



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2022. november 23.

A FEJES DOMOLYKÓ (*Squalius cephalus*) SPERMAMÉLYHŰTÉSI TECHNOLÓGIÁJÁNAK GYAKORLATI SZEMPONTÚ FEJLESZTÉSE

Practical development of sperm cryopreservation technology in chub (*Squalius cephalus*)

Készítette: Csókás Endre
C1V3AE
Takarmányozási és takarmánybiztonsági mérnöki
mesterképzés
Nappali tagozat
Szent István Campus

Témavezetők: Nagy Borbála, PhD hallgató, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Bernáth Gergely, tudományos főmunkatárs,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Bokor Zoltán, tudományos főmunkatárs,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Lehetséges OTDK- szekció: Agrártudományi szekció

**Gödöllő
2022.**

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	4
1.1.	Célkitűzések	5
2.	Irodalmi áttekintés	6
2.1.	A domolykó faj bemutatása.....	6
2.1.1.	Jelentőség és hasznosítás	6
2.1.2.	Rendszertan	6
2.1.3.	Környezeti igények.....	6
2.1.4.	Elterjedés, élőhely.....	7
2.1.5.	Testfelépítés.....	8
2.1.6.	Táplálkozás	8
2.1.7.	Szaporodás és indukált szaporítás	8
2.2.	A halsperma minősítése- és mélyhűtése	10
2.2.1.	A spermamotilitás és vizsgálata.....	10
2.2.2.	A spermamélyhűtés elméleti alapja.....	11
2.2.3.	Különböző fagyasztási módszerek bemutatása.....	12
2.2.4.	A mélyhűtött sperma tárolása és felolvasztása	13
2.2.5.	A spermamélyhűtés jelentősége horgászati szempontból	13
2.2.6.	A spermamélyhűtés eddig elért eredményei horgászati szempontból jelentős pontyfélékben	14
3.	Anyagok és módszerek	15
3.1.	Kísérleti állomány tartása és kezelése.....	15
3.2.	Altatás és fejés.....	16
3.3.	Spermamotilitás vizsgálat.....	17
3.4.	Sperma mélyhűtés és felolvasztás	17
3.5.	Szaporítás.....	18
3.6.	Elvégzett kísérletek	19

3.6.1.	Két különböző hormonkészítmény hatékonyságának vizsgálata	19
3.6.2.	A 4 ml-es kriocső, valamint az 5 ml-es műszalma összehasonlítása a fagyasztás során	19
3.6.3.	Két különböző fagyasztási módszer összehasonlítása a szaporítás során	19
3.6.4.	Friss és mélyhűtött sperma összehasonlítása szaporítás során	20
3.7.	Adatok elemzése	20
4.	Eredmények és értékelésük	21
4.1.	Két különböző hormonkészítmény hatékonyságának vizsgálata	21
4.2.	A 4 ml-es kriocső, valamint az 5 ml-es műszalma összehasonlítása a fagyasztás során	22
4.3.	Két különböző fagyasztási módszer összehasonlítása a szaporítás során	23
4.4.	Friss és mélyhűtött sperma összehasonlítása szaporítás során	24
5.	Következtetések és javaslatok.....	26
5.1.	Következtetések	26
5.2.	Javaslatok.....	27
6.	Összefoglalás.....	28
7.	Köszönetnyilvánítás.....	29
8.	Irodalomjegyzék.....	30

1. Bevezetés

A fejes domolykó (*Squalius cephalus*) hazánkban egy igen elterjedt őshonos pontyféle, közvetlen gazdasági haszna nem mondható jelentősnek, azonban a magyar horgászok kedvelt sporthala, mivel horgászata nagy népszerűségnek örvend. Horgászati értéke miatt a domolykó mesterséges szaporítására, illetve ivadéknevelésére egyre nagyobb igény van (Bartucz et al. 2020). Szinte minden hazai folyóban, patakban előfordul. Bár szereti a magas oxigén tartalmú vizeket, jól alkalmazkodik kedvezőtlen körülményekhez is (Harka & Sallai 2004). A domolykó magyarországi állománya stabil, azonban monitoring vizsgálatok alapján egyes emberi hatások (pl.: mederszabályozás) következtében jelenléte csökkenő tendenciát mutat számos domb- és síkvidéki vízfolyásban (Weiperth et al. 2021). Az állományok fenntartása és stabilizációja érdekében fontos a génmegőrzés, ebben nagy szerepe van a spermamélyhűtésnek. A mélyhűtés által az élő sejtek és szövetek évekig megőrizhetővé és tárolhatóvá válnak. A sperma minősége rendkívül fontos szempont. Nagy előnye, hogy bármikor felolvasztható és termékenyítésre felhasználható (Horváth 2018). Nagy mennyiségű ikra termékenyítéséhez, precízen adagolható az ellenőrzött minőségű hímivartermék. Ebből kifolyólag, ivási időszaktól függetlenül használható a szaporítóanyag, mely kiváló fitnessű tejesektől származik (Bernáth 2016). A jelenleg érvényes halászati törvény (2013. évi CII. törvény a halgazdálkodásról és a hal védelméről, 74§ (8): Kereskedelmi célú halászati engedély a 2016-os naptári évre, valamint az azt követő naptári évekre nem adható ki.) betiltotta a természetes vizeken a kereskedelmi halászatot 2016.01-től. Azonban a horgászat miatt az őshonos halak állományának pótlása egy megoldandó feladat. Ennél az oknál fogva a fejes domolykó szaporítási, nevelési technológiáját az utóbbi években ki kellett dolgozni, viszont a hatékonyságát még növelni kell. Ennek egyik eszköze a genetikai tartalékok megőrzésén túl a spermamélyhűtés. A pontyfélék hímivartermékének fagyasztása nagy múltra tekint vissza, a jövőben is jelentős szerep hárul a módszerre a természetes vízi populációk növelése és gazdasági haszna miatt. Ennek ellenére mégis kevés publikációval találkozhatunk napjainkban a témával kapcsolatosan a domolykó fajban (Bernáth et al. 2021). Munkám célja a spermamélyhűtés gyakorlati szempontú fejlesztése volt domolykó esetében, továbbá az eljárás során az egyedek örökítőanyagának hatékony és szelektív tárolása. Ezen vizsgálatok eredményei hozzájárulhatnak a termelő szervezetek esetében a nagymennyiségű mélyhűtött hímivartermék megfelelő felhasználásához. A kifejlesztett módszerek jövőbeni alkalmazása elősegítheti a génmegőrzési törekvéseket, valamint a faj természetes populációinak fenntartását.

