

Európában őshonos pisztrángfélék spermájának mélyhűtése és a mélyhűtött sperma felhasználása fajmegőrzési célokra

Szerzők:

Bernáth Gergely

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Biológus mesterszak

Kaczkó Dániel

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Allattenyésztő mérnök alapszak

Témavezetők:

Dr. Horváth Ákos és Kotrik László

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Gödöllő

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5
1.1 Célkitűzés	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 A vizsgált halfajok bemutatása	7
2.1.1 A sebes pisztráng (<i>Salmo trutta m. fario</i>)	7
2.1.2 A márványpisztráng (<i>Salmo marmoratus</i>)	9
2.1.3 A pénzes pér (<i>Thymallus thymallus</i>)	11
2.2 A halsperma mélyhűtése	13
2.2.1 A mélyhűtés fizikai-biológiai alapjai	13
2.2.2 A spermamélyhűtés folyamata	14
2.2.3 Lazacfélék (Salmonidae) spermamélyhűtésének eredményei	16
3. Anyag és módszer	19
3.1 A vizsgálatok átfogó célja	19
3.2 Vizsgálatok sebes pisztráng fajban	19
3.2.1 A sperma és ikra mintavétele	19
3.2.2 A sperma motilitásvizsgálata	19
3.2.3 A mélyhűtés folyamata	20
3.2.4 Felolvasztás és termékenyítés	21
3.2.5 Termékenyülési eredmények elemzése	21
3.3 Vizsgálatok márványpisztráng fajban	21
3.3.1 A sperma és ikra mintavétele	21
3.3.2 A sperma motilitásvizsgálata	21
3.3.3 A mélyhűtés folyamata	22
3.3.4 Felolvasztás és termékenyítés	22
3.3.5 Termékenyülési eredmények elemzése	23
3.4 Vizsgálatok pénzes pér fajban	23
3.4.1 A sperma és ikra mintavétele	23
3.4.2 A mélyhűtés folyamata	23
3.4.3 Felolvasztás és termékenyítés a mélyhűtött spermával	24
3.4.4 A termékenyülési eredmények értékelése	24
4. Eredmények	25

4.1	A sebes pisztráng fajban kapott eredmények	25
4.1.1	A sperma és ikra mintavétele, motilitásvizsgálat	25
4.1.2	Az egyensúly és a mélyhűtés utáni termékenyülés vizsgálata	26
4.2	A márványpisztráng fajban kapott eredmények	27
4.2.1	A sperma és ikra mintavétele, motilitásvizsgálat	27
4.2.2	Az egyedi hatás és a mélyhűtés utáni termékenyülés vizsgálata	27
4.3	A pénzes pér fajban kapott eredmények	28
4.3.1	A kísérleti munka eredményei	28
4.3.2	A keltetőházi alkalmazás eredményei	28
5.	Értékelés és következtetések	31
6.	Összefoglalás	35
7.	Köszönetnyilvánítás	37
8.	Irodalomjegyzék	39

1. fejezet

Bevezetés

Az állatvilág evolúciós törzsfáját tekintve elmondhatjuk, hogy a gerincesek altörzsén belül a porcos és csontos halak osztályai a legnépesebb csoportok. Közel 25 000 fajt foglalnak magukba, ám ez a szám évről évre közel 100 újonnan felfedezett taxonnal bővül. A halak kozmopolita élőlények, és szinte minden vizes élőhelyen előfordulnak. A magas fajszaám, és a széleskörű elterjedés ellenére a legkevésbé ismert osztályok a gerinceseken belül. A porcos, valamint csontos halak külső megjelenése, fejlődésmódja, valamint ökoszisztémában betöltött szerepe nagy változatosságot mutat.

Napjainkban egyre nagyobb teret hódít világszerte környezetünk és az élőlények megóvása. Bár a folyamat nem ma kezdődött, a halaknak még napjainkban is csak csekély figyelmet szentelnek a konzervációs munka során. A mérsékelt érdeklődés valószínűleg annak köszönhető, hogy ellentétben más taxonokkal, ezeket az állatokat nehéz a természetes környezetükben megfigyelni. A halak nagyszámú utódot hoznak létre, aminek köszönhetően egy fajnak számos egy mástól elszigetelt, egyedi populációja élhet a különböző vízrendszerekben. A nagy egyedszám ellenére, mint a legtöbb gerinces taxon, ez a csoport is érzékeny a környezetéből érkező hatásokra. A természeti katasztrófák, betegségek sokszor számos egyed elhullását okozzák. Az emberi hatás az egyik legjelentősebb a zavaró tényezők közül. Az évezredek alatt - a városok megjelenésének és növekedésének köszönhetően - nőtt a vizek szennyezettsége. Jelentős élőhelypusztulást okoztak az ipari létesítmények is. A mezőgazdaság fejlődésének köszönhetően számos vízzel borított terület tűnt el. Az emberi tevékenység vizsgálatakor nem szabad megfeledkeznünk a halászatról, valamint a horgászatról sem. Az utóbbi világméretű kedvteléssé és szabadidős elfoglaltsággá nőtte ki magát az évszázadok során. A horgászok kiszolgálása érdekében szükségessé vált a természetes vizek ember által irányított kezelése és halakkal történő betelepítése. Gyakori jelenséggé vált tájidegen, invazív taxonok megjelenése egy adott természetes élőhelyen, melyek összeívnak az őshonos fajokkal. A hibridizáció az adott vízrendszerben endemikus halak tömeges eltűnéséhez vezethet. A folyamat megállításához génbankok felállítására van szükség. Egy örökítő anyagokból álló tartalék alapjául szolgálhat a fontos konzervációbiológiai munkákhoz, valamint a veszélyeztetett fajok megmentéséhez (Maitland, 1995).

1.1. Célkitűzés

Kutatásunk legfőbb célja az volt, hogy 3 veszélyeztetett, Európában őshonos taxon – a sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*), a márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) és az adriai pér (*Thymallus thymallus*) – spermamélyhűtését tökéletesítsük. A vizsgálat során arra kerestük a választ, hogy az egyensúlyi idő, a különböző hűtőmediumok, és a hűtésnél használt műszalmák mérete miként befolyásolja a mélyhűtési folyamatot. A legideálisabb protokoll megtalálásával hosszú ideig tartósítható a sperma, amely a felolvasztás után eredményesen és nagy arányban termékenyít. A sebes pisztráng hazánkban mindösszesen csak néhány szabadon élő populációval rendelkezik. E halfajra vonatkozó vizsgálatainkat a garadnai pisztrángtelep állományának egyedein végeztük. A márvány pisztráng és az adriai pér Szlovéniában endemikus taxonok. E két csoportra vonatkozó kutatásunkat az országban található Tolmin városában működő pisztrángtelepen, valamint a Soča és a Tolminka folyókon végeztük. A márványpisztrágon, és az adriai péren végzett kísérleteink egy kormányközi kutatómunka szerves részét képezték. A Ljubljana-i Egyetem, a Szlovéniában található Tolmini Horgász Egyesület, és a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Karának Halgazdálkodási Tanszéke összefogva próbálja megmenteni a két veszélyeztetett csoportot. Elvégzett vizsgálataink konzerváció-biológiai jelentőséggel bírhatnak, hiszen a spermiumok mélyhűtésével, és tudatos tenyésztéssel sikeres lehet mind a három taxon természetes populációinak megmentése.

2. fejezet

Irodalmi áttekintés

2.1. A vizsgált halfajok bemutatása

2.1.1. A sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*)

A sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*, 2.1. ábra) teste rendkívül áramvonalas, megnyúlt, oldalról enyhén lapított (Pintér, 2002). Az alsó állkapocs a tejeseknél ívási időszakban kampószerűen meghajlik melynek a végén kis sejtburjánzást figyelhetünk meg. Az ikrások ezzel ellentétben nem viselnek kampót, az alsó állkapocs lekerekített (Hoitsy, 2002).



2.1. ábra. Sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*). Fénykép: Kaczkó Dániel.

Feje aránylag nagy, a szája csúcsba nyíló, az orra tompa, az alsó és felső állkapcson erős ragadozó fogak ülnek (Hoitsy, 2002). Fontos határozó bélyeg a pisztrángfélénél a vomer fogazottsága és alakja. A sebes pisztrágnál a vomer oldalról tekintve enyhén görbült a lemezén 4(2-6), a nyelvén 9-18 fog található, melyek legtöbbször kettős sorban helyezkednek el (Hoitsy,

2002). A pikkelyek aprók, vékonyak, rendkívül hajlékonyak, a hal bőrében erősen ülnek (Pintér, 2002).

A szaporodási időszakban a bőr megduzzad és a kis pikkelytartó tokok majdnem körbefogják a pikkelyt. Teljes az oldalvonala, 112-132 pikkellyel. Az oldalvonal alatt 19-22, míg fölötte 19-26 pikkely található. A halak kaméleonjának is tekinthetjük a sebes pisztrángot, nem véletlen, hogy Hermann Ottó „A magyar halászat könyvében” egy egész oldalt szentel a pisztráng színezetének: „Minden valamire való halász tudja, hogy két teljesen egyforma pisztrángot ugyanazon helyéről sohasem dobott ki” (Hermann, 1887 cit. Hoitsy, 2002). A színt adó pigmentsejtek (melanofórák, xantofórák) összehúzódnásra és megnagyobbodásra képesek, így képesek a halak növelni vagy csökkenteni a színek tónusát. Ez a változás szemmel is követhető. A vak pisztrángok feketére váltják színüket, mert sötétet érzékelnek.

Az alapszínéről a következőt mondhatjuk: a hát leggyakrabban zöldesbarna, a has sárgásbarna, az oldala arany csillogású. Az egész testét szabálytalan vagy kerek pöttyök borítják, kivételt képez ez alól a farokúszó. A háti részen a pettyek feketék míg az oldalon vörösek. A piros és fekete pettyeket fehér gyűrű veszi körül. A zsírósóján egy vagy több piros pöttyöt figyelhetünk meg. A Lillafüredi Pisztrángtelepen található a sebes pisztrágnak egy olyan törzse melynek a testén csak nagy fekete pöttyök vannak. Előfordulnak tenyészetekben, de néha a természetben is teljesen ezüst színű példányok: ezek mind meddők. Ezek az egyedek nem rendelkeznek herével vagy petefészkekkel. Az ívási időszakban a színük rendkívül élénk, sokkal csillogóbb. A fiatal példányoknál csak 3-10 hónapos korban jelennek meg a fekete és piros foltok (Hoitsy, 2002). Vásárhelyi 1940-ben leírt a Bükk hegység Várvölgyi patakjából egy *Salmo trutta m. ungeri* színváltozatot, melynél a vörös szeplők vannak túlsúlyban (Pintér, 2002). A hasúszók és a mellúszók hosszúkásak, az úszói fejlettek. A farokúszó kimetszett, az idős példányokon majdnem egyenes. A hát és a farokúszó közt figyelhetjük meg a zsírúszót.

A sebes pisztráng a vízfolyások felső szakaszán él, melynek egyben névadó faja is. A pisztráng szinttáját kettéoszthatjuk alsó és felső szinttájra. Ezek a vizek kevés szerves anyagot termelnek és hordoznak magukban, az oxigéntartalmuk magas: 7-12 mg/l, hőmérsékletük a nyári melegben sem emelkedik 15-18 °C fölé. A sebes pisztráng számára csak a búvóhelyekben gazdag vízterület biztosít kielégítő élőhelyet mivel félnék és fényt kerülő (negatív fototaxisú) faj. Előszeretettel keresi fel az alámosott partoldalakat, bedőlt fákat vagy összetorlódott uszadékokat. Az idősebb példányok magányosan, búvóhelyükhöz ragaszkodva, míg a fiatal példányok néhány fős csoportokban élnek. Táplálkozását sok tényező befolyásolja. Ritkán tér át ragadozásra, elsődleges táplálékát kisebb rákok (*Gammarus spp*, *Asellus spp*), kérészek (Ephemeroptera), tegzeseket (Trichoptera) és álkérészek (Plecoptera) adják. Idősebb példányok gyomraiban találtak már vizirigó fiókát (*Cinclus cinclus*) és erdei békát (*Rana dalmatina*) is.

