari, R.M., (2014): Protein concentration and enzyme activities of fresh and frozen-thawed Persian sturgeon, *Acipenser persicus* (Borodin, 1897) semen. In: *International Aquatic Research*, 6, 54. p.

Aramli, M.S., Golshahi, K., Nazari, R.M., and Aramli, S., (2015a): Effect of freezing rate on motility, adenosine triphosphate content and fertilizability in beluga sturgeon (*Huso huso*) spermatozoa. In: *Cryobiology*, 70, 170–174. p.

Aramli, M.S., Nazari, R.M., and Gharibi, M.R., (2015b): Effect of Post-Thaw Storage Time on Motility and Fertility of Cryopreserved Beluga Sturgeon (*Huso huso*) Sperm. In: *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 349–352. p.

Ashwood-Smith, M.J., (1980): Low temperature preservation of cells, tissues and organs. 19-44. p. In: Ashwood-Smith M. J. and Farrant J. (Eds.): *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. Tunbridge Wells, Kent, England: Pitman Medical Ltd., 323. p.

Asturiano, J., Marco-Jiménez, F., Pérez, L., Balasch S., Garzón, D., Peñaranda, D., Vicente, J., Viudes-de-Castro, M., and Jover, M., (2006): Effects of HCG as spermiation inducer on European eel semen quality. In: *Theriogenology*, 66 (4), 1012-1020. p.

Aquagamete Cost Action (2015): Food and Agriculture COST Action FA 1205. http://aquagamete.webs.upv.es/. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Aquagamete Cost. Lekérdezés időpontja: 2015.09.12.

Babiak, I., Glogowski, J., Kujawa, R., Kucharczyk, D., and Mamcarz, A., (1998): Cryopreservation of Sperm from Asp *Aspius aspius*. In: *The Progressive Fish-Culturist*, 60, 146–148. p.

Babiak, I., Fraser, L., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H., Strzezek, J., (1999): Computer-controlled freezing of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spermatozoa for routine programmes. In: *Aquaculture Research*, 30 (9) 707-710. p.

Babiak, I.,Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J. and Demianowicz, W., (2001): Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. In: *Theriogenology*, 56, 177-192. p.

Babiak, I., Marschhäuser, V., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Eggen, B., and Babiak, J., (2012): Effects of extender, storage and sperm-to-egg ratio on cryopreservation success of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 941–947. p.

Basavaraja, N., and Hegde, S.N., (2004): Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. In: *Cryobiology*, 49, 149–156. p.

Baynes S.M., and Scott, A.P. (1987): Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. In: *Aquaculture*, 66, 53. p.

Bercsényi, M., Magyary, I., Urbányi, B., Orbán, L., and Horváth, L., (1998): Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. In: *Genome*, 41, 573–579. p.

Bergeron, A., Vandenberg, G., Proulx, D., and Bailey, J.L., (2002): Comparison of extenders, dilution ratios and theophylline addition on the function of cryopreserved walleye semen. In: *Theriogenology* 57, 1061–1071. p.

Billard, R., (1977): Utilisation d'un système Tris-glycocolle pour tamponner le dilueur d'insemination pour truite. In: *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 264, 102-112. p.

Billard, R., (1983): Ultrastructure of trout spermatozoa: Changes after dilution and deep-freezing. In: *Cell and Tissue Research*, 228, 205-218. p.

Billard, R, Cosson, J, Crim, L.W., and Suquet, M., (1995a): Sperm physiology and quality. 25–52. p. In: Bromage, N.R., and Roberts, R.J., (Eds): *Brood Stock Management and Egg and Larval Quality*. Amsterdam, The Netherlands: Blackwell Science.436. p.

Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., and Linhart, O., (1995b): Biology of sperm and artificial reproduction in carp. In: *Aquaculture*, 129, 95–112. p.

Billard, R., Cosson, J., Fierville, F., Brun, R., Rouault T., and Williot, P., (1999): Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baeri* spermatozoa. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 199-203. p.

Billard, R., Cosson, J., and Linhart, O., (2000): Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility. In: *Aquaculture Research*, 31, 283–287. p.

Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B., and Pourkazemi, M., (2004): Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. In: *Aquaculture* 236, 1–9. p.

Bobe, J., and Labbé, C., (2010): Egg and sperm quality in fish. In: *General and Comparative Endocrinology*, 165 (3), 535-548. p.

Bokor, Z., (2009): A harcsa (*Silurus glanis*) és a süllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata gyakorlati szempontok alapján. *Doktori értekezés*, Gödöllő.

Bokor, Z., Müller, T., Bercsényi, M., Horváth, L., Urbányi, B., and Horváth, A., (2007): Cryopreservation of sperm of two European percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga pikeperch (*S. volgensis*). In: *Acta Biologica Hungarica*, 58, 199–207. p.

Bokor, Z., Horváth, Á., Horváth, L., and Urbányi, B., (2008): Cryopreservation of Pike Perch Sperm in Hatchery Conditions. In: *Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*, 60, 168–171. p.

Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Li, P., Hulak, M., Gela, D., Linhart, O., (2009a): Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: *Cryobiology* 59, 291–296. p.

Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Stejskal, V., and Linhart, O., (2009b): Dynamics of ATP and movement in Eurasian perch (*Perca fluviatilis L.*) sperm in conditions of decreasing osmolality. In: *Theriogenology* 72, 851–859. p.

Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Alavi, S.M.H., Gela, D., and Linhart, O. (2011): Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 1147–1149. p.

Bozkurt, Y., and Yavas, I., (2012): Effect of Temperatures and Storage Periods on Fertilizing and Hatching of Short-Term Preserved Scaly Carp (*Cyprinus carpio*) Eggs. In: *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 64, 1–5. p.