1.1. Célkitűzések

Munkámban a következő célokat tűztem ki:

1. Kétféle hormonkészítmény hatékonyságának vizsgálata a fejes domolykó esetén.
2. A 4 ml-es kriocső, valamint az 5 ml-es műszalma összehasonlítása a fagyasztás során.
3. Két különböző fagyasztási módszer összehasonlítása a szaporítás során.
4. A friss és mélyhűtött sperma összehasonlítása a fejes domolykó szaporítás során.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A domolykó faj bemutatása

2.1.1. Jelentőség és hasznosítás

Annak ellenére, hogy az egyik leggyakoribb és viszonylag nagyra növő pontyféléről van szó, igen kevés információ és adat áll rendelkezésre a hazai halászati hasznosításáról. Ennek oka, hogy a halászatban, a fogások során nem különítik el a fogott egyedek mennyiségét más keszegfajokétól. A horgászatban közkedveltsége egyre nő, mivel a pergető és legyező horgászoknak igazi kihívás a megbecserkészése, megfogása. (Weiperth et al. 2021). Horgászati sportértéke meghaladja a gasztronómiai jelentőségét, bár a húsa puha, igen szálkás ez pedig a fogyasztók számára egy jelentős ellenérv (Harka & Sallai 2004).

2.1.2. Rendszertan

Ország: *Animalia* – Állatok

Törzs: *Chordata* – Gerinchúrosok

Altörzs: *Vertebrata* – Gerincesek

Osztály: *Actinopterygii* – Sugarasúszójú halak

Alosztály: *Neopterygii* – Újúszejűak

Tagozat: *Teleostei* – Valódi csontoshalak

Rend: *Cypriniformes* – Pontyalakúak

Család: *Cyprinida* – Pontyfélék

Alcsalád: *Leuciscinae*

Nemzetség: *Squalius*

Faj: *Squalius cephalus* – domolykó (Linnaeus 1758) (Pintér 2015)

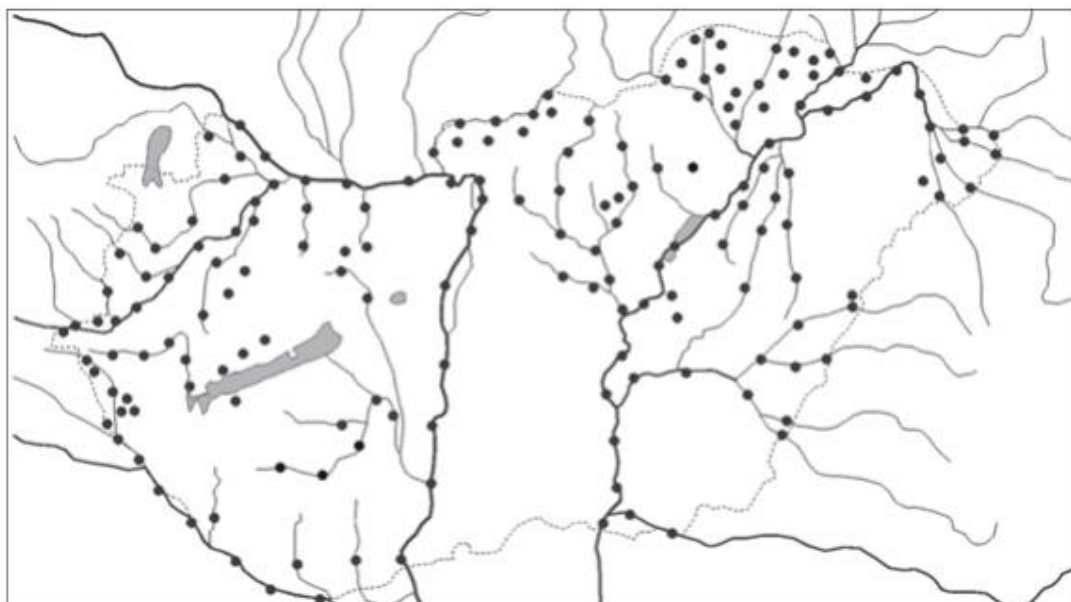
2.1.3. Környezeti igények

A domolykó egy áramlást kedvelő, folyóvízi hal. Ökológiai igényét tekintve a tiszta, magas oxigéntartalmú vizet részesíti előnyben, de jellemző rá, hogy alkalmazkodik egyéb körülményekhez (pl. oxigénben szegényebb vizekhez, bányatavakhoz) (Pintér 2002). Jól tűri a brakkvizet, melynek a sótartalma nagyobb, mint az édesvízé, de kisebb, mint a tengervízé. Annak ellenére, hogy korábban fő állományalkotó faj volt, némely patakban a nagymértékben kitett urbanizációs hatások okán napjainkra teljesen eltűnt (Weiperth et al. 2021). Kis folyók esetében megkülönböztethető domolykó, illetve sügér szinttáj. Előbbire jellemző, hogy kemény a meder, általában durva homok, márga, kavics, vagy kemény anyag alkotja. Ezen szinttáj

oxigéntartalma és hőmérséklete széles határok közt mozog. A fenékjáró küllő (*Gobio gobio*), illetve a kövicsík (*Barbatula barbatula*) mellett gyakori hala a domolykó is, de sujtásos küsszel (*Alburnoides bipunctatus*) is találkozhatunk ebben a zónában. Ezek a környezeti viszonyok jellemzik a középhegységi patakok jelentős részét (Hegyi et al. 2021).