Vásárhelyi 1963-ban megjelent írása szerint az ívás szeptembertől februárig, Berinkey 1966-os cikke szerint novembertől márciusig tart (cit. Hoitsy, 2002). Hoitsy megfigyelései a bükki patakokban az október végi – november eleji ívást igazolják, valamint néha megfigyelt januárban ívó példányokat is (Hoitsy, 2002).

A sebes pisztráng a *Salmo trutta* faj édesvízi életmódra áttért formája. További két formát ismerünk: a tavi pisztrángot (*Salmo trutta m. lacustris*) és az anadrom tengeri pisztrángot (*Salmo trutta m. trutta*). Elterjedt egész Európában, Afrika északi részén, valamint Északnyugat-Ázsiában. Betelepítéseknek köszönhetően Új-Zéland, India, Japán, Ausztrália, valamint Észak- és Dél-Amerika vizeiben is előfordul. Hazai elterjedése korlátozódik a hideg, tiszta vízű pata-

kokra, valamint egy-egy hegyvidéki tóra. A Bükk hegységben megtalálható a Garadna-, Szinva-, Bán-, Csermely- és Szilvási-pataokban, valamint a Hámori-tóban. A Zemplénben a Kemenec-, Bózsza-, Cserenkő-, Tolcsva-patakokban fordul elő. Az Aggteleki-karszton a Jósza- és a Kecő-pataokban, valamint a Tengerszem-tóban figyelhetünk meg nagyobb populációt, illetve a Börzsöny és a Mátra patakjaiban is él egy-egy kisebb izolált populáció. A Dunántúlon a Pinka-, Répce-, Apátkúti-, valamint a Gyöngyös-pataokban találkozhatunk ezzel a fajjal (Hoitsy, 2002; Pintér, 2002).

Európai tekintetben öt genetikailag élesen elkülöníthető vonala létezik. A fajban végzett eddigi legátfogóbb felmérés során 1794 pisztrángtól vettek mintát, amely összesen 174 különálló populációból származott. A mitokondriális DNS (mtDNS) mintákat molekuláris biológiai módszerek (PCR) segítségével sokszorozták fel, majd a PCR-RFLP termékeket szekvenálással elemezték. A vizsgálatok során filogenetikailag 5 nagy csoportba sorolták a gyűjtött mintákat, gyűjtési helyük elterjedése alapján: atlanti, dunai, mediterrán, márvány és adriai. Az öt nagy csoport közötti, és csoporton belüli genetikai diverzitás különbségek meghatározásához a haplotípusok diverzitás vizsgálatát, és a maximális előfordulási valószínűség becslés módszerét alkalmazták. Az eredmények azt mutatták, hogy igen nagy volt a különbség a csoportok genetikai változatossága között. A legszembetűnőbb genetikai diverzitást a dunai és adriai csoportokban mérték (Bernatchez, 2000).

A sebes pisztráng domesztikált populációi ugyanakkor szinte kizárólag az atlanti csoport vagy vonal egyedeitől származnak szerte Európában. Mivel a fajt elsősorban természetes vizek horgász célú telepítésére tenyésztik, a telepítések nyomán introgresszív hibridizáció lép fel a telepített és őshonos állományok között, ami végső soron az egyedek gyengébb alkalmazkodóképességében nyilvánul meg. Több ilyen jellegű problémát jegyeztek fel Közép-Európa vizeiben, elsősorban Szlovéniában (Jug et al., 2005, Marić et al. 2010), ahol az őshonos dunai vonalhoz tartozó állományokkal képeztek hibrideket a telepített atlanti egyedek.

2.1.2. A márványpisztráng (*Salmo marmoratus*)

A márványpisztráng (2.2. ábra) a gerincesek altörzsén (Vertebrata) belül található csontos halak (Osteichthyes) osztályába tartozik. Számos rokonával együtt alkotja a lazacfélék (Salmonidae) családját. Testük hossza elérheti akár a 120 cm-t, tömegük megközelítőleg 50 kg is lehet. A kifejlett egyedek természetes környezetükben akár a 10 éves kort is elérhetik (Kottelat et al., 2007). Anadrom faj, mely a friss, gyorsfolyású folyókat kedveli (Riede, 2004). Fő élőhelyei a homokos és kavicsos mederrel rendelkező alpesi folyók és tavak (Bianco, 1995). Az ideális víz hőmérséklet létfontosságú a márványpisztráng számára, hiszen csak a 2-15 °C-os vízben érzi otthonosan magát (Povž, 1995). Testét sötét, valamint olajzöld pikkelyek borítják. Nevét a testét borító egyenetlen, sárgás-barnás vonalak után kapta. Az egyes populációk egyedei kisebb-nagyobb mértékben különbözhetnek. Az egymástól elszigetelten élő populációk egyedei között kialakult fenotipikus eltéréseket a kopoltyúfedőn található barna foltok megléte, illetve hiánya, valamint az oldalvonal közelében található piros pontok elhelyezkedése adják (Kottelat et al., 2007). A márványpisztráng külső megtermékenyítésű faj, ívási időszaka december elejétől január végéig tart. Az ivadékok az aljzat közelében fejlődnek, fő táplálékuk vízi gerinctelenek. Az ivarérett, kifejlett példányok kisebb halakkal táplálkoznak (Kottelat et al., 2007). A faj szerepel az Európai Parlament és Tanács úgynevezett Élőhely Irányelvében és a Natura

2000-es listán. A Vörös könyvben a „Least Concern”, azaz legkevésbé veszélyeztetett besorolást kapta (IUCN, 2010), mivel elterjedési területe ugyan korlátozott, de azon belül populációi stabilak és különösebb veszélyforrások nem fenyegetik.



2.2. ábra. A márványpisztráng (*Salmo marmoratus*). Fénykép: Horváth Ákos.

A márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) önálló fajnak tekinthető, hiszen külső megjelenését, és genetikai összetételét tekintve elkülönül más pisztrángféléktől. Közeli rokonságot mutat a sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) 4 elkülönült, Európa egyes vízgyűjtő területeihez (adriai, mediterrán, dunai, valamint atlanti) kötődő genetikai vonalával (Bernatchez, 2001). A 20. század elején, a horgászat fellendülésével, nagyméretű pisztrángbetelepítések kezdődtek a szlovén folyókba (Jug et al., 2005). Napjainkban a márványpisztráng már csak az Adriai medencében található meg: Észak-Olaszországban, a volt Jugoszlávia egyes területein (Szlovénia, Bosznia-Hercegovina, Montenegró) és Albániában. Az őshonos márványpisztráng fajtiszta populációinak száma, a sebes pisztránggal történt hibridizációk miatt vészesen lecsökkent (Povž, 1995). Szlovéniai élőhelyein jelenleg a hibrid egyedek dominálnak (Guiffra et al., 1996). Kivételt képeznek azon izolált folyók és patakok, amelyek a Soča folyó völgyében és mellékfolyóiban (Idrijca folyó és mellékágai) található (Povž et al., 1996a). A Soča Szlovénia egyetlen jelentős, az adriai vízgyűjtőhöz tartozó folyója, mivel az ország nagy része vízrajzi szempontból a dunai, azaz végső soron a fekete-tengeri vízgyűjtő része. Az itt élő fennmaradt populációk elszigetelve élnek a hibrid egyedektől. Az elszigeteltség természetes gátnak köszönhető. A kutatók 8 genetikailag teljesen tiszta márványpisztráng populációt találtak ezeken a területeken (Fumagalli et al., 2002). Földrengések és áradások miatt mára mindössze 7 populáció maradt fenn, melyekből egy már csak pisztrángtelepen található meg (Jesenšek, szóbeli közlés).

A genetikai információk keveredése genetikailag különböző populációk eltűnéséhez (introgresszió) vezethet. A termékeny hibrid egyedek egymással, és genetikailag tiszta egyedekkel való összeívásukkor új hibrid populációkat hozhatnak létre. Ez a jelenség kifejezetten káros a ritka, veszélyeztetett fajok számára (Leary et al., 1995). Szlovén kutatók és a pisztrángtelepek

1993-ban akciótervet dolgoztak ki a faj megmentésére (Povž et al., 1996b). Céljuk új, fajtiszta populációk létrehozása volt, melyek életképesek lehetnek a természetes környezetben. A folyamat alapját képezi a tiszta populációkból egyedek mintavétele, és tenyészállományok létrehozása pisztrángtelepeken (Fumagalli et al., 2002). A külső megjelenés vizsgálata mellett szükség volt a molekuláris módszerek fejlesztésére is, hogy ellenőrizni tudják a kiválasztott egyedek genetikai hátterét. Számos molekuláris markert alkalmaztak sikeresen a fajtiszta és hibrid egyedek elkülönítése során (Jug et al., 2004). Csak a fenotípusában és genotípusában egyaránt márványpisztráng egyedeket választották be a tenyésztési programba (Jesenšek, szóbeli közlés). Mára az akcióterv egy országhatárokat átívelő konzervációbiológiai és ökológiai programmá nőtte ki magát, melynek fő irányítója a Tolmini Horgász Egyesület. A kutatásba és a faj megmentésébe a Ljubljana-i Egyetem, és a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Karának Halgazdálkodási Tanszéke is bekapcsolódott. A magyar egyetem munkatársai sikeresen mélyhűtötték a márványpisztráng spermáját, mellyel génbank létrehozása vált lehetővé (Horváth et al., 2009). Ahhoz, hogy a pisztrángtelepeken tenyésztett fajtiszta populációk életképesek legyenek a természetben, növelni kell a genetikai változatosságot (Fumagalli et al., 2002). Fumagalli és munkatársai az izolált természetes populációkon belül alacsony, a populációk között viszont magas genetikai variabilitást találtak. A fogságban tenyésztett állományok nem tudnak adaptálódni a természetből érkező hatásokhoz, ha a populációikon belül nagy a genetikai sodródás és gátolt a pánmixis (Fumagalli et al., 2002). Szükség van az asszisztált reprodukciós módszerek tökéletesítésére, hogy minél nagyobb termékenyülést és genetikai változatosságot érjenek el az új, fajtiszta populációk létrehozásakor.

2.1.3. A pénzes pér (*Thymallus thymallus*)

A pénzes pér (2.3. ábra) feje kicsi, teste megnyúlt, oldalról lapított, közepes nagyságú pikkelyek borítják. A pikkelyek száma az oldalvonal mentén 74-96. A rendkívül magas, széles és hosszú, zászlószerű hátúszója alapján könnyen megkülönböztethető a rokonaitól, és az ivarok is könnyen elválaszthatók. A hátúszók IV-VII kemény és 15-17 lágy úszósugárból tevődnek össze. A pénzes pér farokúszója mélyen bevágott, a hasúszok nagyok és erőteljesek (Pintér, 2002).