Bozkurt, Y., Ogretmen, F., and Secer, F.S., (2010): Short-Term Preservation of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Eggs: Effect of Extenders and Storage Duration. In: *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 62 (3), 189–194. p.

Bozkurt, Y., Yavaş, İ., Yıldız, C. (2014): Effect of different avian egg yolk types on fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. In: *Aquaculture International*, 22, 131–139. p.

Brand M., Granato, M., and Nüsslein-Volhard, C., (2002): Keeping and raising zebrafish. 7-38. p. In: Nüsslein-Volhard, C., and Dahm, R., (Eds.): *Zebrafish: A Practical Approach*, New York, USA: Oxford University Press. 303. p.

Browne, R.K., Kaurova, S.A., Uteshev, V.K., Shishova, N.V., McGinnity, D., Figiel, C.R., Mansour, N., Agnew, D., Wu, M., Gakhova, E.N., Dzyuba B., and Cosson, J., (2015): Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. In: *Theriogenology*, 83, 1–13.

Butler, S., and Pegg, D., 2012: Precision in cryopreservation-Equipment and Control. 507-526. p. In: I. Katkov (Ed.): *Current Frontiers in Cryobiology*. Rijeka, Croatia: InTech. 574. p.

Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, J.K., and Herraez, M.P., (1998): Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. In: *Cryobiology*, 37, 245-253. p.

Cabrita, E., Anel, L., and Herraéz, M.P., (2001a): Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. In: *Theriogenology*, 56, 623–635.p.

Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., and Herraez, M.P., (2001b): Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. In: *Aquaculture*, 201, 301-314. p.

Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J.C., Sarasquete, C., and Herráez, M.P., (2005). Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. In: *Cryobiology*, 50, 273–284. p.

Cabrita E., Robles V., and Herraez, P., (2009): Sperm quality assessment. 93-147 p. In: Cabrita, E., Robles, V., and Herráez, P., (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species.* Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis Group. 549. p.

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., and Herráez, M.P. (2010): Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 623–635. p.

Cabrita, E., Robles, V., Sarasquete, C., and Herráez, M.P., (2011): New insights on sperm quality analysis for the improvement of broodstock. 146–161. p. In: Tiersch, T.R., and Green, C.C., (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species.* 2nd Edition. Baton Rouge, Luisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.

Caffey, R.H., and Tiersch, T.R., (2000): Cost Analysis for Integrating Cryopreservation into an Existing Fish Hatchery. In: *Journal of the World Aquaculture Society*, 31, 51–58. p.

Callard, G.V., (1991): Spermatogenesis. 303-341. p. In: Pang, A.P., és Schreibman, M., (Eds.) :*Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications, Volume 4*: *Part A.* New York, New York, USA: Academic press. 412. p.

Chantzaropoulos, A., Nathanailides, C., Kokokiris, L., Barbouti, A., and Zhang, T. (2015): A brief exposure to low pH prior to refrigerated storage reduces the motility and viability of goldfish sperm (*Carassius auratus*, Linnaeus, 1758). In: *Journal of Applied Ichthyology* 31, 89–93. p.

Christensen, J.M., and Tiersch, T.R., (1997): Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: Effect of cryoprotectant, straw size, and formulation of extender. In: *Theriogenology*, 47, 639–645. p.

Christensen, J.M., and Tiersch, T.R., (2005): Cryopreservation of channel catfish sperm: effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing conditions, and male-to-male variation. In: *Theriogenology*, 63, 2103–2112. p.

Christensen, P., Stryhn, H., and Hansen, C., (2005): Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. In: *Theriogenology*, 63, 992–1003. p.

Cloud, J., and Patton, S., (2009): Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. 237-250. p. In: Cabrita, E., Robles, V., and Herráez, P., (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species.* Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis Group. 549. p.

Ciereszko, A., Ramseyer, L., and Dabrowski, K., (1993): Cryopreservation of Yellow Perch Semen. In: *The Progressive Fish-Culturist*, 55, 261–264. p.

Ciereszko, A., Toth, G.P., Christ, S.A., and Dabrowski, K., (1996): Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. In: *Theriogenology*, 45, 665–672. p.

Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Nynca, J., Dobosz, S., and Zalewski, T., (2014): Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. In: *Aquaculture*, 420–421, 275–281. p.

Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Nynca, J., Krom, J., and Dobosz, S., (2015): Semen from sex-reversed rainbow trout of spring strain can be successfully cryopreserved and used for fertilization of elevated number of eggs. In: *Aquaculture*, 448, 564–568. p.

Cognie, P.F., Billard, R., and Chao, N.H., (1989): La Cryoconservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 5, 165–176. p.

Cosson, J., (2008): Methods to analyse the movements of fish spermatozoa and their flagella. 63-102. p. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., and Rafiee, G., (Eds.): *Fish spermatology*. Oxford, United Kingdom: Alpha Science International Ltd., 465. p.

Cuevas-Uribe, R., and Tiersch, T.R., (2011): Estimation of Fish Sperm Concentration by Use of Spectrophotometry. 162-200. p. In: Tiersch T.R., and Green C.C., (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2nd Edition. Baton Rouge, Luisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.

Denniston, S.R., Michelet S., and Godke, A.R., (2000): Principles of cryopreservation. 59-74. p.In: Tiersch, R.T., and Mazik, M.P., (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 439. p.

Devireddy, R.V., Campbell, W.T., Buchanan, J.T., and Tiersch, T.R., (2006): Freezing response of white bass (*Morone chrysops*) sperm cells. In: *Cryobiology*, 52, 440–445. p.