2.1.4. Elterjedés, élőhely

A fejes domolykó áramlás kedvelő (rheofil) faj, ezért a pisztrángszinttájban a leggyakrabban előforduló pontyféle, de a pér, paduc, és a márnázónában is találkozhatunk vele. Szerepe fontos a hegyvidéki tározók halállományában is. Elterjedési területe Európa és Kis-Ázsia, azonban a Skandináv-félsziget északi részeiről hiányzik. Korábbi ismereteink szerint Írországban sem volt fellelhető, azonban friss kutatások szerint mára ott is megjelent (Caffrey et al. 2008). Előfordulásának keleti határa a Volga, az Ural és a Don folyó. Európa déli részén több alfajt is leírtak. Közép-Olaszország, Albánia és Dalmácia területén a *Squalius cephalus albus*, Dél-Franciaországban és Észak-Olaszországban a *S. c. cabeda*, a Sztruma, Marica és Meszta folyókban a *S. c. macedonicus*, Spanyolországban a *S. c. pyrenaicus*, valamint Macedóniában és a Vardar folyóban a *S. c. vardarensis* lelhető fel. Magyarországon szinte minden patakban, csatornában, folyóban és sok tiszta vizű állóvízben is megtalálható volt (1. ábra) (Harka & Sallai 2004; Pintér 2015).



1. ábra. A domolykó (*Leuciscus cephalus*) elterjedése Magyarországon. A pontok az állományfelmérő halászatok és a horgászati fogási adatok alapján rögzített domolykófogásokat jelölik (Forrás: Harka és Sallai 2004).

Természetesvízi állományai sok helyen megfogyatkoztak, ennek oka a túlhasznosítás, az ívóhelyek eltűnése, valamint a vízszennyezés. Jó az alkalmazkodóképessége kedvezőtlen

körülmények között is. A márna szinttájhoz tartozó nagyobb patakokban, folyókban is kiválóan érzi magát (Harka és Sallai 2004).

2.1.5. Testfelépítés

A fejes domolykó tetemes méretűre megnőhet, súlya két kilogrammnál is több lehet, illetve a 40-60 cm hosszúságot is elérheti (Kottelat & Freyhof 2007). Teste áramvonalas, orsó alakú, oldalról enyhén lapított. Feje viszonylag nagy, a homlok rész széles. Az írisz ezüstös, vagy sárga, megfigyelhető alul egy fekete, fent egy zöldes barna pont. Szája nagy, kissé felsőállású, csúcsba nyíló, szeglete eléri a szem vonalát. A hátúszó némileg hátrébb kezdődik, mint a hasúszó, szegélye egyenes vagy kissé domború, amelyben 8-9 lágú úszósugár található. A nyúldomolykóval összevetve ezen tulajdonság jelenti a legnagyobb különbséget a két hal között. A többi *Leuciscinae* alcsaládba tartozó fajhoz képest kevésbé bemetszett a farokúszója. Lágú úszósugarak találhatóak a farok alatti úszójában, melynek száma 7-9, szegélyük domború (Lente et al. 2021). A domolykó háta barnás-zöld, vagy fekete színű. Oldala aranyos, vagy ezüstös csillogású, mely vízterületenként változó. A hasán található úszói halvány pirosak, vagy narancssárgák, míg a többi sötétszürke. Eltérés mutatkozik a fiatal egyedek úszójának színében, mert ekkor egységesen szürke színű mindegyik (Pintér 2002). A pikkelyére jellemző, hogy vastag, nagyméretű, szélét barnás-feketés pettyekből álló minta szegélyezi. (Lente et al. 2021).

2.1.6. Táplálkozás

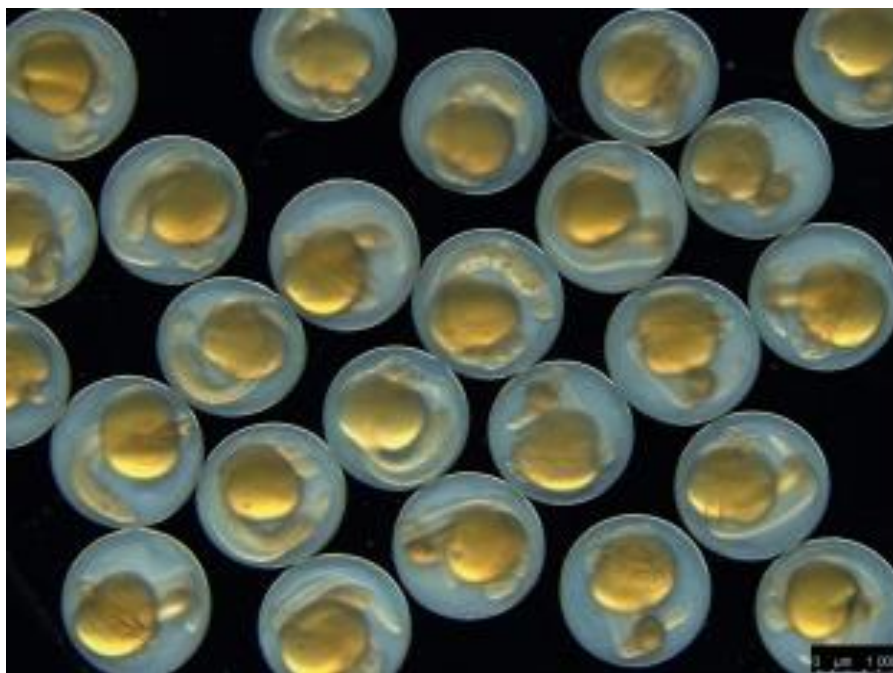
A domolykó egy falánk, mindenevő hal. Jól adaptálódik az adott táplálkozási körülményekhez. A ragadozókhoz hasonlóan minimálisan, de télen is táplálkozik (Pintér 2002). A kelést követő 3-4 napon a táplálkozás a szikzacskókból történik. Ennek felszívódását követően után különböző méretű planktont fogyaszt. A növekedés előrehaladtával fő táplálékai a bentoszban élő rovarlárvák, algák, illetve juvenilisek. A kifejlett egyedek férgeket, puhatestűeket, rákokat, víz felett repdeső vagy a vízre hulló rovarokat fogyasztanak (Mézes 2021). A felnőtt domolykó is mindenevő, hiszen táplálkozásában megmaradnak a gerinctelen állatok, a vízbe hulló magok és gyümölcsök (Kottelat & Freyhof 2007). A táplálékhálózat magasabb szintjén helyezkednek el, hiszen méretének növekedésével egyenesen arányosan, egynyarasan már halat is táplálékul ejt (Czeglédi & Erős 2013).