Háta zöldesszürke alapszínű, oldalai ezüstösek enyhe zöldes árnyalattal, néhány szabálytalanul elhelyezkedő, apró fekete folttal. Ivadékkorban a testoldalát szabályosan elhelyezkedő foltos díszíti, amely a növekedése során fokozatosan eltűnik. Az ívási időszakban a hímek vörhenyes árnyalatúak és a páros úszók sárga színűek, a páratlan úszók szürkések. A nőstények a harmadik évben, a hímek a másodikban válnak ivaréretté. Szaporodási idejük március végétől május elejéig tart. A nőstények a 6000-7000, 4 mm-es ikrákat sekélyebb, homokba, kavicsba vájt gödrökbe rakják le. 20-30 nap elteltével bújnak ki a lárvák az ikrákból. Egyéves korukra 10-12 cm, kétévesre 15-20 cm, 3 éves korukra eléri a 30 cm hosszúságot, ekkor körülbelül 300-400 grammot nyomhatnak. Maximális testhosszúságát 50 cm-nek, tömegét 2,5-2,8 kg-nak jelölik a különböző irodalmi források (Pintér, 2002). Rövid életű halfajnak számít, legfeljebb 6 évet él. Tápláléka változatos. Elfogyasztja a rovarokat, apró rákokat, csigákat, férgeket, de egyedei kiugorhatnak a vízből is a repkedő rovarok után. Túlszaporodása esetén kárt tehet a pisztráng ikrában és az ivadéokban. A pénzes pér ismertebb elnevezései: márnafiú, ón(hal), pénzes(pisztráng), timalykó, tomolyka, zászlóshal, pérhal.

A pénzes pér Európa-szerte közönséges fajnak számít, előfordul Anglia, Dél-Skandinávia, Dél-Franciaország, Loire-völgy és a Duna vízgyűjtő területein (Pintér, 2002). Vörös könyves besorolása szerint az LC (Least concern) kategóriába tartozik (IUCN, 2010), mivel Európa sebes folyású folyóvizeiben általánosan elterjedt, gyakori faj, és populációit jelentősebb veszély nem fenyegeti.



2.3. ábra. Az adriai pénzes pér (*Thymallus thymallus*). Fénykép: Horváth Ákos.

Szlovéniában előfordul egy a pénzes pérhez igen közel álló, jelenleg még nem önálló fajként kezelt adriai pér. Az adriai pér határozottan eltér a pénzes pértől, úgy genotípusosan, mind fenotípusosan, azonban száz százalékosan csak genetikai vizsgálatokkal lehet megkülönböztetni a két csoportot. A dunai populációhoz képest az adriai populációt tekinthetjük morfológiailag különállónak. A Duna medencéjében előforduló pénzes pér alapszíne zöldesszürke, az adriai pér alapszíne ettől jóval eltér: az uralkodó szín ventrális irányban sötétszürke. A hasa sárgás-fehér. Az úszók sárgásak, a farokúszó jellegzetes szürkés-kék színű ellentétben a pénzes pérrel melynek a farokúszója sárgás-pirosas. A test különböző pontjain elhelyezkedő vörös foltok hiányoznak, ivási időben sem jelennek meg. Az árnyalatait és annak színét nagyban befolyásolja az élőhely és a hal kora. A kifejlett példányok testét nem borítják fekete foltok, a fekete pöttyök csak ivadékkorban figyelhetők meg.

Az adriai pér előfordulása a Soča folyó vízgyűjtő területeire korlátozódik. Megtalálható a Soča, Učja, Tolminka, Idrijca, Idrija, Trebuščica, Trebuša, Bača valamint a Kneža folyókban. (Jesenšek és Šumer 2004). A Soča vízgyűjtő területén igen sérülékeny populáció él, és a halak száma is igen korlátozott (Sušnik et al., 2004). A Soča völgyében fogott halaktól vett mintákat molekuláris biológiai vizsgálatoknak vetették alá. Az adriai pérnél igen magas volt a csak erre a populációra diagnosztizált allélok száma (12). A genetikai különbség az adriai és a dunai vonal haplotípusai közt igen jelentős volt (Sušnik et al., 2001). A szerzők álláspontja szerint az adriai pér genetikai távolsága Európa többi populációjától indokoltá tenné annak elismerését önálló fajként.

A márványpisztrángthoz hasonlóan az adriai pénzes pér populációit is veszélybe sodorta a 20. század során végrehajtott átgondolatlan haltelepítés. A Száva folyóból többször is hoztak át a pénzes pér dunai populációjához tartozó nagyobb szállítmányokat. A márványpisztrággal ellentétben a nyílt vizeket kedvelő adriai pénzes pérnek nem alakultak ki földrajzi akadályokkal határolt elszigetelt populációi. A betelepített és őshonos populációk introgresszív hibridizációja révén jelenleg kizárólag hibrid populációk élnek a Soča vízrendszerében, amelyek egyedei több-kevesebb mértékben tartalmazzák az adriai populáció jellemző génjeit (Jesenšek és Šumer, 2004).

2.2. A halsperma mélyhűtése

2.2.1. A mélyhűtés fizikai-biológiai alapjai

A sejtek mélyhűtésének alapja a víz vándorlása, és az a membránáteresztő képesség, amely kapcsolatot teremt a sejten belüli tér és a membránon kívüli környezet között (Denniston et al., 2000). Általános törvényszerűségnek tekinthető, hogy egy nagyobb sejt sejthártyája kevésbé permeábilis és lassabban fagy meg, mint a víz számára átjárhatóbb membránnal rendelkező, kisebb sejt (Mazur, 1977). A tiszta, ionokat nem tartalmazó víz fagyáspontja 0°C . Különböző anyagokat tartalmazó folyékony közegek fagyáspontja tehát az oldott összetevők mennyiségétől függ (Denniston et al., 2000).

Az élő sejtek számos ozmotikus egyensúlyt fenntartó képletet tartalmaznak, amelyek nagyban befolyásolják mélyhűtésüket. Az állati sejtekben nagy mennyiségű víz, oldott cukrok és sók, valamint fontos fehérjék és zsírok találhatók. Mindezek nélkülözhetetlenek a sejtszervecskéék 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 az áramlás létfontosságú a sejten belüli és a sejten kívüli tér között, hiszen lehetővé teszi, hogy a különböző anyagok mennyisége egyensúlyban legyen a két oldalon. Az oldott anyagok mennyiségét az oldatban ozmolalitással szokás megadni, melynek mértékegysége mosmol/kg. Értéke egy átlagos sejtkultúra-közegeben 280-310 mosmol/kg (Denniston et al., 2000).

A mélyhűtési eljárás megtervezése során elkövetett hibák súlyos sejtkárosodással járhatnak. A sejten belül jégkristályok jöhetnek létre, valamint zavart okozhat a dehidratáció. A hőmérséklet csökkenése során ozmotikus sokk érheti a sejteket. Utóbbi sejtelváltozás kétféleképpen jöhet létre. Az első az, amikor a külső környezet hipertonikus (nagyobb az oldott anyag mennyisége a sejten kívül, mint a sejten belül), ezért a sejt túl sok vizet veszít. A másik esetben a membránon kívüli közeg hipotonikus (nagyobb az oldott anyag mennyisége a sejten belül, mint a sejten kívül), melynek eredménye káros mennyiségű vízfelvétel. A fenti jelenségek nagyban befolyásolják a krioprotektív anyagok beáramlását a sejten belüli térbe. Ezek a védő anyagok gátolják meg a sejthártya károsodását a mélyhűtés során. Az ideális közeget izotóniásnak nevezzük, mert ekkor egyensúly van az oldott anyag koncentrációjában a membrán két oldalán (Mazur, 1977). Gyakran előforduló probléma a fagyási folyamat szakaszossága. Ebben az esetben a tiszta víz hamarabb fog megszilárdulni a fagyás során és az oldott anyag nagy koncentrációban visszamarad, fagyáspontja alacsonyabb lesz. A hőmérséklet csökkenésével még több víz fog megfagyni, ami jégkristályok képződéséhez vezet. Az anyagkoncentráció addig fog növekedni, amíg el

nem éri a környezet azt a legalacsonyabb hőmérsékletet, amely megegyezik az oldott ionok fagyáspontjával. A túl gyors fagyasztási eljárás a sejt számára halálos jégkristályképződéssel jár, viszont csökken a dehidratáció esélye. A túl lassú mélyhűtési folyamat megakadályozza a kristályképződést, ugyanakkor letális dehidratációhoz vezet (Denniston et al., 2000). A sejtek túlélésében a felolvasztási folyamat, ezen belül a felmelegítés mértéke és gyorsasága is nagy jelentőséggel bír. A hűtés sebessége és a fagyasztási hőmérséklet szabja meg a felolvasztás ütemét (Rall, 1981).

2.2.2. A spermamélyhűtés folyamata

A sperma mélyhűtése egy asszisztált reprodukciós eljárás, melynek köszönhetően a genetikai örökítő anyag szinte korlátlan ideig tartósítható (Cloud et al., 2009). Ashwood-Smith, Witthingham és Stoss kutatásai alapján elmondhatjuk, hogy a mélyhűtött minta folyékony nitrogénben akár 200-32 000 évig is tartósítható (Ashwood-Smith, 1980, Witthingham, 1980, Stoss, 1983). Bár kutatásukban becsült értéket közöltek, mégis érezhető a módszerben rejlő számtalan lehetőség. Ez az eljárás kiválóan alkalmazható a halak tenyésztésében és veszélyeztetett fajok genetikai tartalékainak megőrzésében (Cloud et al., 2009).

A mélyhűtés első lépése a vizsgált faj spermájának kinyerése. A csontoshalak nagy részénél a spermát le lehet fejni [pl.: szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)], azaz a hasfal masszírozásával kinyerhető a herében tárolt sperma (Pintér, 1992). Egyes halfajok [pl. afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)] esetében a mintavétel igen drasztikus, hiszen a faj anatómiai sajátosságai miatt az egyedet el kell pusztítani, és az ivarszervéből kell kinyerni a spermát. Mindkét módszer esetében a folyamat a kiválasztott egyed altatásával kezdődik. Altatáshoz a legtöbb esetben trikain-metánszulfonsavat (MS-222-t), 2-fenoxietanolt, vagy szegfűszegolajat alkalmaznak. A sperma kinyerése során el kell kerülnünk a minta vérrel, vizelettel, széklettel vagy egyéb anyagokkal történő szennyeződését (Cloud et al., 2009). A hasfal-masszázs alkalmazása 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. Ha a minta szállítást igényel, akkor a tárolásnál megadott hőmérsékletet és oxigénellátottságot kell biztosítani (Cloud et al., 2009).

A sperma mélyhűtése előtt meg kell határozni annak minőségét, hiszen a felolvasztás utáni termékenyülést nagyban csökkentheti a nem mozgékony, rossz minőségű minta. A spermiumok az ívás során a külső közegben (vízben) aktiválódnak, tehát mesterséges körülmények között aktiválnunk kell őket. Az aktiváló oldatot fajspecifikusan kell előállítani. A tengeri fajok spermáját az ozmolalitás növekedése, míg az édesvízi fajok spermáját az ozmolalitás csökkenése aktiválja. A pisztrángfélék spermiumainak aktivációjához nélkülözhetetlen a káliumion koncentráció csökkenése az extracelluláris térben. Az aktiváció után a mozgékony sejtek becslését elvégezhetjük szabad szemmel mikroszkóp alatt, vagy alkalmazhatunk CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) rendszert. Utóbbi egy számítógéppel összekötött mikroszkóp rendszer, amely egy szoftver segítségével számítja ki a mozgó spermiumok arányát (Cloud et al., 2009).