Dietrich, G.J., Ciereszko, A., Kowalski, R.K., Rzemieniecki, A., Bogdan, E., Demianowicz, W., Dietrich, M., Kujawa, R., and Glogowski, J., (2012): Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed sperm of Siberian sturgeon after a short-time exposure of fresh semen to mercury and cadmium. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 973–977. p.

Dietrich, G.J., Wolnicki, J., Slowinska, M., Sikorska, J., Hliwa, P., Kaminski, R., Liszewska, E., and Ciereszko, A., (2015): Short-term storage and cryopreservation of lake minnow (*Eupallasella percnurus* (Pallas, 1814)) sperm. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 75–78. p.

Dilauro, M., Krise, W., Hendrix, M., and Baker, S., (1994): Short-Term Cold-Storage of Atlantic Sturgeon Sperm. In: *Progressive Fish-Culturist*, 56 (2), 143–144. p.

Ding, F., Lall, S.P., Li, J., Lei, J., Rommens, M., and Milley, J.E., (2011): Cryopreservation of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) for commercial application. In: *Cryobiology*, 63, 56–60. p.

Dorsey, K.M., Guthrie, H.D., Welch, G.R., Mohler, J., Theisen, D.D., Siewerdt, F., Vinyard, B.T., and Woods, L.C., (2011): Quality Assessment of Wild Atlantic Sturgeon Semen under Conditions of Short-Term Storage. In: *North American Journal Aqualculture*, 73 (4), 418–425. p.

Dreanno, C., Suquet, M. Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y., and Billard, R., (1997): Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. In: *Theriogenology*, 48, 589–603. p.

Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Seguin, F., Dorange, F., and Billard, R., (1999a): Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. In: *Molecular Reproduction and Development*, 53 (2), 230-243. p.

Dreanno, C., Suquet, M., Fauvel, C., Le Coz, J.R., Dorange, G., Quemener, L., and Billard, R., (1999b): Effect of the aging process on the quality of seabass (*Dicentrarchus labrax*) semen. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 176-180. p.

Dreanno, C., Seguin, F., Cosson, J., Suquet, M., and Billard, R., (2000): H-1-NMR and P-31-NMR analysis of energy metabolism of quiescent and motile turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. In: *Journal of Experimental Zoology*, 286 (5), 513-522. p.

Dziewulska, K., and Domagała, J., (2013): Spermatozoa concentration influences cryopreservation success in sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.). In: *Theriogenology* 80, 659–664. p.

Dzyuba, B.B., Kopeika, F.F., Cherepanov, V.V., and Drokin, S.I., (1999): Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation. In: *Journal of Applied Ichthyology,* 15, 12. p.

Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., Gela, D., and Linhart, O., (2010): Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze-thawing in different fish species. In: *Journal of Applied Ichthyology,* 26, 720–725. p.

Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Shaliutina, A., Rodina, M., Yamaner, G., Gela, D., Dzyuba, V., and Linhart, O., (2012): Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping. In: *Aquaculture* 356–357, 272–278. p.

Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Bondarenko, O., Rodina, M., Gela, D., Bondarenko, V., Shaliutina, A., Linhart, O., (2013): Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. In: *Cryobiology* 66, 192–194. p.

Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Cosson, J., Dzyuba, V., Fedorov, P., Saito, T., Psenicka, M., Linhart, O., and Rodina, M., (2014): Motility and fertilization ability of sterlet *Acipenser ruthenus* testicular sperm after cryopreservation. In: *Cryobiology,* 69, 339–341. p.

Erdahl, W.A., Erdahl, A.D., and Graham, F.E., (1984): Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. In: *Aquaculture.* 43, 341-350. p.

Fauvel, C., Suquet, M., and Cosson, J., (2010): Evaluation of fish sperm quality. In: *Journal of Applied Ichthyology,* 26, 636–643. p.

Fürböck, S., Lahnsteiner, F., and Patzner, R. A., (2009): A fine structural review on the spermatozoa of Cyprinidae with attention to their phylogenetic implications. In: *Histology and histopathology,* 24, 1233–1244 p.

Glenn III, D.W., Lang, R.P., and Tiersch, T.R., (2011): Evaluation of extenders for refrigerated storage of koi carp and goldfish sperm. 107–124. p. In: Tiersch, T.R., and Green, C.C., (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species.* 2nd Edition. Baton Rouge, Luisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.

Glogowski, J., Kwasnik, M., Piros, B., Dabrowski, K., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski H. and Ciereszko, A., (2000): Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. In: *Aquaculture Research*, 31, 289-296. p.

Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horváth, Á., Urbányi, B., Sieczyński, P., Rzemieniecki, A., Domagała, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., and Ciereszko, A.. (2002): Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. In: *Aquaculture,* 211, 367–373. p.

Golshahi, K., Shabani, N., Aramli, M.S., and Noori, E., (2015): Motility and fertilizing ability of cryopreserved Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) sperm: Effect of post-thaw storage time and different sperm-to-egg ratios. In: *Cryobiology,* 71, 360–363. p.

Gosh, R.I., (1985): Energeticeskij Obmen Polovych Kletok i Embrionoy u Ryb. Kiev: Naukova Dumka: 147 p. (In Russian)

Grier, H.J., (1993): Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. 704-739. p. In: Russell, L.D., and Griswold, M.D., (Eds.): *The Sertoli cell*. Clearwater, Florida, USA: Cache River Press, 826. p.

Grier, H.J., and Taylor, G., (1998): Testicular maturation and regression in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Osteichthyes: Centropomidae). In: *Journal of Fish Biology,* 53 521-542. p.

Grier, H.J., and Neidig, C., (2011): Gonads and Gametes of Fishes. 19–32. p. In: Tiersch, T.R., and Green, C.C. (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2nd Edition. Baton Rouge, Luisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.

Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V., Tsvetkova, L.I., and Barmintsev, V.A., (2006): Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. In: *International Journal of Refrigeration*, 29, 379–386. p.

Grunina, A.S., Rekoubratsky, A.V., Tsvetkova, L.I., Barmintseva, A.E., Vasil'eva, E.D., Kovalev, K.V., and Poluektova, O.G., (2011): Dispermic androgenesis in sturgeons with the use of cryopreserved sperm: Production of androgenetic siberian sturgeon and androgenetic hybrids between Siberian and Russian sturgeons. In: *Russian Journal of Developmental Biology*, 42, 108–119. p.

Grzyb, K., Rychłowski, M., Biegniewska, A., and Skorkowski, E.F., (2003): Quantitative determination of creatine kinase release from herring *(Clupea harengus)* spermatozoa induced by tributyltin. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134, 207–213. p.

Haffray, P., Labbe, C., IMV Technologies, and Maisse, G., (2008): Fish sperm cryopreservation in France: from laboratory studies to application in selective breeding programs. In: *Cybium*, 32, 2. p.

Harka, Á., és Sallai, Z., (2004): Sügér-Perca fluviatilis (Linnaeus, 1758). 206-207. p. In: Magyarország halfaunája. Szarvas: Nimfea Természetvédelmi Egyesület. 269. p.

Horváth, A., Vásárhelyi, J., és Szenci O., (2006): A hímivarsejtek mozgása: Irodalmi összefoglaló: 2. rész. A mozgást vizsgáló módszerek fejlődése. In: *Magyar Állatorvosok Lapja*, 128, 437-442.p.

Horváth, Á., (2001): Halgaméták mélyhűtési módszereinek továbbfejlesztése. *Doktori értekezés*, Gödöllő.

Horváth, Á., Miskolczi, E., Urbányi, B. (2003): Cryopreservation of common carp sperm. In: *Aquatic Living Resources*, 16, 457–460. p.

Horváth, Á., Wayman, W.R., Urbányi, B., Ware, K.M., Dean, J.C., and Tiersch, T.R. (2005): The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. In: *Aquaculture*, 247, 243–251. p.

Horváth, Á., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Osz, K., Szabó, K., and Urbányi, B., (2007): Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. In: *Cryobiology*, 54, 251–257. p.

Horvath, Á., Wayman, W.R., Dean, J.C., Urbanyi, B., Tiersch, T.R., Mims, S.D., Johnson, D., and Jenkins, J.A., (2008): Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 443–449. p.

Horváth, Á., Jesenšek, D., Csorbai, B., Bokor, Z., Raboczki, É., Kaczkó, D., Bernáth, G., Hoitsy, G., Urbányi, B., Bajec, S.S., and Snoj, A., (2012): Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). In: *Aquaculture*, 358–359, 213–215. p.

Horváth, L., és Urbányi, B., (2000): Halak szaporodásbiológiája. 214-343. p. In: Horváth L. (szerk.). *Halbiológia és Haltenyésztés.* Második kiadás. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 440.p.

Horvàth, L., Tamàs, G., Seagrave, C., (1992): Carp and pond fish culture: including Chinese herbivorous species, pike, tench, zander, wels catfish and goldfish. London UK, Fishing news books. 158. p.

Hoyle, J.R., and Idler, R.D., (1968): Preliminary results in the fertilization of eggs with frozen sperm of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 25, 1295-1297. p.

Hu, E., Bosworth, B., Baxter, J., and Tiersch, T.R., (2014): On-site evaluation of commercial-scale hybrid catfish production using cryopreserved blue catfish sperm. In: *Aquaculture*, 426–427, 88–95. p.

Huang, X.-R., Zhuang, P., Zhang, L.-Z., Liu, J.-Y., Zhang, T., Feng, G.-P., and Zhao, F., (2014): Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) semen. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 30, 1585–1589. p.

Irawan, H., Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., (2010): The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. In: *Animal Reproduction Science*, 122, 236–243. p.

Jähnichen, H., Warnecke, D., Trolsch, E., Kohlmann, K., Bergler, H., and Pluta, H.J., (1999): Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 204–206. p.

Jamieson, B.G.M., (1991): Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. United Kingdom: Cambridge University Press, 319. p.

Judycka, S., Szczepkowski, M., Ciereszko, A., and Dietrich, G.J., (2015): New extender for cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) semen. In: *Cryobiology*, 70, 184–189. p.

Kaspar, V., Hulak, M., Kohlmann, K., Vandeputte, M., Rodina, M., Gela, D. and Linhart, O., (2008): In vitro study on sperm competition in common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: *Cybium*, 32 (2), 303-306. p.

Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., and Ollevier, F., (2001): Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 425–433. p.

Kiss, I., (2000): A halak testfelépítése és biológiája. 17-67. p. In: Horváth L. (szerk.). *Halbiológia és Haltenyésztés második kiadás*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 440. p.

Korzelecka-Orkisz, A., Bonislawska, M., Tanski, A., Smaruj, I., Szulc, J. and Formicki, K., (2013): Embryonic development of *Aspius aspius* L. (*Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae*). http://www.ejpau.media.pl/volume16/issue3/art-09.html In: *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. *Series Fisheries*, 16 (3). http://www.ejpau.media.pl/volume16/issue3/art-09.html. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: fish, egg, micropyle. Lekérdezés időpontja: 2015.08.23.

Kovács, É., Müller, T., Márián, T., Krasznai, Z., Urbányi, B., Horváth, Á., (2010): Quality of cryopreserved African catfish sperm following post-thaw storage. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 737–741. p.

Król, J., Glogowski, J., Demska-Zakes, K., and Hliwa, P., (2006): Quality of semen and histological analysis of testes in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. during a spawning period. In*: Czech Journal of Animal Science*, 51, 220-226. p.