2.1.7. Szaporodás és indukált szaporítás

A halak szaporító szervrendszerét a gonádok és az ezekhez kapcsolódó járulékos ivarszervek alkotják. Az ikrás hasüregének két oldalán helyezkedik el a páros petefészek. Ez

vaskos zsákká formálódik, amikor a petesejtekkel telítődnek. A tejcső ivarmirigye szintén a hasüreg két oldalán elhelyezkedő here. Zsákszerűen kitelik az ivarsejtek termelődése során (Harka & Sallai 2004). A domolykó az ivarérettségét 3-4 éves korban éri el, a tejesek korábban, míg az ikrások 1-2 évvel korábban. Nászidőben a hímek feje alatt és az oldalvonala körül epidermisen elszarusodó hámkiemelkedések jelennek meg. Ez az úgynevezett dorozsma, vagy nászkiütés (Pintér 2002). Ívásuk akár négy hétig is tarthat, mely a május-júniusi időszakra esik, de előfordulhat, hogy augusztusig is kihúzódik. Mivel a litofil halfajokhoz tartoznak, ezért a folyóvizek kavicsos aljzatú mederszakaszain, sodrásban történik az ívás folyamata (Jászfalusi 1944). Az ikrának körülbelül 25-100 000 ragadós ikrája van, ami 1,3-1,5 milliméter átmérőjű (2. ábra). A folyók sekélyebb mélységű kiöntéseinek növényeire, a köves meder aljára, kavicsokra teszi le ragacsos ikráit. Az embrionális fejlődés 18-19 °C fokos vízben történik, 4-6 nap leforgása alatt. A kikelő lárvák 8-9 mm hosszúak (Kottelat & Freyhof 2007).

Habár a domolykó jelenleg még kis gazdasági jelentőséggel bír, szaporítási technológiája már kialakulóban van és a jövőben számíthatunk a nagyobb mértékű térhódítására. A pontyfélék szaporításának alapját a természetes ívóhelyen begyűjtött anyahalakból származó ikra és tej adhatja ívási időszakban. Ezen halak begyűjtése elektromos halászgéppel történik. Kizárólag az ikrát, vagy tejet folyatós hal kerülhet a partra, ilyen egyedek esetében nem szükséges hormonális indukció alkalmazása. A természetes élőhelyen (jelen esetben vízparton) történő sperma fejésével olyan stresszfaktoroktól óvjuk meg a halakat, mint a szállítás, hormonkezelés, medencés tartás. A módszer hátrányként említhető, hogy a szaporítás időpontja nem tervezhető, mivel az ívás környezeti tényezők hatására kezdődik meg. A hőmérséklet, vagy vízszint ingadozása az ívás elmaradását is eredményezheti. Az eljárás idő- és munkaigényes, a halászat megszervezése és engedélyeztetése pedig gyakran nehéz feladat. A szaporítás megkönnyítése érdekében pontyféléknél is kidolgozták a keltetőházi, indukált halszaporítás módszerét. Ennél a technikánál a hormonindukció megfelelő időzítése lehet a kulcskérdés. Egyes rheofil fajok küllemi, csak az ívási időszakban jellemző jegyekkel jelzik, hogy készen állnak a szaporodásra. Ilyen morfológiai elváltozás lehet az ikrás halakon a nászkiütés, vagy a petefészek növekedése által megduzzadt hasfal. Az ikrák kelése után az egyik legkisebb méretű lárva a domolykóé a pontyfélék közül. Zárt rendszerű lárvanevelésnél ajánlott sórákra (*Artemia salina*) alapozni a takarmányozást. Domolykó esetében kis termete miatt jelentősége van az artémia méretének is, így célszerű micro Artemiát (280.000 pete per grammal kisebb) alkalmazni. A faj előnevelése során ajánlatos 20-23 °C fokos vízhőmérsékleten való tartás (Szabó & Csorbai 2021).



2. ábra. Fejlődő domolykó embriók mikroszkópikus fotója 48 órával a termékenyítést követően. (Fotó: Csenki-Bakos Zsolt)

2.2. A halsperma minősítése- és mélyhűtése

2.2.1. A spermamotilitás és vizsgálata

A külső megtermékenyítésű fajok esetében a sperma immobilis, nyugalmi állapotban van a szeminális plazmában. A sejtek aktiválódásához fajspecifikus vizes közegre vagy aktiváló oldatra van szükség. Az aktiváló oldatok hatására ozmotikus nyomáskülönbség alakul ki a spermiumok körül. A sejtek mozgását a tengeri fajoknál az ozmolalitás növekedése, míg az édesvízi fajoknál az ozmolalitás csökkenése váltja ki (Bernáth 2016). Érdekes specifikus aktiváló oldatot használni az adott halfajra, mert az aktivációt nem minden esetben váltja ki az ozmotikus nyomáskülönbség. Egyes halfajok esetében, például a lazacféléknél (*Salmonidae*) a káliumion, a lepényhalalakúaknál (*Pleuronectiformes*) a CO₂ koncentrációjának számottevő csökkenése szükséges a sejtek mozgásához. Ügyelni kell a szennyező anyagoktól való elzártságra előaktiváció során, mivel azok ronthatják a spermiumok termékenyítő képességét. (Cosson et al. 2008). A spermiumok mozgási sebessége az aktivációt követően viszonylag nagy. Az úgynevezett CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) a legmegfelelőbb mérési módszer spermavizsgálatra. A rendszer egy speciális szoftver, valamint egy mikroszkóp segítségével kiszámolja a mozgó hímivarsejtek százalékos arányát, valamint valós idejű képet biztosít a mozgás intenzitására vonatkozóan (Cloud & Patton 2009; Bernáth 2016).