A legtöbb esetben a mintát 1:3 arányban hígítjuk hűtőmédiummal. A közeg, mely mélyhűtés közben körülvézi a spermiumokat, két fő összetevőből áll. Az első ezek közül egy hígító, amely a szeminális plazmának megfelelő izotóniás oldat megfelelő pufferrendszerrel és membránstabilizáló anyagokkal. Az alkalmazott hígító nem aktiválja a sejtek mozgását, és összeté-

tele taxonfüggő. Az egyik legfontosabb összetevője a pufferrendszer, amely megakadályozza a hűtés és felolvasztás során az oldat pH-értékének jelentős ingadozását. Másik jelentős alkotórésze a membránstabilizáló, mely fontos szerepet játszik a sejtek külső felületének védelmében (Cloud et al., 2009). Jól alkalmazható stabilizáló anyag pizstrángfélék esetében a tojássárgája, a BSA és a promin D. A hűtőmédium szintén fontos alkotója az ún. védőanyag vagy krioprotektáns (Baynes és Scott, 1987, Stoss és Holtz, 1981). A védőanyagok általában alacsony molekuláris tömegű vegyületek, hiszen át kell hatolniuk a sejtek plazmamembránján. Egyes krioprotektív anyagok toxikusak lehetnek a sejtek számára. A spermiumokba jutva megakadályozzák a jégkristályok kialakulását a mélyhűtés alatt. Ilyen anyagok használata nélkül a sperma termékenyítő-képessége a felolvasztás után jelentősen lecsökken (Cloud et al., 2009). Halaknál jól alkalmazható védőanyagok például a DMSO, a glicerin, vagy a metanol (Denniston et al., 2000). A sejtbe történő behatolásukhoz időre van szükség, amelyet egyensúlyozási időnek nevezünk. Az egyensúlyozási folyamat addig tart, amíg a krioprotektív anyag koncentrációja a sejtben belül és kívül ki nem egyenlítődik. Kis sejtek, és egyes védőanyagok (pl. dimetilszulfoxid (DMSO)) esetében a jelenség a hígítás után azonnal lezajlik, és nincs szükség várakozási időre. A krioprotektív anyagok esetleges toxikus hatásai miatt a folyamatnak 4-0°C-on kell végbemennie (Horváth, 2001).

Az előkészített spermamintákat cseppek (pelletek) formájában közvetlenül, vagy műszalmákban, illetve ampullákba töltve hűtik. Utóbbi kettő alkalmazása kényelmesebb, hiszen könnyebb adagolást tesz lehetővé. A műszalmák mérete változó lehet. A kisebb méretűek ideálisabbak vizsgálati célokra, a nagyobb műanyag tubusok viszont egyszerűbben alkalmazhatók a halgazdaságokban, ahol nagyobb mennyiségű spermával dolgoznak. Az évek során számtalan módszer alakult ki a spermiumok mélyhűtésére. A legegyszerűbb és legolcsóbb a szárazjég használata, melynek szublimációs hőmérséklete $-78,5^{\circ}\text{C}$. Ennél az eljárásnál u.n. pelleteteket cseppentenek egy szárazjégtömb felületén lévő mélyedésekbe. A módszer hátránya, hogy nagyban függ a hűtési sebesség és arány a minta nagyságától. Előfordul, hogy a pellet nem egyenletesen fagynak meg. A szárazjéghez hasonló módszer a hideg alkoholos fürdő. 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. A minták a pelletek mellett hűthető ampullákba is tölthetők, melyeket az alkohollal feltöltött edénybe helyeznek. Szárazjég adagolható a rendszerhez, ezzel is szabályozva a hűtés sebességét és arányát. Ennek a lépésnek hirtelen buborékosodás lehet az eredménye, ami csökkentheti a mélyhűtés sikerét.

A fenti módszerhez képest több előnnyel bír a folyékony 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. A negyedik lehetőség a programozható elektromos mélyhűtő berendezések használata, melyekbe folyékony nitrogént kell tölteni, majd bele kell helyezni a hűteni kívánt műszalmát vagy hűthető ampullát. Belső érzékelői segítségével szabályozható a minta körüli hőmérséklet. 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).

A pelletekben tárolt minta felolvasztása az adott fajra jellemző speciális médiumban történik (Stoss és Holz, 1983). A műszalmákban tárolt spermát vízfürdőben olvasztják fel. A fürdő hőmérséklete 0-70°C-ig terjedhet. A túl magas hőmérséklet károsíthatja a spermiumokat, a túl alacsony pedig jelentősen megnöveli a felolvasztási eljárás időtartamát (Horváth, 2001).

2.2.3. Lazacfélék (Salmonidae) spermamélyhűtésének eredményei

Az első kísérletek többek között a lazac (*Salmo salar*) spermájának mélyhűtésével kezdődtek az 1960-as évek elején. 1963-ban számos kutató sikeresen mélyhűtötte a faj spermáját, a felolvasztás után azonban csak minimális (0,5-2%) termékenyülést tudtak elérni (Hoyle és Idler, 1968). Hoyle és Idler 1968-as kísérletében a felolvasztott lazacsperma termékenyítő-képessége már 18%-os volt. Ott és Horton 1971-ben végzett kutatásukban a szivárványos pisztráng egy változatának (*Salmo gairdneri*) spermáját mélyhűtötték sikeresen. A felolvasztott minta termékenyítő-képessége átlagosan 59%-os volt. A következő 40 évben a figyelem középpontjába a mélyhűtést befolyásoló tényezők vizsgálata, valamint az adott fajokra tökéletesített hűtési eljárások kidolgozása került. Stein és Bayrle 1978-ban végzett kutatásában pontyfélék és pisztrángfélék spermájának mélyhűtését vizsgálták. A spermiumok mozgékonyasága hasonló volt az aktivációt követően. A pisztrángfélék mélyhűtött mintája sokkal jobb termékenyítő-képességgel bírt felolvasztás után, mint a pontyféléké. Billard 1983-as kutatásában sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) és szivárványos pisztráng mélyhűtött spermiumainak morfológiáját, sőtűrését, 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 termékenyítési arányát, viszont a hűtés során a sejtek egy része deformálódik és életképtelenné válik. Erdahl és munkatársai 1984-es kutatásukban a szivárványos pisztráng, a sebes pisztráng, valamint a patoki szaibling (*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-es 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 és munkatársai 1996-os 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 (Lahnsteiner et al., 1996a). Ugyanők egy másik, ugyancsak 1996-os kutatásukban a pénzes pér (*Thymallus thymallus*) és a dunai galóca (*Hucho hucho*) spermamélyhűtését vizsgálták. Egy, a szivárványos pisztrángra kifejlesztett hűtési eljárást alkalmaztak (Lahnsteiner et al., 1995). Három különböző védőanyag (metanol, glicerol-DMSO keveréke, DMSO), valamint különböző ütemben történő hűtési folyamatok hatását vizsgálták a felolvasztás utáni termékenyítő-képességre. Az ered-

mények 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 galócahoz képest. A három vizsgált védőanyag közül a metanol volt a legeredményesebb (Lahnsteiner et al., 1996b). Cabrita és munkatársai 1998-as vizsgálatuk során bebizonyították, hogy a szívárványos 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 az adott faj spermiumaira nézve. Babiak és munkatársai 2001-ben végzett kutatásukban bebizonyították, hogy összefüggés van a hűtésnél használt hígító összetétele és az egyensúlyi idő között. A két tényező külön-külön és együttesen is csökkentheti, vagy növelheti a felolvasztás utáni termékenyítő-képességet szívárványos pisztráng sperma esetében. Az eredmények alapján arra is rájöttek, hogy a hűtési folyamat során, a sejteken belüli tejsav-dehidrogenáz és aszparaginsav-aminotranszferáz mennyisége csökkenhet, ami gátolja a termékenyülést. Cabrita és munkatársai 2001-es vizsgálatukban sikeresen hajtottak végre spermamélyhűtést nagyméretű (1,8 és 5 ml) műszalmákkal. A kutatás során szívárványos pisztrángtól származó mintát használtak. Az eddig alkalmazott kisméretű (0,25 és 0,5 ml) műszalmák nehezen alkalmazhatóak gazdasági körülmények között, nagy mennyiségű ikra termékenyítésére. 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 pisztrángtelepi tenyésztés során is jól alkalmazható. Labbé és Maisse 2001-es kutatásukban a sebes pisztráng spermiumainak sótűrését vizsgálták. A halakat 9 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 és munkatársai 2006-os kutatásuk során a veszélyeztetett sebes pisztráng alfajaként számon tartott *Salmo trutta caspius* spermamélyhűtését vizsgálták 2006-os kutatásukban. A hűtésnél használt hígító és a felolvasztás ütemének hatását elemezték a mélyhűtött sperma termékenyítő-képességére nézve. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a két tényező külön-külön és együtt is csökkentheti, illetve növelheti a felolvasztás utáni termékenyülés esélyét. A 2000-es évek végére számos pisztrángféle (pl. szívárványos pisztráng, sebes pisztráng) esetében a spermamélyhűtési eljárás rutineljárássá és gazdaságossá vált. Az évtizedeken át tartó fejlesztés könnyen kezelhető és piaci forgalomba hozható kiteket 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 kevés populációval rendelkező, veszélyeztetett taxonok (pl. márványpisztráng - *Salmo marmoratus*, adriai pénzes pér - *Thymallus thymallus*, dunai galóca - *Hucho hucho*), amelyek spermájának konzervációjáról keveset tudunk, és számos kutatásra van szükség, hogy ez az asszisztált reprodukciós eljárás e csoportok esetében is sikeres legyen.

3. fejezet

Anyag és módszer

3.1. A vizsgálatok átfogó célja

Mivel tanszéki munkánk során már több éve folyó kutatásba kapcsolódtunk be, az egyes fajokban végrehajtott vizsgálatoknak eltérő volt a közvetlen célja. A sebes pisztrángban folytatott kísérleteinkben különböző equilibrációs idők hatását vizsgáltuk a mélyhűtött sperma termékenyítő képességét. A márványpisztráng fajban az egyes spermaminták egyedi hatását vizsgáltuk a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére a spermamélyhűtés gyakorlati bevezetése előtt. A pénzes pér fajban két élesen eltérő munkát végeztünk: egy kísérletes kutatómunkát, amelynek célja a különböző műszalmaméretek és védőanyagok hatásának vizsgálata volt, valamint sor került a mélyhűtött sperma keltetőházi alkalmazására is.

3.2. Vizsgálatok sebes pisztráng fajban

3.2.1. A sperma és ikrá mintavétele

Kutatásunkat a Bükk-hegységben található Lillafüredi Pisztrángtelepen végeztük 2010. november 23-án. Munkánkat Hoitsy György telepvezető és munkatársai segítették. A munka során, a telepen található sebes pisztráng állomány halai közül 10 egyedet választottunk ki véletlenszerűen. Az egyedeket halászhaló és merítőháló segítségével halásztuk le az anyahaltartó medencékből, és műanyag, vízzel feltöltött tárolóedényekbe helyeztük. A sperma kinyerése előtt a halakat vízbe kevert szegfűszegolajjal bódítottuk. A spermamintát a hím egyedekből fejéssel nyertük ki. Az elkábított hím egyedeket felhelyeztük egy asztalra, majd a hasfal farok felé történő masszírozásával az ivarnyílásnál kiáramló spermát műanyag kémcsövekbe gyűjtöttük össze. A spermamintákat felhasználásig 4°C-on tároltuk. A termékenyülés vizsgálatához ikrát egy nőstény egyedtől mintavételeztünk, ugyancsak fejéssel. Az ikramintát felhasználásig 4°C-on tároltuk.

3.2.2. A sperma motilitásvizsgálata

A spermaminták minőségét a motilitási érték (a haladó mozgást végző spermiumok százalékos aránya) alapján vizsgáltuk. A méréseket zárt helységben, szobahőmérsékleten végeztük.

3. Anyag és módszer

3.1. táblázat. Az egyensúlyi idő vizsgálata a mélyhűtés előtt az 5-ös, 8-as, 9-es minták esetében. A *-al jelölt kontroll minták esetében nem alkalmaztunk egyensúlyi időt, és azokat nem hűtöttük. A **-al jelölt mintákat az alacsony motilitási érték miatt nem választottuk be a kutatásba.