Kruger, J.C. de W., Smit, G.L., Van Vuren, J.H.J., and Ferreira, J.T., (1984): Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). In: *Journal of Fish Biology*, 24, 263-272. p.

Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., and Iwahashi, M., (1984): Cryopreservation of carp sperm. In: *Aquaculture*, 37, 267–273. p.

Kutluyer, F., Öğretmen, F., and Inanan, B.E., (2015): Effects of semen extender supplemented with L-methionine and packaging methods (straws and pellets) on post-thaw goldfish (*Carassius auratus*) sperm quality and DNA damage. In: *Cryo Letters*, 36, 336–343. p.

Labbé, C., and Maisse, G., (2001): Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. In: *Aquaculture*, 201, 287-299. p.

Lahnsteiner, F., (2000): Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. In: *Aquaculture Research*, 31, 245–258. p.

Lahnsteiner, F., (2011a): Cryopreservation protocols for sperm of salmonid fishes. 409-420. p. In: Tiersch, T.R., and Green, C.C., (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species.* 2nd Edition. Baton Rouge, Luisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.

Lahnsteiner, F., (2011b): Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions. In: *Aquaculture*, 314, 221–224. p.

Lahnsteiner F., and Patzner R.A., (2008). Sperm morphology and ultrastructure in fish. 1-61 .p. In: Alavi S. M. H., Cosson J., Coward K. and Rafiee G. (Eds.): *Fish spermatology*. Oxford, United Kingdom: Alpha Science International Ltd., 465. p.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R.A., (1995a): Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. In: *Journal of Fish Biology*, 47, 492–508.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., and Patzner, R., (1995b): A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss, Salmo trutta fario, Salmo trutta lacustris, Coregonus sp*.). In: *Aquaculture Research*., 26, 801-807. p.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R., (1996a): Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. In: *The Progressive Fish-Culturist*, 58, 149-159. p.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weisman, T., and Patzner, R.A., (1996b): Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (*Cyprinidae*) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. In: *Fish Physiology and Biochemistry*, 15, 167-179. p.

Lahnsteiner, F., Patzner, R., and Weismann, T., (1996c): Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. In: *Aquaculture Research*, 27, 659–671. p.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., and Patzner, R., (1996d): Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus Thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho Hucho*). In: *Aquaculture*, 144, 265-274. p.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., Weismann, T., (2000): Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. In: *Theriogenology*, 54, 1477–1498. p.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., (2003): Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. In: *Theriogenology*, 60, 829–841. p.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., and Urbanyi, B., (2004): Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. In: *Aquaculture Research*, 35, 519–528. p.

Li, P., Hulak, M., Li, Z.H., Sulc, M., Psenicka, M., Rodina, M., Gela, D., and Linhart, O., (2013): Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm induces protein phosphorylation in tyrosine and threonine residues. In: *Theriogenology,* 80, 84–89. p.

Linhart, O., Rodina, M., and Cosson, J., (2000): Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. In: *Cryobiology*, 41, 241–250. p.

Linhart, O., Mims, S.D., Gomelsky, B., Cvetkova, L.I., Cosson, J., Rodina, M., Horvath, A., and Urbanyi, B., (2006): Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 389–394.

Linhart, O., Alavi, S.M.H., Psenicka, M., Rodina, M., Kaspar, V., Li, P., Hulak, M., Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Gela, D., Flajshans, M., Peknicova, J., Cosson, J. and Ciereszko, A., (2011): Spermatozoa of Chondrostean Fish Species: Structure, Motility and Fertilzing Ability. In: *Indian Journal of Science and Technology,* 4 (S8), 133-134. p.

Liu, L., Wei, Q., Guo, F., Zhang, J., and Zhang, T., (2006): Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 384–388. p.

Liu, P., Zhuang, P., Zhang, L., Wang, B., and Yan, W., (2007): Study on cryopreservation of spermatozoa in cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baerii baerii*). In: *Marine Fisheries*, 29 (2), 120–127.

Lujić, J., Bernáth, G., Marinović, Z., Radojković, N., Simić, V., Ćirković, M., Urbányi, B., and Horváth, Á., (2015): Fertilizing capacity and motility of tench *Tinca tinca* (L., 1758) sperm following cryopreservation. In: *Aquaculture Research*, available online: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.12865/abstract. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Lujic, tench. Lekérdezés időpontja: 2016.04.06.

Magyary, I., Urbányi, B., and Horváth, L., (1996): Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. In: *Journal of Applied Ichthyology,* 12, 117–119. p.

Martínez-Pastor, F., and Adams L.S., (2009): Cryobiological material and handling procedures. 295-319.p. In: Cabrita, E., Robles, V., and Herráez, P., (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species.* Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis Group. 549. p.

Mazur, P., 1977. Slow-freezing injury in mammalian cells. In: *The Freezing of Mammalian Embryos*. Ciba Foundation Symposium London, England. 52. 19-48. p.

Miskolczi, E., Mihálffy, S., Várkonyi, E.P., Urbányi, B., and Horváth, Á., (2005): Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. In: *Aquaculture*, 247, 119–125. p.

Moczarski, M., (1977): Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. In: *Bulletin of the Polish Academy* of *Sciensis: Biological Sciensis,* 25 (3), 187-90. p.

Moore, A.A., (1987): Short-Term Storage and Cryopreservation of Walleye Semen. In: *The Progressive Fish-Culturist* 49, 40–43. p.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., and Yasuda, K., (1983). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. In: *Journal of Experimental Biology,* 107, 95–103. p.

Nagler, J.J.; Parsons, J.E., and Cloud, J.G., (2000): Single pair mating indicates maternal effects on embryo survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: *Aquaculture*, 184 (1-2), 177-183. p.