2.2.2. A spermamélyhűtés elméleti alapja

A spermamélyhűtés egy olyan biotechnológiai módszer, amely által a tejes halak genetikai örökítő anyaga hosszú távon, akár korlátlan ideig tárolható. Célja a biológiai idő megállítása, a genetikai állomány megőrzése, a fajvédelem. Szerepe fontos a haltenyésztésben. Blaxter (1953) foglalkozott először a halspermamélyhűtéstechológiájával, vizsgálataiban életképes hering spermiumokat sikerült felolvasztania (Bokor 2009). A membránáteresztő képesség, valamint a víz vándorlása a sejtek mélyhűtésének alapja. Kevésbé permeábilis a nagyobb sejt sejthártyája, ebből kifolyólag lassabban fagy meg. Ezzel szemben a kisebb sejt esetében, mely átjárhatóbb membránnal rendelkezik a víz számára, gyorsabb a fagyás. A fagyáspontot a különböző oldott anyagok mennyisége befolyásolja. A tiszta víz, ionokat nem tartalmaz, fagyáspontja 0 °C. Az állati sejtek nagy mennyiségű vizet, szénhidrátot, oldott cukrot, sót, fehérjék tartalmaznak, melyek nélkülözhetetlenek a sejt szervecskék és a sejtmembrán felépítéséhez és működéséhez. A víz részlegesen át tud hatolni a plazmamembránon, ami egy féligáteresztő hártya. Az átjutás csak a nagyobb molekulák számára jelent problémát. Az említett sejten kívüli és sejten belüli tér közötti áramlás elengedhetetlen, hiszen így biztosítja a két oldal közötti, különböző anyagok egyensúlyát (Bernáth 2016).

Időrendben az alábbi négy sejt-mélyhűtési folyamat különíthető el:

- *Első fázis:* a jégkristályok kialakulását megelőző hűtési folyamat. Nincs nagy jelentősége a mélyhűtés alakulásában a halsperma esetében, viszont fontos kritérium, hogy a sejtek folyamatos hőmérsékletingadozásnak nem tehetők ki.
- *Második fázis:* a kristályok kialakulása. A fázis során kitűzött cél, hogy a fagyáspont közelében a jégkristályok kialakulása egyenletesen jöjjön létre a hűtőmédiumban, a hőfúzió által okozott hőmérsékletváltozást minimálisra csökkentve. A sejteken kívüli közegben megkezdődik a jegesedés a sejtek és az azokat körülvevő médium lehülése által. A sejtből kiáramló víz miatt a sejt és közvetlen környezetének hőmérséklet emelkedik, a sókoncentráció a sejten belül megnő.
- *Harmadik fázis:* a minták további hűtése. Ebben a szakaszban a sejtek -10 °C-tól -40 °C-ig hűlnek. A víz sejtekből való kiáramlásához minél lassabb mértékben szükséges csökkenteni a hőmérsékletnek, azonban meg kell találni a legmegfelelőbb intervallumot, hogy a magas só koncentrációtól megvédje a sejten belüli teret, mivel itt a hőingadozásnak gyorsnak kell lennie.

- *Utolsó fázis:* a sejtek ebben a szakaszban hűlnek le a tárolás során szükséges hőmérsékletre (Cloud & Patton 2009; Bernáth 2016; Nagy 2019; Izsák 2019).

2.2.3. Különböző fagyasztási módszerek bemutatása

A halsperma mélyhűtésére többféle eljárás alkalmazható. Az első módszer a szárazjég használata, mely a többi módszerhez képest nem bír nagy költségekkel, továbbá ez a legegyszerűbb eljárás. A szárazjég szublimációs hőmérséklete $-78,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A szárazjégtömb felületén lévő mélyedésekbe a spermamintákat hígított formában cseppentik, mely úgynevezett pelleteket képez. A módszer hátránya az, hogy nem optimalizálható a hűtési sebesség. A második mélyhűtési módszer a hideg alkoholos fürdő. Ebben az esetben egy hőszigetelt tárolóegységbe folyamatosan áramoltatják az alkoholt (metanolt, etanolt vagy izopropanolt), így elérik akár a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ is. A szárazjég adagolásával szabályozzák a hűtés sebességét, melynek hátránya, hogy hirtelen buborékképződés alakulhat ki, ezáltal csökkenhet a mélyhűtés eredményessége. Az előző módszerrel összevetve ezen eljárás mondható hatékonyabbnak. A legelterjedtebb mélyhűtési technológia alapja a cseppfolyós nitrogén használata, mi szerint egy hőszigetelt edény (pl. kanniszter) folyékony nitrogént tartalmaz, amely a hűtőközeg. A spermamintákat műszalmákba, esetleg hűthető ampullákba teszik. Ezeket vagy a folyékony nitrogénbe vagy a rajta elhelyezett hűtőkeretre helyezik (3.ábra). A minta távolsága a folyékony nitrogén felszínétől befolyásolja a hűtési sebességet. Előnye továbbá, hogy gyakorlatban könnyen kivitelezhető, valamint alacsony a költségvetése. A negyedik módszer a programozható mélyhűtő berendezés használatával történik. Ez a leginkább szabályozható technika. Előre megírt számítógépes program alapján kerül a hűtőtérbe a cseppfolyós nitrogén gőze, ezáltal a hűtési sebesség optimalizálható. Előnye, hogy a fontos változók, melyek a fagyasztást befolyásolják, állandó értékekkel bírnak. Hátrányként említhető, hogy ára és üzemeltetési költsége drágább, illetve terepen kevésbé alkalmazható (Bokor 2009; Thapliyal 2011; Bernáth 2016; Nagy 2019)



3. ábra. A műszalmába töltött spermaminták folyékony nitrogénben történő mélyhűtése (Fotó: Dr. Bokor Zoltán)