Vizsgált egyed spermamintájának azonosítója	Kezelés (perc)
1**	0
2**	0
3**	0
4**	0
5	1
5	10
6**	0
7**	0
8	1
8	10
9	1
9	10
5*	0
8*	0
9*	0

A motilitási arány meghatározásához Carl Zeiss Jena Laboval típusú fénymikroszkópot használtunk 100× nagyításon. A vizsgálat során 19 μl forrásvizet és 1 μl spermát helyeztünk a tárgylemezre Gilson Pipetman típusú pipetta segítségével. A spermiumokat összekevertük a pipetta hegyével, így megtörtént azok aktivációja. A keverés után a mozgó sejtek arányát szabad szemmel becsültük meg.

3.2.3. A mélyhűtés folyamata

Az előzetes motilitás vizsgálat során három egyed mintáját választottuk ki a mélyhűtéshez (3.1. táblázat). Mind a három spermamintához védőanyagot (10% metanol) és hígítót (200 mM glükóz, 40 mM KCl és 30 mM Tris) kevertünk 1:1 arányban (Horváth et al., 2009). Az így kapott elegyeket 500 μl -es műszalmákba töltöttük. A következő lépés az egyensúlyi idő volt, amely során kétféle kezelést alkalmaztunk (3.1. táblázat). A kezeléseknak megfelelően, 1 és 10 perces egyensúlyi idő után a műszalmákat egy 3 cm vastag, közepén lyukas polisztirol keretre helyeztük, amely egy folyékony nitrogénnel feltöltött polisztirol dobozban úszott. A felületen úszó lap tetején a műszalmákat 3 percig hűtöttük, majd behelyeztük a nitrogénbe. Mind a három egyed spermájából a termékenyítésig szobahőmérsékleten tároltunk egy-egy nem mélyhűtött kontroll mintát.

3.2.4. Felolvasztás és termékenyítés

A mélyhűtött műszalmákat a Thermo Haake P5 típusú vizes termosztát segítségével 40 °C-os vízfürdőben felolvasztottuk. A termékenyítés során a műszalmák tartalmát és a kontroll mintákat külön-külön összekevertük 15 g ikrával, melyet előzetesen a nőténytől fejtünk le. Az ikra mérésénél az Adam PGW 453i típusú mérleget alkalmaztuk. A termékenyítés során nem vettünk igénybe külön oldatot a spermiumok aktivációjához, ebben az esetben az ikraszemeket körülvevő ovariális folyadék töltötte be az aktiváló szerepet. A megtermékenyített ikracsoportokat egymástól elkülönítve helyeztük el a keltetőházban.

3.2.5. Termékenyülési eredmények elemzése

A termékenyülési arány meghatározásához megszámoltuk minden egyes spermával összekevert ikramintában a szemek számát. Az ikraszemeket megközelítőleg 320 napfok után vizsgáltuk meg. Leszámoltuk a szempontos stádiumba lépett és az elhalt ikrák számát. A szempontos ikra stádium jó mutatója a termékenyülésnek, hiszen e stádium után a szemek nagy valószínűséggel túlélnek, és kikelnek az ivadékok. A statisztikai elemzés során a csoportonkénti ikra mennyiségéhez viszonyítottuk a szemes stádiumba lépett ikraszemek számát, majd átlagot és szórást számoltunk. Az 1 és 10 perces kezelés, valamint a kezelések és a kontrollok közötti különbséget Fisher-féle egzakt próba segítségével határoztuk meg. Az elemzés során a Microsoft Windows Excel és az R 2.13.1 for Windows programot alkalmaztuk.

3.3. Vizsgálatok márványpisztráng fajban

3.3.1. A sperma és ikra mintavétele

A márványpisztránggal kapcsolatos kutatásainkat a szlovéniai Tolmin városában található Tolmini Horgász Egyesület pisztrángtelepén, valamint a Soča és a Tolminka folyókon végeztük 2010. november 29-től december 3-ig. Munkánkat Dušan Jesenšek telepvezető és munkatársai segítették. A mintavétel során a Soča, valamint a Tolminka folyókon egy ELT 60 II-es típusú elektromos halászgép segítségével próbáltunk hím egyedeket befogni, és a helyszínen spermamintát venni (3.2. táblázat). A sperma kinyerésére a sebes pisztrágnál ismertetett hasfali masszázst alkalmaztuk. Összesen 13 egyedtől sikerült mintát venni. A spermát felhasználásig -4°C-on tároltuk. A vizsgálatunkba csak a Tolminka folyóból és a pisztrángtelepről származó egyedek spermáját választottuk be, mivel a Sočából származó halakból nem tudtunk a mélyhűtéshez elegendő mintát venni. A termékenyülés vizsgálatához a pisztrángtelepről származó nőtény halak ikráját fejtük le. Az ikrát a felhasználásig -4°C-on tároltuk.

3.3.2. A sperma motilitásvizsgálata

A mélyhűtés előtt a spermamintákat motilitás vizsgálatnak vetettük alá, hogy a gyengén mozgó, rossz minőségű mintákat kiszűrjessük. Az eljárás és a használt eszközök teljes egészében megegyeztek a sebes pisztrágnál ismertetett vizsgálattal. A márványpisztráng esetében azonban nem csak mélyhűtés előtt, hanem hűtés után is megmértük a motilitást. A felolvasztás

3. Anyag és módszer

3.2. táblázat. A márványpisztráng vizsgálata során lehalászott egyedek és származási helyük. Az 1-11 egyedek mintáját választottuk ki a spermamélyhűtés vizsgálatára. A *-al jelölt 11-es pisztrángtelepi egyed spermamintáját nem mélyhűtöttük, kontrollként használtuk fel. A **-al jelölt Sočából származó egyedeket nem választottuk be a vizsgálatba.

Vizsgált egyed spermamintájának azonosítója	Egyed származási helye
1	Tolminka folyó
2	Tolminka folyó
3	Tolminka folyó
4	Tolminka folyó
5	Tolminka folyó
6	Tolminka folyó
7	Tolminka folyó
8	Tolminka folyó
9	Tolminka folyó
10	Tolminka folyó
11*	tolmini pisztrángtelep
12**	Soča folyó
13**	Soča folyó

utáni motilitás vizsgálatok a sperma aktivációjához víz helyett a 3.3.4. pontban leírt DIA523 termékenyítő oldatot használtuk, mivel a termékenyítéskor is ezt adagolják az ivartermékhez.

3.3.3. A mélyhűtés folyamata

A sperma mélyhűtése során a különböző egyedektől származó mintákat a sebes pisztrágnál bemutatott védőanyaggal és hígítóval kevertük össze. Nem alkalmaztunk egyensúlyozást a mélyhűtés előtt. A hűtés folyamata és a felhasznált eszközök megegyeztek a sebes pisztráng esetében alkalmazott eljárásnál használtakkal.

3.3.4. Felolvasztás és termékenyítés

A felolvasztás során a sebes pisztráng esetében alkalmazott eljárást és eszközöket alkalmaztuk. A termékenyülési vizsgálat során, a felolvasztott Tolminkából és a pisztrángtelepről származó 0,25 ml kontroll mintát külön-külön 20 g ikrával kevertük össze. A mérésekhez az Adam PGW 453i típusú mérleget használtuk. Ebben az esetben a spermiumok aktivációjához a DIA 523-as termékenyítő oldatot (1 l víz, 2,42 g Tris, 3,76 g glicin, 5,5 g NaCl) alkalmaztuk (Billard, 1977). A megtermékenyített ikracsoportokat egymástól elkülönítve helyeztük el a keltetőházban.

3.3.5. Termékenyülési eredmények elemzése

A termékenyülési arány meghatározásához a sebes pisztrágnál bemutatott módszert, elemzést és számítógépes szoftvereket alkalmaztuk. Az eredmények értékelése során a Fisher-féle egzakt próbát nem alkalmaztuk. Márványpisztráng esetében is a szempontos ikrákat 320 napfok után számolták le és juttatták el hozzánk az eredményt a szlovén kollégák. Az ivadékok kelési eredményét szintén szlovén munkatársaink juttatták el hozzánk. A elemzések során a különböző Tolminka folyóból származó minták közötti, valamint az e minták és a kontroll minta közötti különbséget határoztuk meg.

3.4. Vizsgálatok pénzes pér fajban

3.4.1. A sperma és ikra mintavétele

A kutatásokat 2011. áprilisában Szlovéniában, Tolminban, a Tolmini Horgász Egyesület pisztrángtelepén végeztük valamint a munkához a halakat a szlovén Gljun és Učja folyókból gyűjtöttük be. A gyakorlati alkalmazáshoz felhasznált halak az imént említett folyókból, a kísérletes munka során használt egyedek pedig a telep törzsállományából származtak. A termékenyítéshez használt ikrát kizárólag az egyesület telepén tartott tenyészállománytól gyűjtöttük be. A gyakorlati alkalmazás esetében a lefejt ikrások kizárólag ellenőrzött adriai pér egyedek voltak, a kísérletes munka esetében ilyen feltétel nem volt.

A gyakorlati alkalmazás során a halakat elektromos halászgéppel gyűjtöttük be. A spermavétel előtt a halakat elbódítottuk, melyhez 2-fenoxietanolt alkalmaztunk. Ebből az altatóból 40 ml-t használtunk fel 50 l vízhez. A halakat egy kádban altattuk, az elkábulásukhoz hozzávetőlegesen 1-2 percre volt szükség. A teljesen elkábult halaktól úszómintát vettünk a későbbi DNS vizsgálathoz. A farokúszó-mintákat 2 ml-es, 96%-os etanollal megtöltött Eppendorf-típusú centrifugacsövekbe raktuk. A kísérletes munkában felhasznált egyedek esetében a pisztrángtelep rutin szaporítási munkája részeként fejtünk spermát, szintén a halak fent említett módon végzett elaltatását követően.

A sperma és ikra fejésének módja megegyezik a sebes és márványpisztráng fajokban leírtakkal. A sperma motilitásvizsgálatát a márványpisztráng fajban leírtaknak megfelelően végeztük.

3.4.2. A mélyhűtés folyamata

A spermamélyhűtés folyamata megegyezett a sebes és márványpisztráng fajokban leírtakkal, néhány lényeges kivétellel. A kísérletes munka során két védőanyagot, a dimetilszulfoxidot (DMSO) valamint matanolt teszteltük 10% koncentrációban. A hígítóval és védőanyaggal elegyített spermát 0,5 és 1,2 ml-es műszalmákba töltöttük és hűtöttük cseppfolyós nitrogén gőzében. A kísérletes munkában használt mintákat egy évig tároltuk kaniszteres kannában.

A gyakorlati alkalmazásra szánt mintákat a márványpisztráng fajban leírt módszerrel hűtöttük le. Ezeket a mintákat egyedi jelöléssel láttuk el, hogy megkönnyítsük a későbbi azonosítást. A keltetőházi hasznosításra szánt mintákat a farokúszó mintákon végzett genetikai vizsgálatok eredményeinek kézhezvételéig tároltuk, azaz kb. egy hónapig.

3.4.3. Felolvasztás és termékenyítés a mélyhűtött spermával

A mintákat a sebes pisztráng fajban leírt módon olvasztottuk fel, azzal a különbséggel, hogy az 1,2 ml-es műszalmákban hűtött minták felolvasztási ideje 20 másodperc volt. A kísérletes munka során a lefejt ikrát 10 g-os adagokra osztottuk fel (847 ± 23 ikraszem). A termékenyítéshez használt sperma mennyiségét $100 \mu\text{l}$ friss spermára normalizáltuk. A megtermékenyített ikratételeket kísérleti keltetőedényekbe helyeztük és a Tolmini Horgász Egyesület keltetőházában inkubáltuk. Később szempontos állapotban leszámoltuk a termékenyülési arányt, majd meghatároztuk a kelési %-ot.