Nathanailides, C., Chanzaropoulos, T., Barbouti, A., Perdikaris, C., and Zhang, T., (2011): DNA fragmentation, linear velocity and fertilizing ability of reactivated cryopreserved goldfish sperm using different cryoprotectants. In: *Biotechnology*, 10 (6), 514-520. p.

Nynca, J., Dietrich, G.J., Dobosz, S., Grudniewska, J., and Ciereszko, A., (2014): Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen. In: *Aquaculture*, 433, 62–65. p.

Nynca, J., Dietrich, G.J., Dobosz, S., Zalewski, T., and Ciereszko, A., (2015a): Effect of postthaw storage time and sperm-to-egg ratio on fertility of cryopreserved brook trout sperm. In: *Theriogenology*, 83, 253–256. p.

Nynca, J., Dietrich, G.J., Grudniewska, J., Dobosz, S., Liszewska, E., Krzyś, M., Różyński, R., and Ciereszko, A., (2015b): Efficient method for cryopreservation of European huchen (*Hucho hucho* L.) and grayling (*Thymallus thymallus* L.) semen. In: *Aquaculture*, 435, 146–151. p.

Ott, G.A., and Horton, F.H., (1971): Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryo-preserved sperm. In: *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 28, 1915-1918. p.

Öğretmen, F., İnanan, B.E., and Öztürk, M., (2014): Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. In: *Cryobiology*, 68, 107–112. p.

Peñaranda, D.S., Perez, L., Fakriadis, G., Mylonas, C.C., and Asturiano, J.F., (2008): Effects of extenders and cryoprotectant combinations on motility and morphometry of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 24 (4), 450-455. p.

Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F., and Billard, R., 1995: Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. In: *Journal of Cell Science*, 108, 747-753. p.

Piironen, J., (1993): Thawing and insemination. 11-13. p. In: *Cryopreservation of fish eggs and sperm*. Copenhagen, Denmark: Nordic Council of Ministers. 589. 28. p.

Pintér, K., (1992): *Magyarország Halai*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 202.p.

Psenicka, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Cicova, Z., Gela, D., Cosson, J., Nebesarova, J., and Linhart, O., (2008): Morphology, chemical contents and physiology of chondrostean fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). In: *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 371–377. p.

Purchase, C.F., and Earle, P.T., (2012): Modifications to the imagej computer assisted sperm analysis plugin greatly improve efficiency and fundamentally alter the scope of attainable data. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 1013–1016. p.

Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Alavi, S.M.H., Hulak, M., and Linhart, O., (2007): Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. In: *Theriogenology*, 67, 931–940. p.

Rodina, M., Policar, T., Linhart, O., and Rougeot, C., (2008): Sperm motility and fertilizing ability of frozen spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*). In: *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 438–442. p.

Rougeot, C., Nicayenzi, F., Mandiki, S.N.M., Rurangwa, E., Kestemont, P., and Mélard, C. (2004). Comparative study of the reproductive characteristics of XY male and hormonally sex-reversed XX male Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. In: *Theriogenology* 62, 790–800. p.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., and Nash, J.P., (2004): The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. In: *Aquaculture*, 234 (1-4), 1-28. p.

Saad, A., Billard, R., Theron, M.C., and Hollebecq, M.G., (1988): Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. In: *Aquaculture*, 71, 133–150. p.

Saillant, E., Chatain, B., Fostier, A., Przybyla, C., and Fauvel, C., (2001): Parental influence on early development in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: *Journal of Fish Biology*, 58 (6), 1585-1600. p.

Sarder, M.R.I., Sarker, M.F.M., and Saha, S.K., (2012): Cryopreservation of sperm of an indigenous endangered fish species *Nandus nandus* (Hamilton, 1822) for ex-situ conservation. In: *Cryobiology*, 65, 202–209.

Sarosiek, B., Ciereszko, A., Rzemieniecki, A., Domagala, J., and Glogowski, J. (2004): The influence of semen cryopreservation on the release of some enzymes from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. In: *Archiwum Rybactwa Polskiego*, 12, 13–21. p.

Sarosiek, B., Cejko, B.I., Kucharczyk, D., Żarski, D., Judycka, S., and Kowalski, R.K., (2013): Short-term storage of perch (*Perca fluviatilis* L.) milt under cooling conditions. In: *Reproductive Biology*, 13, 39. p.

Sarosiek, B., Dryl, K., Krejszeff, S., and Żarski, D., (2016): Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) milt collected with a syringe and a catheter. In: *Aquaculture* 450, 14–16. p.

Sarvi, K., Niksirat, H., Mojazi Amiri, B., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G.R., and Bakhtiyari, M., (2006): Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). In: *Aquaculture*, 256, 564–569. p.

Satterfield Jr., J.R., and Flickinger, S.A., (1995): Field Collection and Short-Term Storage of Walleye Semen. In: *The Progressive Fish-Culturist*, 57, 182–187. p.

Saudrais C., Fierville F., Cibert C., Loir M., Le Rumeur E., and Cosson, J., (1998): The use of creatine-phosphate plus ADP as energy source for motility of membrane deprived trout spermatozoa. In: *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 41, 91-106. p.

Schmidt-Baulain, R., and Holtz, W., (1989): Deep-freezing of rainbow trout *Salmo gairdneri* sperma at varying intervals after collection. In: *Theriogenology*, 32, 439-443. p.

Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C., and Tiersch, T.R., (2000): Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of nile tilapia. In: *Theriogenology*, 53, 1489–1499. p.

Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, I., Linhartova, P., and Linhart, O., (2013): Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (Acipenser *gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. In: *Animal Reproduction Science*, 139, 127–135. p.