2.2.4. A mélyhűtött sperma tárolása és felolvasztása

A minták elhelyezésekor nélkülözhetetlen a megfelelő jelölés, enélkül akár összekeveredhetnek a fajok és fajtisza állományok genetikai anyagai (Cloud & Patton 2009) az esetleges hosszú éveken tartó tárolás során. A tárolás tárgyi feltétele a folyékony nitrogénnel töltött kanniszteres kann, melyben gobletekbe helyezve tárolják a műszalmákat és kriocsöveket. Ebben a megfelelő hőmérséklet folyamatosan biztosított, elegendő mennyiségű nitrogéntartalom esetén. A felolvasztás vízfürdőben történik, amely hőmérséklete kb. 40 °C. A minták felolvasztás során a megfelelő sebességre, a fagyasztáshoz hasonlóan figyelni kell. A felolvasztás ideje és sebessége faj, illetve tárolóméret specifikus. Dinamikus, gyors felolvasztás szükséges a műszalmák esetében, ami 0,25 ml-s méret esetében 5 másodpercet, 0,5 ml-s esetén pedig 13 másodpercet jelent. Az olvasztás sebessége befolyásolja a sejtek életképességét. A sejtmembránban újra kristályosodás történhet, ha túl gyors az olvasztás, ami sejthalált okozhat. Lassú olvasztás esetében pedig a sejtből túl sok víz áramolhat ki, ami dehidratációt idézhet elő (Thapliyal 2011).

2.2.5. A spermamélyhűtés jelentősége horgászati szempontból

A horgászat jelentős társadalmi hatással bír, mint szabadidős tevékenység. Hazánkban körülbelül 700.000 a horgászok létszáma. A horgásztársadalom igényeinek kielégítése miatt számos kiegészítő iparág (horgászfelszerelés, etetőanyag, csalétek gyártása) fejlődése ment végbe az utóbbi évtizedekben. Az elmúlt időben megnőtt az intenzív, horgászati célra kialakított vizek száma. Ebből kifolyólag gazdasági szempontból is indokolt a halfajok folyamatos

szaporítása, telepítése. Ezen folyamattal párhuzamosan a jövőben növekvő keresletre számíthatunk a gazdaságilag jelentős halaink mélyhűtött ivarterméke iránt. A módszer lehetővé teszi az esetleges szezonon kívüli szaporítást is. A sperma mélyhűtése lehetőséget biztosít a horgászati és gazdasági szempontból is fontos halfajok génmegőrzésére (Bernáth et al. 2021).

2.2.6. A spermamélyhűtés eddig elért eredményei horgászati szempontból jelentős pontyfélékben

Az édesvízi és tengeri halfajok genetikai állományainak in vitro megőrzésének gyakran alkalmazott módszere az örökítőanyag alacsony hőmérsékleten való tárolása. Ezzel a módszerrel a minták akár több évszázadon át megőrizhetőek is lehetnek folyékony nitrogénben (Cloud & Patton 2009). Fejes domolykó, paduc és szilvaorrú keszeg fajban mindössze egy publikált eredménnyel találkozhatunk Lahnsteiner et al. (2000) kísérleteiknek keretében. Eredményeik magas motilitást mutatnak (domolykó $61\pm5\%$, paduc $49\pm13\%$ szilvaorrú keszeg $65\pm11\%$). Urbányi et al. 2011-es munkájukban a bodorka (*Rutilus rutilus*) és a karikakeszeg (*Blicca bjoerkna*) spermamotilitását vizsgálta, előbbi fajnál $77\pm6\%$ -os, még utóbbinál $63\pm2\%$ -os értéket kaptak (Bernáth et al 2021). Kevesebb vizsgálatot folytattak a többi pontyfélé spermájának mélyhűtéséről. Durbin (1982) az amur hímvartermékét $0,73\%$ NaCl, $0,75\%$ NaHCO₃ és 10% DMSO használatával hűtötte. Eredményként egy éves tárolás után 57% -os termékenyülést ért el. Zhang és Liu (1992) az amur, fekete amur és a fehér busa spermájának hűtésekor $80\text{-}92\%$ körüli termékenyülést értek el, $0,3\%$ NaCl, 6% glükóz, $0,05\%$ NaHCO₃ összetételű hígító és 10% DMSO védőanyag használatával (Urbányi 2011). Annak ellenére, hogy bár nagy múltra tekint vissza és gazdaságilag és a természetes populáció növelése érdekében is fontos lenne a pontyfélék hímvartermékének fagyasztása, napjainkban mégis kevés kutatás és publikáció jelenik meg (Bernáth et al. 2021).

3. Anyagok és módszerek

Az elvégzett vizsgálatokat a MATE-SZIC/1742-1/2022 iktatószámú „Különböző halfajok spermaminősítési és -mélyhűtési technológiájának kutatási, ökológiai, horgászati génmegőrzési és üzemi fejlesztése” című állatkísérleti igazolás jóváhagyásával hajtottuk végre (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Munkahelyi Állatjóléti Bizottság).

3.1. Kísérleti állomány tartása és kezelése

A kísérleti anyaállomány az Ipolyról származott. Befogásuk elektromos halászgéppel történt 9,55 °C-os hőmérséklet és 13,59 mg/l oxigénszint mellett. Az állomány a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetének Halgazdálkodási Tanszékére került behelyezésre, recirkulációs halnevelő rendszerbe, folyamatosan ellenőrzött körülmények mellett (4. ábra). Behelyezés előtt egy temperáló közegbe (4. ábra) raktuk a domolykókat, hogy a szállítás után akklimatizálódjanak a rendszervíz hőmérsékletéhez. Ezt követően egy rövid (nagyjából fél perces) sófürdő (2,5%-os oldatban) következett, hogy fertőtlenítsük az állományt, így elkerülve az esetleges parazita-behozatalt.



4. ábra. Tejes egység temperálást megelőzően (Fotó: Molnár József).

Az ikrások egy hálóval ellátott medencébe kerültek, a háló alá pedig a tejes egyedeket helyeztük el, így különítettük el őket ivar szerint. A halak behelyezése után 8 napot vártunk az első kezeléssel, mivel a szállítás egy jelentős stresszfaktor számukra, így fontos volt elegendő időt hagynunk, hogy megszokják az új közeget.