A keltetőházi alkalmazás során a levett farokúszó-mintákat a Tolmini Horgász Egyesület munkatársai elküldték a Ljubljanoi Egyetemre, ahol a Sušnik et al. által 2004-ben közölt genetikai markerek segítségével jellemezték a befogott egyedeket és meghatározták, hogy milyen mértékben hordoznak az adriai populációra jellemző markereket. A kapott eredmények alapján a Tolmini Horgász Egyesület munkatársai felolvasztották azon egyedek spermamintáit, amelyek legalább a vizsgált markerek 95%-ában adriai jelleget mutattak és azokat használták fel korábban megvizsgált adriai pér ikrások ikrájának termékenyítésére.

3.4.4. A termékenyülési eredmények értékelése

A kapott termékenyülési eredményeket GraphPad Prism for Mac 5.0 statisztikai szoftverrel elemeztük. A szempontos termékenyülési és kelési eredmények feldolgozásakor kétszempon-
tos variancia-analízissel (ANOVA) vizsgáltuk a műszalma méret és a védőanyag hatását 5% szignifikancia-szint mellett.

4. fejezet

Eredmények

4.1. A sebes pisztráng fajban kapott eredmények

4.1.1. A sperma és ikra mintavétele, motilitásvizsgálat

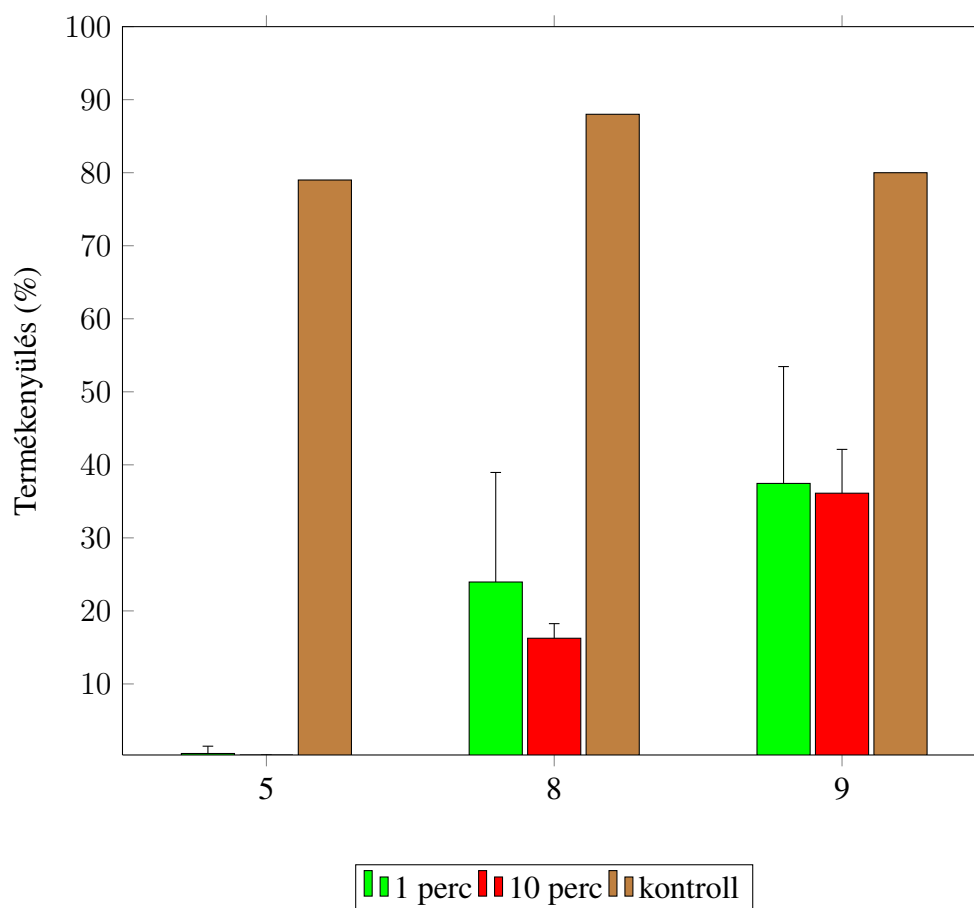
A sperma mintavétele során összesen 9 hím egyedet fejtünk le. A lehetőségek korlátozottsága miatt nem volt lehetőség a mintaelemszám növelésére. Az ikra mintavétele során 1 nőstény egyedet fejtünk le. A 9 spermamintát motilitás vizsgálatnak vetettük alá. Csak a 80%-os motilitási arányt elért és a hűtéshez elegendő mennyiségű spermamintákat vettük be a kutatásba. Az eredmények alapján egyedül az „5”-ös, „8”-as és „9”-es egyedektől származó mintát választottuk ki az egyensúly és spermamélyhűtés vizsgálatára (4.1. táblázat).

4.1. táblázat. A sebes pisztrángból kinyert spermaminták motilitásvizsgálatának eredménye. Az „1”-es, „2”-es, „3”-as, „6”-os és „7”-es minta esetében a motilitási érték túl alacsony volt. A „4”-es minta mennyisége nem volt elegendő a mélyhűtés elvégzéséhez.

Vizsgált egyed spermamintájának azonosítója	Motilitás (%)
1	20
2	0
3	10
4	80
5	80
6	50
7	70
8	90
9	80

4.1.2. Az equilibráció és a mélyhűtés utáni termékenyülés vizsgálata

Az equilibráció vizsgálata során az eredmények azt mutatták, hogy az „5”-ös számú mélyhűtött minta esetében a termékenyülési arány minimális volt (4.1. ábra). A vizsgált ikrák közül mindösszesen 3 db lépett szempontos stádiumba. Az „5”-ös számú, nem mélyhűtött kontroll minta esetében viszont magas termékenyülési arányt mértünk. A „8”-as minta eredményei azt mutatták, hogy mindkét kezelés esetében alacsonyabb értéket mértünk a „8”-as kontrollhoz képest ($p = 2,2 \times 10^{-16}$ és $p = 2,2 \times 10^{-16}$). Az equilibrációs időket összehasonlítva az 1 perces kezelés esetében szignifikánsan magasabb termékenyülést tapasztaltunk a 10 perces kezeléshez képest ($p = 0,004327$). A „9-es” minta esetében mind a két kezelés eredménye szignifikánsan elmaradt a kontrollhoz képest ($p = 2,2 \times 10^{-16}$ és $p = 2,2 \times 10^{-16}$). Az 1 és 10 perces kezelések eredményei között nem találtunk jelentős különbséget.



4.1. ábra. A sebes pisztráng különböző equilibrációs idők (1 és 10 perc) használatával mélyhűtött spermájának termékenyülési eredményei.

4.2. A márványpisztráng fajban kapott eredmények

4.2.1. A sperma és ikra mintavétele, motilitásvizsgálat

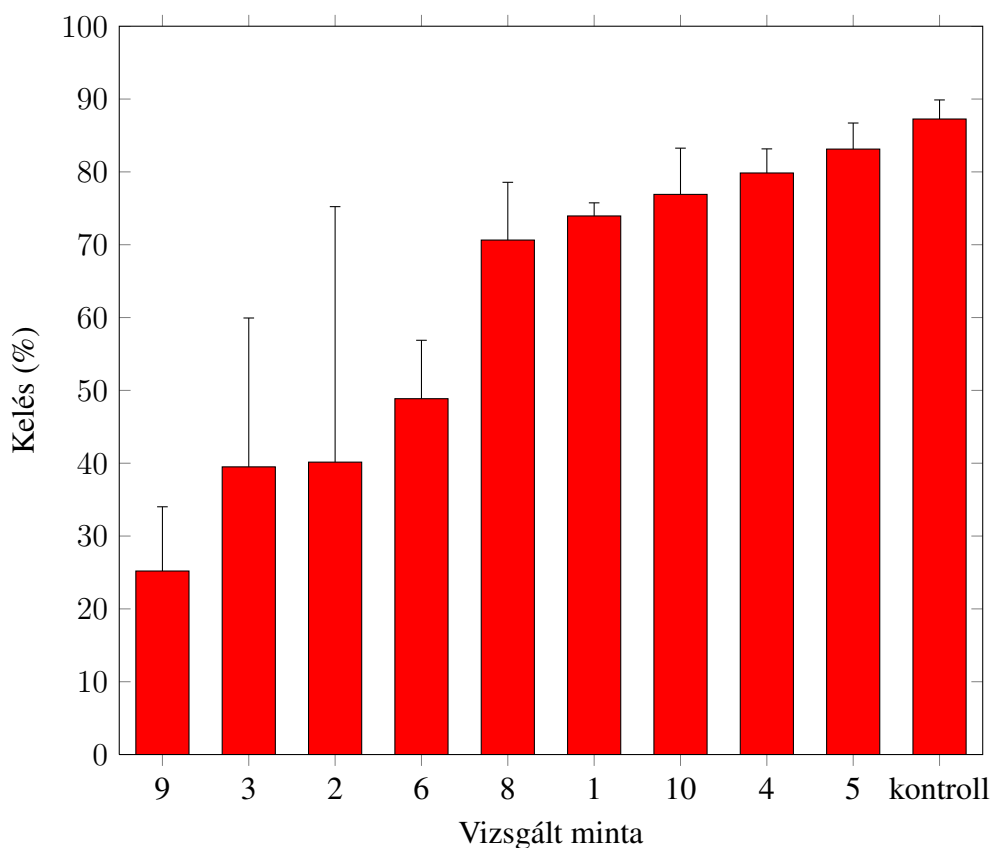
A mintavétel során 10 a Tolminka folyóból származó és 1 pisztrángtelepi kontroll egyed spermamintáját választottuk be a kutatásba. A termékenyülési vizsgálatokhoz 3 pisztrángtelepi nőstény ikráját fejtük le. A mélyhűtés előtti motilitás vizsgálata során csak a 70%-ot elért mintákat választottuk be a kutatásba. A „7”-es minta esetében túl alacsony értéket tapasztaltunk, ezért ezt a mintát kizártuk a vizsgálatból (4.2. táblázat). A spermaminták mélyhűtés előtti és mélyhűtés utáni motilitás vizsgálatának eredménye azt mutatta továbbá, hogy a mélyhűtés után jelentősen lecsökken a sejtek mozgása.

4.2. táblázat. A márványpisztráng spermájának motilitása. A „*”-al jelölt „7”-es egyed mintáját kizártuk a vizsgálatból. A „**”-al jelölt „11” kontroll egyed mintáját nem mélyhűtöttük.

Vizsgált egyed spermamintájának azonosítója	Mélyhűtés előtti motilitás (%)	Mélyhűtés utáni motilitás (%)
1	80	18
2	90	4
3	90	4
4	90	15
5	80	25
6	90	5
7*	50	nincs adat
8	90	10
9	80	6
10	90	8
11**	70	nincs adat

4.2.2. Az egyedi hatás és a mélyhűtés utáni termékenyülés vizsgálata

A termékenyülési vizsgálat során a kelési eredmények azt mutatták, hogy a várakozásoknak megfelelően, a Tolminka folyóból származó minták termékenyítő-képessége a mélyhűtés után jelentős változatosságot mutatott (4.2. ábra). A mélyhűtött minták közel felénél jelentősen alacsonyabb termékenyülési arányt tapasztaltunk a nem mélyhűtött kontroll mintához képest. A mélyhűtött minták másik felénél viszont magas értékeket mértünk. Ebben az esetben az eredmények nem tértek el drasztikusan a kontrolltól. A „4”-es és „5”-ös minta esetében a kontroll mintával (87%) közel azonos értékeket mértünk (79 és 83%).