Shaluei, F., Imanpoor, M.R., Shabani, A., and Nasr–Esfahani, M.H., (2013): Effect of different concentrations of permeable and non–permeable cryoprotectants on the hatching rate of goldfish (*Carassius auratus*) embryos. In: *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2, 185–188. p.

Sohár P. (2004): Az NMR-sztori. In: *Magyar Kémiai Folyóirat – Kémiai Közlemények*, 109-110, 120-126. p.

Stein, H., and Bayrle, H., (1978): Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. In: *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 18, 1073-1076. p.

Stoss, J., (1983): Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. 9. 305-350. p. In: Hoar, W., S., Randell, D.J., and Donaldson, E.M., (Eds.): *Fish Physiology*. New York, New York, USA: Academic Press. 477. p.

Stoss, J., and Holtz, W., (1981a): Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. In: *Aquaculture*, 22, 97–104. p.

Stoss, J., and Holtz, W., (1981b): Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the dilulent. In: *Aquaculture*, 25, 217. p.

Stoss, J., and Holtz, W., (1983): Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. In: *Aquaculture*, 32, 321–330. p.

Szabó, G., Müller, T., Bercsényi, M., Urbányi, B., Kucska, I.B., and Horváth, A., (2005): Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. Short communication. In: *Acta Biologica Hungarica*, 56, 173–175. p.

Szabó, T., Horváth, L., és Urbányi, B., (2000): Halak szaporodásbiológiája. 168-205. p. In: Horváth L. (szerk.). *Halbiológia és Haltenyésztés*. Második kiadás. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 440.p.

Taghizadeh, V., Imanpoor, M.R., Sadeghi, A., and Shaluei, F. (2013): The Effect of Extenders and Different Concentrations of Dimethyl Sulphoxide on Goldfish (*Carassius auratus gibelio*) Sperm. In: *World Journal of Fish and Marine Sciencies*, 5 (5), 514-518. p.

Thirumala, S., Campbell, W.T., Vicknair, M.R., Tiersch, T.R., and Devireddy, R.V., (2006): Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. In: *Theriogenology*, 66, 964–973. p.

Tiersch, T.R., (2008): Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. In: *Revista Brasileira de Zootecnia* 37, 15–19.

Tiersch, T.R., (2011): Process pathways for cryopreservation research, application and commercialization. 646-671. p. In: Tiersch T. R. and Green C. C. (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2nd Edition. Baton Rouge, Luisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.

Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O., and Billard, R., (1996): Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A-ruthenus*. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 12, 107–112. p.

Urbányi, B., Horváth, Á., and Kovács, B. (2004): Successful Hybridization of *Acipenser* Species Using Cryopreserved Sperm. In: *Aquaculture International* 12, 47–56. p.

Urbanyi, B., Szabo, T., Miskolczi, E., Mihalffy, S., Vranovics, K., and Horvath, A. (2006): Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 201–204. p.

Van Look, K.J.W., Kime, D.E., (2003): Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. In: *Journal of Fish Biology*, 63, 1020-1033. p.

Velasco-Santamaría, Y.M., Medina-Robles, V.M., and Cruz-Casallas, P.E., (2006): Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. In: *Aquaculture*, 256, 264–271. p.

Viveiros, A.T.M., So, N., and Komen, J., (2000): Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. In: *Theriogenology* 54, 1395–1408. p.

Wang, J., Shan, R., Zhang, X., Tian, H., Wang, W., and Ru, S., (2015): Development of a lipovitellin-based sandwich ELISA for quantification of vitellogenin in surface mucus and plasma of goldfish (*Carassius auratus*). In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 80–87. p.

Warnecke, D., and Pluta, H.-J., (2003): Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. In: *Aquaculture*, 215, 167–185. p.

Wayman, W.R., Looney, G.L., Holm, R.J., and Tiersch, T.R., (2008): Cryopreservation of sperm from endangered pallid sturgeon. In: *North American Journal of Fisheries Management*, 28, 740–744. p.

Wheeler, A.P., and Thorgaard, H.G, (1991): Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. In: *Aquaculture*, 93, 95-100. p.

Whittingham, D.G., (1980): Principles of embryo preservation. 65-83 p. In: Ashwood-Smith M. J. and Farrant J. (Eds.): *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. Tunbridge Wells, Kent, England: Pitman Medical Ltd., 323. p.

WHO (2010a): Semen analysis. 7-141. p. In: *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.* World Health Organization. Switzerland.

WHO (2010b): Sperm numbers. 32-36. p. In: *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. World Health Organization. Switzerland.

Wilson-Leedy, J.G., and Ingermann, R.L., (2007): Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. In: *Theriogenology*, 67 (3), 661-672. p.

Woynarovich, E., and Woynarovich, A., (1980): Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. In: *Aquacultura Hungarica*, 2, 19–21. p.

Yamaner, G., Memis, D., and Baran, A. (2015): Sperm quality and effects of different cryomedia on spermatozoa motility in first-time spawning of cultured Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833). In: *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 71–74. p.

Yang, H., Carmichael, C., Varga, Z.M., and Tiersch, T.R., (2007): Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. In: *Theriogenology*, 68, 128–136. p.

Żarski, D., Horváth, Á., Kotrik, L., Targońska, K., Palińska, K., Krejszeff, S., Bokor, Z., Urbányi, B., and Kucharczyk, D., (2012a): Effect of different activating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., eggs. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 967–972. p.

Żarski, D., Krejszeff, S., Horváth, Á., Bokor, Z., Palińska, K., Szentes, K., Łuczyńska, J., Targońska, K., Kupren, K., and Urbányi, B., (2012b): Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. In: *Aquaculture*, 364–365, 103–110. p.