A behelyezett domolykók testtömegét és testhosszát (5. ábra) egyenként lemértük. Az állomány átlagos testtömege $917,13 \pm 269,56$ g, átlagos testhossza pedig $36 \pm 3,21$ cm volt a nőivarban, még a hímek esetében ugyanezen paraméterek $746,6 \pm 268,08$ g, illetve $33,1 \pm 4,25$ cm voltak.



5. ábra. A domolykó testhossz mérése (Fotó: Dr. Bokor Zoltán).

3.2. Altatás és fejés

Az oltást megelőzően a tejeseket 2-fenoxietanolt (99%, 0,4 ml/l) tartalmazó vízben bódítottuk, majd nedvesített törölközőre helyeztük. A spermáció indukálásához a vizsgálatától függően hipofízis vagy Ovopel tartalmú kezelést alkalmaztunk. A hormont fiziológiás sóoldatban (0,9% NaCl) oldottuk fel, ezt követően injekciós tűvel a halak hasúszójának tövéénél beinjektáltuk a hasüregbe, mindkét oldalról. A halak jelölését a farokúszó alsó végének kis méretű, de vizuálisan jól érzékelhető vágásával végeztük. A fejést a domolykók hasfalának hosszanti masszírozásával hajtottuk végre. (6. ábra). Az ikrásokat szintén 2-fenoxietanolban altattuk fejés és termékenyítés előtt.



6. ábra. A domolykó fejése (Fotó: Dr. Várkonyi Levente).

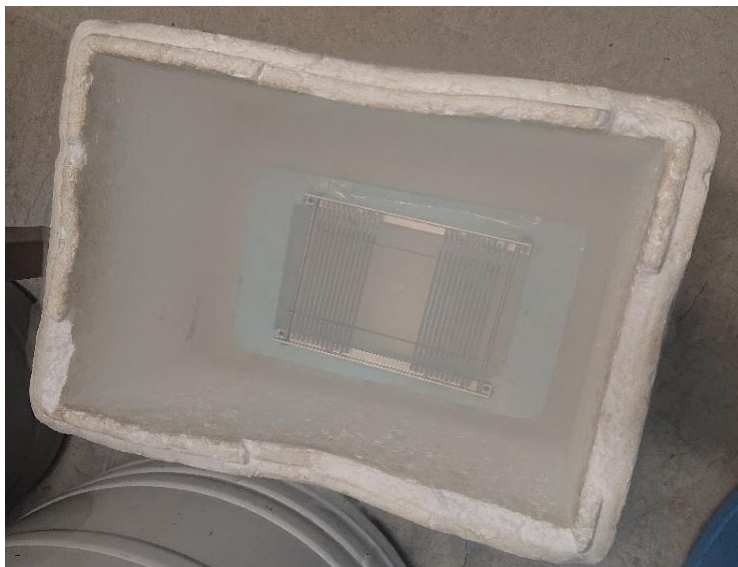
3.3. Spermamotilitás vizsgálat

A spermiumok vizsgálatát egy mikroszkóphoz kötött, számítógép által vezérelt spermavizsgáló rendszerrel végeztük (CASA, Sperm Vision™ v. 3.7.4., Minitube of America, Venture Court Verona, USA). A sejtek aktivációjához egy, a ponty fajra korábban kidolgozott (45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, pH: $8,0 \pm 0,2$; ozmolalitás: ~ 300 mmol/kg) oldatot használtunk (Saad et al. 1988) Az oldathoz 0,01 g/ml BSA-t (bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albumin) adtunk, így akadályoztuk meg a sejtek letapadását. A kísérlet a pMOT (progresszív motilitás %), VCL (curvilinear velocity-sebességre utaló paraméter, $\mu\text{m/s}$), illetve a LIN (linearity-egyenestől való eltérésre vonatkozó paraméter, %) vizsgálatára terjedt ki (Bernáth 2016).

3.4. Sperma mélyhűtés és felolvasztás

A sejtek mélyhűtéséhez egy a kutató csoportunk által korábban kidolgozott és módosított csuka hígítót alkalmaztunk (205 mM glükóz, 20 mM NaCl, 25 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH: $8,0 \pm 0,2$ (ozmolalitás: 331 mmol/kg) (Molnár et al. 2020; Várkonyi 2021). Védőanyagként 10% metanolt használtunk (Bernáth et al. 2015) A kísérletek folyamán 1:9 és 1:1 (sperma: hígító+ védőanyag) arányban hígítottuk a spermát. A mintákat (vizsgálatától függően) 0,5 és 5 ml-es műszalmába, valamint 4 ml-es kriocsövekbe töltöttük. A mélyhűtést két protokoll alapján végeztük, 3 cm-en a folyékony nitrogén gőzében, polisztirol kereten (3 és 7 perc időtartamban) (7. ábra), illetve programozható fagyasztó berendezésben (CRF-Controlled-rate Freezer,

IceCube 14s, IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria) 15 °C/perc hűtési sebességgel, 4 °C-os kiindulási és -160 °C végponti hőmérsékletre történő fagyasztással (Horváth et al. 2003; Bokor et al. 2019; Várkonyi 2021). A sperma felolvasztását 40 °C-os vízfürdőben (ThermoHaake P5, Thermo Electron Corp, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) végeztük. A 0,5 ml-es műszalmákat 13 másodpercig, az 5 ml-es műszalmákat 35 másodpercig, a 4 ml-es kriocsöveket 2 perc 15 másodpercig olvasztottuk (Bokor et al. 2007 és 2019; Várkonyi 2021).