4.2. ábra. A márványpisztráng mélyhűtött spermájával kapott kelési eredmények

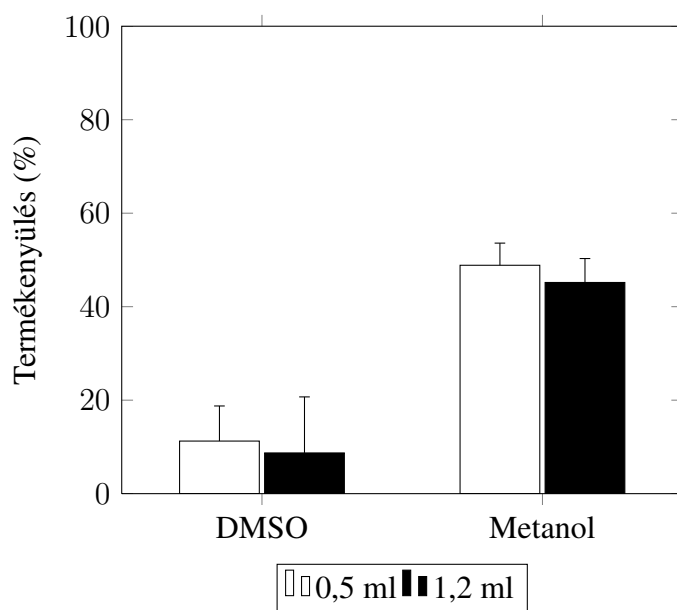
4.3. A pénzes pér fajban kapott eredmények

4.3.1. A kísérleti munka eredményei

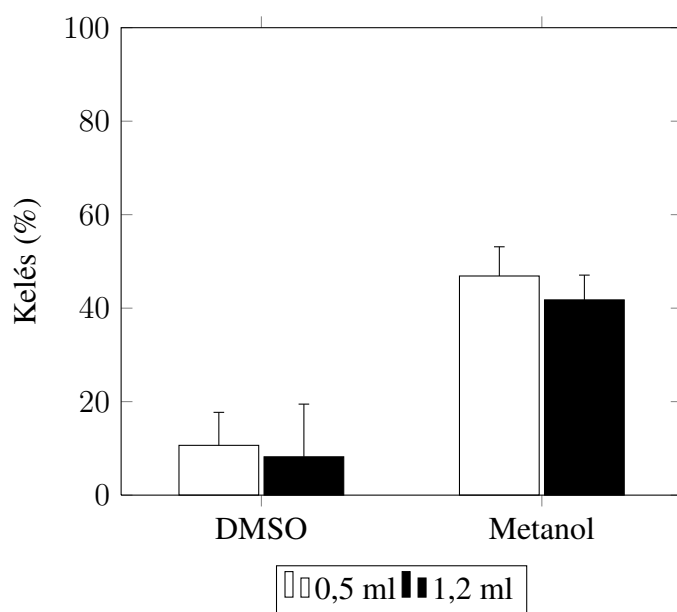
A pénzes pér spermájával végzett kísérletek során a legmagasabb termékenyülést szempontos stádiumban ($49 \pm 5\%$) és kelési arányt ($47 \pm 6\%$) metanol védőanyag és 0,5 ml-es műszalmák használata mellett kaptuk. Az eredmények statisztikai értékelése azt mutatta, hogy a védőanyag típusának statisztikailag szignifikáns hatása volt mind a szempontos stádiumban számolt termékenyülési ($p < 0,0001$) mind a kelési ($p < 0,0001$) eredményekre. A műszalma mérete ezzel szemben nem gyakorolt jelentős hatást a fent említett eredményekre (4.3. és 4.4. ábrák).

4.3.2. A keltetőházi alkalmazás eredményei

Az úszóminták genetikai vizsgálata alapján a Gljun és Učja folyókból begyűjtött 20 egyed közül 4-ben volt magasabb az adriai pérre jellemző markerek aránya 95%-nál. A mélyhűtött, majd felolvasztott spermával 4 alkalommal végeztek termékenyítést a Tolmini Horgász Egyesület munkatársai. Összesen 19 354 ikrát termékenyítettek meg a mélyhűtött spermával, amelyből



4.3. ábra. A pénzes pér mélyhűtött spermájával kapott termékenyülési eredmények. A vizsgálatokat metanol és dimetilszulfoxid (DMSO) védőanyagok jelenlétében végeztük 0,5 és 1,2 ml térfogatú műszalmákban mélyhűtve a spermát (N = 4, kontroll termékenyülés: $42 \pm 1\%$).



4.4. ábra. A pénzes pér mélyhűtött spermájával kapott kelési eredmények. A vizsgálatokat metanol és dimetilszulfoxid (DMSO) védőanyagok jelenlétében végeztük 0,5 és 1,2 ml térfogatú műszalmákban mélyhűtve a spermát (N = 4, kontroll termékenyülés: $41 \pm 1\%$).

15 627 jutott el szempontos stádiumba, azaz a termékenyítés sikere 81%-os volt (4.3. táblázat). A keltetőházi szaporítás során felhasznált mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kikelt

4. Eredmények

egyedeket a Tolmini Horgász Egyesület jelenleg a saját pisztrángtelepén neveli részben telepítés, részben tenyészállomány utánpótlás céljából.

4.3. táblázat. A pénzes pér mélyhűtött spermájával kapott keltetőházi termékenyítés eredményei.

Fejés időpontja	Termékenyített ikra	Termékenyült ikra	Termékenyülés (%)
2011.04.18	5167	4147	80,3
2011.04.22	5101	3662	71,8
2011.04.29	5447	4975	91,3
2011.05.06	3639	2843	78,1
Összesen	19 354	15 627	80,7

5. fejezet

Értékelés és következtetések

A sebes pisztráng (*Salmo trutta fario*) vizsgálata során az egyensúlyi mélyhűtés utáni termékenyülésre gyakorolt hatásáról nem sikerült egyértelmű képet kapnunk. A kutatás során tanulmányozott 3 egyed mintája 3 féle módon reagált a kezelésekre. Statisztikailag nehezen értelmezhető eredményt kaptunk, melynek több oka is lehet. Úgy tűnik, hogy ilyen formában az egyensúlyi nem vizsgálható reprezentatív, hiszen számos tényező (biológiai, kémiai, módszertani) befolyásolhatja még a mélyhűtés utáni termékenyülést. A mi esetünkben valószínűleg a mintavétel során történő szennyeződés okozta a torzított eredményt, illetve a kontrollhoz képest jóval alacsonyabb termékenyülést (Horváth 2001). A minta vizelettel való keveredése a spermiumok degradációját és aktiválását okozhatja (Poupard et al., 1998). A fejés közben nem tudtunk katétert alkalmazni, mert a szegfűszegolaj nem kábította el teljesen az így hevesen csapkodó halakat. A sperma valószínűleg vízzel, vérrel, vizelettel vagy bélsárral keveredett. Glogowski és munkatársai 2000-es vizsgálatuk során a katéteres fejés hatását vizsgálták a mélyhűtés utáni termékenyülésre nézve. Kutatásuk során 25 szivárványos pisztrángtól (*Oncorhynchus mykiss*) vettek sikeresen mintát. Fontos megjegyezni, hogy bár a katéter megakadályozza a sperma kontaminációját a fejés során, az első pár csepp mintát akkor sem szabad felvenni, mert az urogenitális papillánál maradhatnak vissza vizelet cseppek, melyek így keveredhetnek a spermiumokkal. A motilitás vizsgálat már igazolta a katéter hasznosságát, hiszen 90% körüli átlagértéket mértek a minták esetében. A mélyhűtés során a pellet módszert alkalmazták. A termékenyülési eredmények igazolták a katéter használatát, mivel esetükben közel 82%-os átlagértéket mértek. Az egyensúlyi vizsgálata során tehát ki kell zárnunk a minta szennyeződésének lehetőségét, így tisztább képet kaphatunk a termékenyülésre gyakorolt valós hatással kapcsolatban. A mintavétel során tesztelnünk kell más altató anyagokat, hogy a vizsgált halak megfelelő mértékben legyenek elbódítva.

A márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) spermamélyhűtésének vizsgálata során a faj megmentéséhez elengedhetetlen információkat gyűjtöttünk. A Horváth és munkatársai által 2009-ben publikált és több évig tesztelt hűtési eljárást sikeresen alkalmaztuk. Bár a mélyhűtés utáni termékenyítő képesség vizsgálata során fedeztünk fel különbségeket, sok egyed esetében a kontrollhoz hasonló kiváló eredményt tapasztaltunk. Összességében elmondhatjuk, hogy az itt tesztelt módszer készen áll a gyakorlati alkalmazásra. A módszer hasznosítható a Tolmini Horgász Egyesület számára, a faj megmentésére irányuló munkálatokban. A folyamat lényege, hogy a megmaradt 7 fajtisza márványpisztráng populáció segítségével felszaporítsák az egyedszámot,

és új populációkat hozzanak létre. A horgászegyesület a 7 fajtiszta populációból begyűjtött egyedekből *ex situ* élő génbankot tart fenn pisztránglepén. Ennek oka, hogy ezeket a populációkat természetes élőhelyükön folyamatosan földrengések, árvizek, földcsuszamlások veszélyeztetik, amelyek könnyen járhatnak azok teljes kipusztulásával. Az eredetileg 8 fajtiszta állományból egy (Predelica) az említett okok miatt pusztult ki. Ennek érdekében a Tolmini Horgász Egyesület kettős stratégiát folytat, amiben nagy szerep jut a mélyhűtött génbanknak. Egyrészt a saját pisztránglepén fenntartott állományok ikráit vadon begyűjtött tejesek mélyhűtött spermájával termékenyíti, így növelve a telepen fenntartott állomány heterozigotizását. A vadon befogott tejeseket a spermájuk lefejeése után visszajuttatják eredeti élőhelyükre, ráadásul a spermát még az ívási időszak elején fejk le, hogy ezek az egyedek részt tudjanak venni a szaporodásban. Másrészt a telepen fenntartott állományok felszaporításával az eredeti populációkat mintegy „megduplázzák”. Elektromos halászgéppel halmentesítenek olyan patakokat, amelyek korábban hibrid állományok nevelőegységeiként működtek, ugyanakkor eléggé izoláltak ahhoz, hogy fajtiszta állományokat fenn tudjanak tartani. Később az így halmentessé tett patakokba a 7 fajtiszta populációból helyeznek ki állományokat, természetesen a pisztránglepen nevelt *ex situ* élő génbank egyedeiből. Ilyen módon a spermamélyhűtés egyszerre járul hozzá a telepen tartott állományok genetikai változatosságának fenntartásához és az új populációk létrehozásához (Jesenšek szóbeli közlés). Horváth és munkatársai már 2008-ban génbankot állítottak elő a Zadlaščicai populációból, illetve a 2011. évi munkát képezte a legveszélyeztetettebb populáció, a Huda Grapa patak állományából származó hímek spermájának a mélyhűtése.

A fent leírtak mellett a mélyhűtött sperma segítségével az ívási időszakban megkönnyíthető a pisztránglepi halszaporítás. A hímek esetében ugyanis időben hamarabb kezdődik meg a sperma termelése, mint a nőstényeknél az ikratermelés. Az ívási időszak során a megtermelt sperma mennyisége és minősége csökkenhet az idő előrehaladtával. Az aszinkron érési folyamat ellenére, a mélyhűtés segítségével a hímek bármely időpontjában ért spermiumát felhasználhatjuk a termékenyítéshez. Az eljárás segítségével továbbá ívási időszak végén is elegendő spermánk lesz az ikrák megtermékenyítéséhez.

A pénzes pér fajban folytatott vizsgálataink során megbízható, jól működő protokolt tudtunk kialakítani a mélyhűtés technikájára, mely során a védőanyagok hatékonyságát és a műszalmák helyes méretének megtalálására törekedtünk. A kísérlet sikeresnek bizonyult hiszen a kidolgozott technológia felhasználásával jelenleg is 15000 pér ivadékot nevelnek Tolminban.