3th International Workshop on the Biology of Fish Gametes (2011). Gödöllő, Hungary, September 7-9.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A három éves doktori munkám során rengeteg ember segítette vizsgálataimat szakmai fejlődésemet, sikeres tanulmányaimat, akiknek ezúton szeretném legnagyobb hálámat kifejezni. Akadnak azonban olyan személyek, szervezetek, cégek, akik kiemelten segíették utamat, ezért őket személyesen is meg kívánom említeni.
A legnagyobb köszönettel tartozom elsősorban szakmai vezetőmnek és tanítómnak, **Dr. Horváth Ákosnak**, aki bizalmat szavazva, energiát és időt nem sajnálva egyengette utamat. Közel 5 éve tartó együttműködésünk alatt, átadta nekem azt a tudást a halsperma mélyhűtés terén, amely mögött több mint 15 év tapasztalat és tudományos siker áll. Elmondhatom, hogy személyében a világ egyik elismert szakembere irányította doktori kutatásaimat. Minden körülmények között bátran fordulhattam hozzá tanácsért. A kísérletek vele, kimerítették a hatékony csapatmunka fogalmát.
Nem győzöm hálámat kifejezni **Dr. Urbányi Bélának**, a Halgazdálkodási Tanszék vezetőjének. Öt ével ezelőtt egy remek vezetőt ismerhettem meg személyében, aki soha nem tagadta meg a segítséget tőlem. Rengeteg munkája mellett mindig szakított időt szakmai fejlődésem elősegítésére. Anyagiakat és energiát, nem sajnálva járult hozzá szakmai képzésemehez. Lehetővé tette, hogy számos európai továbbképzésen és konferencián való részvétellel gyarapíthassam tudásom, valamint együttműködésekre és tudományos kapcsolatokra tehessek szert.
Szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Horváth László** professzor úrnak, a Tanszék alapítójának, aki nagyban hozzájárult a tógazdasági alapismeretekben való hiányos jártasságom kibővítésében. A beszélgetéseink minden perce új megszerzett tudást, vagy tapasztalatot jelentett.
Külön szeretnék köszönetet mondani a **Dr. Daniel Żarski**-nak, aki nélkül csupán csak a kísérletek töredéke valósulhatott volna meg. Tudományszeretete és szakmai nyitottsága, isnpirálták munkámat. Sokat köszönhetek **Dr. Bokor Zoltánnak**, aki kapcsolataival, és szakmai tudásával nagyban hozzájárult a munkám megszervezéséhez, a tenyészállományok beszerzéséhez. A mélyhűtés során aktívan részt vállalt a kísérletek kivitelezésében. Hálával tartozom **Várkonyi Leventének**, aki a kísérleteim során a halak életben tartásában oroszlánrészt vállalt. A rendszerek építéséről, karbantartásáról, valamint a halak gondozásáról számos információval látott el. Mindhármuk személyében egy jó kollégát és barátot ismerhettem meg.

Több szakember, cég és szervezet segítette munkámat (hal, ivarsejt, keltetőkapacitás stb.), akiknek ezért nem győzök elég hálás lenni:

Hoitsy György, Hoitsy és Rieger Kft.
Dušan Jesenšek, Tolmini Horgász Egyesület, Szlovénia
Ittzés István, a Tanszék kollégája és egyéni vállalkozó
Szabó Zoltán, egyéni vállalkozó
Ifj. Radóczi János, Szabolcsi Halászati Kft.
Deli Zsolt
Kovásznai Szász Béla, Aranyponty Zrt.
Béke Horgász Egyesület, Gödöllő

Köszönettel tartozom a következő pályázatoknak, melyek keretein belül kísérleteimet végeztem:

COST Action FA1205 AQUAGAMETE
EUREKA_HU_12-1-2012-0056
GOP-1.1.1-11.2012-0306
Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence-9878/2015/FEKUT
TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-011

Hálámat szeretném kifejezni a Warmia és Mazúria Egyetem kollégáinak, **Dr. Katarzyna Palińska-Żarska-nak**, **Dr. Sławomir Krejszeff-nek** és Jarosław Król-nak, akik szívélyesen álltak rendelkezésemre Lengyelországban a sügér és aranyhal kutatómunkám során. Tudásukkal és közreműködésükkel számos kísérlet valósult meg. Az általuk biztosított eszközök és infrastruktúra nagyban hozzájárultak vizsgálataim sikeréhez.
Köszönettel tartozom a **Halgazdálkodási Tanszék teljes kollektívájának**. A kollégáim segítsége nélkül nem tudtam volna megvalósítani doktori munkámat. Szakmai segítséggel, szellemi támogatással és adminisztratív intézkedéssekkel egyaránt megkönnyítették a mindennapjaimat. Külön köszönöm négy kolléganőmnek, **Kása Eszternek, Szentes Katalin Ágnesnek, Kollár Tímeának,** és **Ősz Ágnesnek** hogy fáradságos munkájukkal aktívan részt vettek a kísérletek megvalósításában, az eredmények meghatározásába. Köszönettel tartozom, a három év alatt szakmai vezetésem alatt dolgozó hallgatóknak, **Kajtár Alexandrának, Schmidt Dorottyának, Kollár Tímeának, Kaczkó Dánielnek, Koncsek Ádámnak,** és **Szabó Tamásnak**, hogy türelemmel áltak szakvezetői tapasztalatlanságomhoz. Hálás vagyok munkájukért, szorgalmukért.
Végül hálámat szeretném kifejezni **Családomnak**. Az embert próbáló pillanatokban támaszt nyújtottak és erőt adtak nekem. Gyakran lelkesítettek a sokszor hosszú, és fárasztó kutatómunka során. Mindvégig teljes támogatásukról tettek tanúbizonyságot. Dolgozatom odaadásuk nélkül nem jöhetett volna létre.