Kutatásunk során nem csak a megfelelő technika elsajátítása volt fontos számunkra, hanem az is, hogy a jelenleg is intenzíven működő pisztránglepen genetikailag is frissítsük a meglévő állományt vadon fogott halak ivartermékével. Mindenképp figyelembe kell venni, hogy csakis olyan egyedeket használtunk továbbtenyésztésre melyekben az adriai markerek aránya igen magas volt. A helyszínen, ahol a halakat gyűjtöttük jelentős genetikai változatossággal és sokszínűséggel rendelkezik, ami lehetővé teszi, hogy szaporításhoz ne csak a tenyészállomány meglévő egyedeit használjuk fel, hanem vad egyedek ivartermékeit is, ezzel biztosítva a fajtiszta továbbtenyésztést és elkerülve a beltenyésztettséget. A Soča vízgyűjtő területe stabil pér állománnyal rendelkezik, de mindenképp fontos, hogy elkerüljük a jövőbeni hibridizációt a más vízgyűjtő területekről betelepített pénzes pérrel. Jelentős hangsúlyt kell fektetni a vad egyedek genetikai profiljának a vizsgálatára, valamint népszerűsíteni kell a halat a horgászok körében.

A keltetőházi szaporítás a spermamélyhűtés egy a szokásostól eltérő alkalmazási lehetőségre mutatott példát. Az általános mélyhűtött génbanki munka a minták hosszú távú tárolását

célozza meg, határozott termékenyítési időpontok nélkül. A munkánkban bemutatott példában azonban, a sperma mélyhűtéses tárolására viszonylag rövid ideig, kb. egy hónapig volt szükség, amíg a genetikai vizsgálatok eredményei lehetővé nem tették a termékenyítést. Az ilyen, meghatározott célú mélyhűtés és tárolás elősegítheti a mélyhűtött halsperma üzleti célú felhasználását.

6. fejezet

Összefoglalás

Kutatásunk során a nagy gazdasági jelentőséggel bíró sebes pisztráng (*Salmo trutta fario*), valamint a Szlovéniában endemikus, mára már csak kevés fajtiszta populációval rendelkező márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) és az introgresszív hibridizációval terhelt adriai pénz-pér (*Thymallus thymallus*) spermamélyhűtésével foglalkoztunk. A sebes pisztráng esetében arra kerestük a választ, hogy a különböző egyensúlyi idők miként befolyásolják a mélyhűtött majd felolvasztott spermával történő termékenyülés esélyét. A sperma mintavételét, mélyhűtését, valamint a termékenyítést a Bükk hegységben található Lillafüredi Pisztrángtelepen végeztük el. A márványpisztránggal folytatott kísérlet során az egyedi tulajdonságok hatását vizsgáltuk a mélyhűtött majd felolvasztott sperma termékenyítő képességére nézve. A sperma mintavételt, mélyhűtését, és a termékenyítést a szlovéniai Tolmin városában található Tolmini Horgász Egyesület pisztrángtelepén, valamint a Soča és Tolminka folyókon végeztük. A pénz-péren végzett vizsgálataink célja a különböző mélyhűtési módszerek sikeres használatának összehasonlítása, illetve a mélyhűtés gyakorlati alkalmazása volt. A munkához a halakat a szlovén Gljun és Učja folyókból gyűjtöttük be.

A sebes pisztránggal elvégzett vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a termékenyülési arány az összes minta esetében, messze elmaradt a nem mélyhűtött kontroll csoportokhoz képest. Az egyensúlyi idők különbözősége döntően nem befolyásolta a spermiumok termékenyítő képességét. A különböző egyedektől származó sperma minták termékenyítő képessége viszont jelentősen eltért egymástól. A márványpisztráng esetében az eredmények azt mutatták, hogy egyes Tolminka folyóból származó mélyhűtött sperma minták, a pisztrángtelepi kontrollhoz hasonlóan magas termékenyülési arányt értek el. A többi Tolminkából származó spermaminta termékenyítő képessége viszont messze elmaradt a kontrollhoz képest. Nagy egyedi különbséget tapasztaltunk a különböző mintákkal történő termékenyítés során, a termékenyülési arány tekintetében.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a sebes pisztráng esetében az egyensúlyi idő hatása elhanyagolható volt a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére nézve. A márványpisztráng esetében a kifejlesztett módszer a szaporítás során jól alkalmazható, ám az egyedi különbségek miatt ügyelni kell a mélyhűtést megelőző munkálatokra.

A pénz-pér spermájának mélyhűtése során két védőanyagot teszteltünk, a DMSO-t valamint a metanolt. Az eredmények kiértékelés alapján megállapíthatjuk, hogy a védőanyag megválasztása nagyban befolyásolhatja a termékenyülés eredményességét a kontrollhoz képest.

6. Összefoglalás

A pénzes pér mélyhűtött spermáját felhasználtuk fajmegőrzési célokra is. A vadon begyűjtött egyedek spermáját annak genetikai vizsgálata után használtuk fel üzemi szintű termékenyítésre, amelynek eredményeként a Tolmini Horgász Egyesület jelenleg is közel 15 000 mélyhűtött spermából származó périvadékot nevel tenyészállomány utánpótlás céljából.

7. fejezet

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük témavezetőinknek, Dr. Horváth Ákosnak és Kotrik Lászlónak, hogy szakértelmükkel és munkájukkal segítségünkre voltak a témaválasztás és a dolgozat megírása során. Köszönjük Lang Zsoltnak, hogy hasznos tanácsaival segítette a dolgozat statisztikai elemzésének elvégzését. Köszönettel tartozunk Görföl Tamásnak, hogy dolgozatunk szerkesztésében hasznos tanácsokkal látott el, valamint Gazsi Gyöngyinek aki mellettünk volt és segített a dolgozatunk összeállításában. Köszönetet mondunk a Tolmini Horgász Egyesületnek, és a Lillafüredi Pisztrángtelepnek a mintavételezés és a keltetés során nyújtott segítségükért. A dolgozat az TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen” című pályázat támogatásával valósult meg.

8. fejezet

Irodalomjegyzék

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

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

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

Bernatchez L. (2001): The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*. 55: 351–379.

Bianco P. G. (1995): Mediterranean endemic freshwater fishes of Italy. *Biological Conservation*. 72: 159-170.

Billard R. (1977): Utilisation d'un système Tris-glycocolle pour tamponner le dilueur d'insemination pour truite. *Bull. Fr. Piscic.* 264: 102-112.

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

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

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

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

Crivelli A.J. (2006): *Salmo marmoratus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 25 October 2011.

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

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

Fumagalli L., Snoj A., Jesensek D., Balloux F., Jug T., Duron O., Brossier F., Crivelli A. J. Berrebi P. (2002): Extreme genetic differentiation among the remnant populations of marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Molecular Ecology*. 11: 2711-2716.

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

Guiffra E., Guyomard R. Forneris G. (1996): Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular Ecology*. 5: 207-220.

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

Hoitsy Gy. (2002): A pisztráng tenyésztése és horgászata. Saját kiadás, Miskolc, Lillafüred.

Horváth Á. (2001): Halgaméták mélyhűtési módszereinek továbbfejlesztése. Doktori (PhD) disszertáció, kézirat. Szent István Egyetem.

Horváth Á., Jesenšek D., Csorbai B., Bokor Z., Urbányi B. Ales S. (2009): Cryopreservation of sperm of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*) and the marble trout (*Salmo marmoratus*) from the Soča river in Slovenia. In: 1st Conference on Conservation Management of Balkan Freshwater Fishes. Hidrobiological Institut, Ohrid, Macedonia. p. 1.

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

IUCN Red List (2010): www.iucnredlist.org

Jesenšek D., Šumer S. (2004): Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*, Linnaeus, 1758) in the Soča river basin, Slovenia: action plan. Ribiška družina Tomin; Ente Tutela Pesca del Friuli Venezia Giulia, Udine.

Jug T., Dovč P., Pohar J. Snoj A. (2004): RAPD analysis as a tool for discriminating marble trout from hybrids (marble trout x brown trout) in the zones of hybridization. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 121: 156-162.

Jug T., Berrebi P. Snoj A. (2005): Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*. 123: 381-388.

- Kászoni Z. (2001): Hal és horgászat Erdélyben. Litexim Kft, Budapest.
- Kottelat M. Freyhof J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat Publications, Cornol, Switzerland. p.646.
- Labbé C. Maisse G. (2001): Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. *Aquaculture*. 201: 287-299.
- Lahnsteiner F., Weismann T. Patzner R. (1995): A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris*, *Coregonus sp.*). *Aquaculture Research*. 26: 801-807.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. Patzner R. (1996a): Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *The Progressive Fish-Culturist*. 58: 149-159.
- Lahnsteiner F., Weismann T. Patzner R. (1996b): Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture*. 144: 265-274.
- Leary R. F., Allendorf F. W. Sage G. K. (1995): Hybridization and introgression between introduced and native fish. *American Fisheries Society Symposium*. 15: 91-101.
- Maitland S. P. (1995): The conservation of freshwater fish: past and present experience. *Biological Conservation*. 72: 259-270.
- Marić S., Simonović P. Razpet A. (2010): Genetic characterization of broodstock brown trout from Bled fish-farm, Slovenia. *Periodicum Biologorum* 112/2: 145–148.
- Martínez-Pastor F. Adams L. S. (2009): Cryobiological material and handling procedures. In: Cabrita E., Robles V. Herráez P. (eds.). *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 295-319.
- Mazur P. (1977): Slow-freezing injury in mammalian cells. In: *The Freezing of Mammalian Embryos*. Ciba Foundation Symposium, London, England, 52: 42-49.
- Ott G. A. Horton F. H. (1971): Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryo-preserved sperm. *Journal Fisheries Research Board of Canada*. 28: 1915-1918.
- Pintér K. (1992): Magyarország Halai. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Povž M. (1995): Status of the freshwater fishes in the adriatic catchment of Slovenia. *Biological Conservation*. 72: 171-177.
- Povž M., Jesensek D., Berrebi P., Crivelli A. J. (1996a): The marble trout, *Salmo trutta marmoratus*, Cuvier 1817 in the Soča river basin, Slovenia. La Tour da Valat Publication, La Sambuc, France.
- Povž M., Jesenšek D., Berrebi P. Crivelli A. J. (1996b): The marble trout in the Soca river (Slovenia), an action plan. Tour du Valat Publication, Arles, France, p. 65.
- Poupard P. G., Paxion C., Cosson J., Jeulin C., Fierville F. Billard R. (1998): Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*. 160: 317-328.

Rall W. F. (1981): The role of intercellular ice in the slow warming injury of mouse embryos. In: Zeilmaker H. G. (ed.). *Frozen Storage of Laboratory Animals*. Gustav, Fisher Verlag, New York, New York, USA, pp. 33-44.

Riede K. (2004): Global register of migratory species from global to regional scales. In: Final Report of the RD-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. p. 329.

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

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

Stein H. Bayrle H. (1978): Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18: 1073-1076.

Stoss J. (1983): Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar W. S., Randall D. J. Donaldson E. M. (eds.). *Fish Physiology*. Academic Press, New York, New York, USA, 9: 305.

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

Stoss J. Holtz W. (1983): Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*. 31: 269-274.

Sušnik S., Snoj A. Dovč P. (2001): Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 74: 375–385.

Sušnik S., Berrebi P., Dovč P., Hansen M. M., Snoj A. (2004): Genetic introgression between wild and stocked salmonids and the prospects for using molecular markers in population rehabilitation: the case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus* L. 1785). *Heredity*. 93: 273–282.

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

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