7. ábra. Műszalmák mélyhűtése a folyékony nitrogén gőzében, polisztirol dobozban. (Fotó: Dr. Bokor Zoltán)

3.5. Szaporítás

A tapasztalatok alapján a leginkább bevált arányt alkalmaztuk keveréshez, mely a következő: 1 liter ikrához 10 ml hím ivarterméket adagolunk szárazon, amelyet összekeverés után a 100 ml termékenyítő oldattal aktiválunk (SZABÓ et al. 2000). Ezt követően az ikratételek duzzasztását, illetve ragadósságának elvételét a Woynárovich-féle oldattal vittük véghez, melynek összetétele a következő; 10 liter víz, 40 g konyhasó és 30 g karbamid (WOYNÁROVICH 1962). A tételeken célszerű a rendszeres vízcsere végrehajtása. A folyamat nagyjából 1-1,5 óráig tartott, folyamatos keverés mellett. Ezen lépést követően az ikrát csersavas oldattal rövid ideig, többször (10 liter vízbe 5 g por állagú csersavat keverünk) kezeltük és átmostuk (WOYNÁROVICH & WOYNÁROVICH 1980). A lépést követően végleg megszűnik az ikra ragadóssága. Minekutána a tételeket 7-9 literes Zuger-üvegekbe helyeztük, amelyben egészen a kelésig fejlődtek. Edényenként 1-1,5 liter duzzadt ikrát célszerű kihelyezni. Az üvegeken kezdetben enyhe vízátfolyást biztosítottak, melyet a fejlődés során fokozatosan növeltünk. Az embriogenezis 21-22 °C-on 3 napig tartott, melyet 60-70 napokban

határoznak meg (az eltelt napok száma szorozva a napi átlagos víz hőmérséklettel) (HORVÁTH & URBÁNYI 2004).

3.6. Elvégzett kísérletek

3.6.1. Két különböző hormonkészítmény hatékonyságának vizsgálata

Az első kísérlet során két különböző, a gyakorlatban alkalmazott hormonkészítménnyel (1 Ovopel golyó/testtömeg-kilogramm és 4 mg pontyhipofízis/ttmkg) történő oltást követően rögzítettük a sperma motilitását. Ezt követően 0,5 ml-es műszalmában mélyhűtöttük az ivarterméket 1:9-es hígítási arány mellett ($N=7-7$). A felolvasztást követően 6 órán át vizsgáltuk a minták motilitását és rövidtávú tárolhatóságát (4°C-on).

3.6.2. A 4 ml-es kriocső, valamint az 5 ml-es műszalma összehasonlítása a fagyasztás során

A vizsgálat során két mélyhűtési módszert eredményességét hasonlítottuk össze, ehhez 5 Ovopellel oltott tejes egyed hímivartermékét nyertük ki. A spermát 4 ml-es kriocsőbe és 5 ml-es műszalmákba töltve mélyhűtöttük polisztirol dobozban. A fagyasztáshoz módosított csuka hígítót használtunk 1:9 hígítási arányban (sperma: hígító+védőanyag). Védőanyagként 10% metanolt alkalmaztunk. A spermamintákat a fagyasztást megelőzően, valamint az olvasztást követően CASA rendszerrel vizsgáltuk.

3.6.3. Két különböző fagyasztási módszer összehasonlítása a szaporítás során

Harmadik kísérletünkben friss, és kétféle mélyhűtési módszerrel fagyasztott spermamintákkal történő szaporítást végeztünk. Az anyaállomány oltása ($N=5$ tejes; $N=1$ ikrás) Ovopel hormonkészítménnyel történt. A poolozott spermamintákat 4 ml-es kriocsővekben polisztirol dobozban és CRF-ben mélyhűtöttük, a fagyasztás során 1:9 hígítási arányt alkalmaztunk. A vizsgálat során meghatároztuk a friss, valamint a kétféle módszerrel mélyhűtött spermaminták motilitását. A szaporítást a ponty, gyakorlatban is alkalmazott hagyományos keltetőházi szaporítási protokollja alapján végeztük. Kísérletünkben 1 g ikrát termékenyítettünk meg 10 μl friss és 100 μl (1:9-es hígítási arány a mélyhűtés során) fagyasztott spermával. A spermiumok aktivációjához ponty féléknél alkalmazott aktiváló oldatot (lásd: 3.3. fejezet) alkalmaztuk (100 μl). A termékenyítés után 3 nappal, $19,4^{\circ}\text{C-os}$ víz hőmérséklet mellett, a kelés pillanatában meghatároztuk a kikelt egyedek arányát. 100 ikraszemet vettünk figyelembe a számítás során (a mintákról felvettelt készítettünk kamera segítségével). A

számításokat Image J 1.52a szoftver (Image J for Windows, National Institutes of Health, Egyesült Államok) alkalmazásával végeztem el.

3.6.4. Friss és mélyhűtött sperma összehasonlítása szaporítás során

Negyedik vizsgálatunkban szaporítási kísérletet végeztünk friss és nagy mennyiségben mélyhűtött spermával. A kísérlethez az anyaállományt ($N=5$ tejes; $N=1$ ikrás) Ovopel készítménnyel oltottuk. A spermamintákat 4 ml-es kriocsövekben polisztirol dobozban mélyhűtöttük 1:1 hígítási arány mellett. A vizsgálat során meghatároztuk a friss minták fejes utáni, valamint termékenyítés előtti, illetve a mélyhűtött, majd felolvasztott spermaminták motilitását. A szaporítás során a ponty, gyakorlatban is alkalmazott hagyományos keltetőházi szaporítási protokollja alapján dolgoztunk. Kísérletünkben 1 g ikrát termékenyítettünk meg 10 μ l friss és 20 μ l (1:1-es hígítási arány a mélyhűtés során) fagyasztott spermával. A spermiumok aktivációjához ponty féléknél alkalmazott aktiváló oldatot (lásd: 3.3. fejezet) alkalmaztuk (100 μ l). A termékenyítés után 3 nappal, 19,4 °C-os vízhőmérséklet mellett, a kelés pillanatában meghatároztuk a kikelt egyedek arányát, 100 ikraszemet vettünk figyelembe a számítás során (a mintákról felvételt készítettünk kamera segítségével). A számításokat Image J 1.52a szoftver (Image J for Windows, National Institutes of Health, Egyesült Államok) alkalmazásával végeztem el.

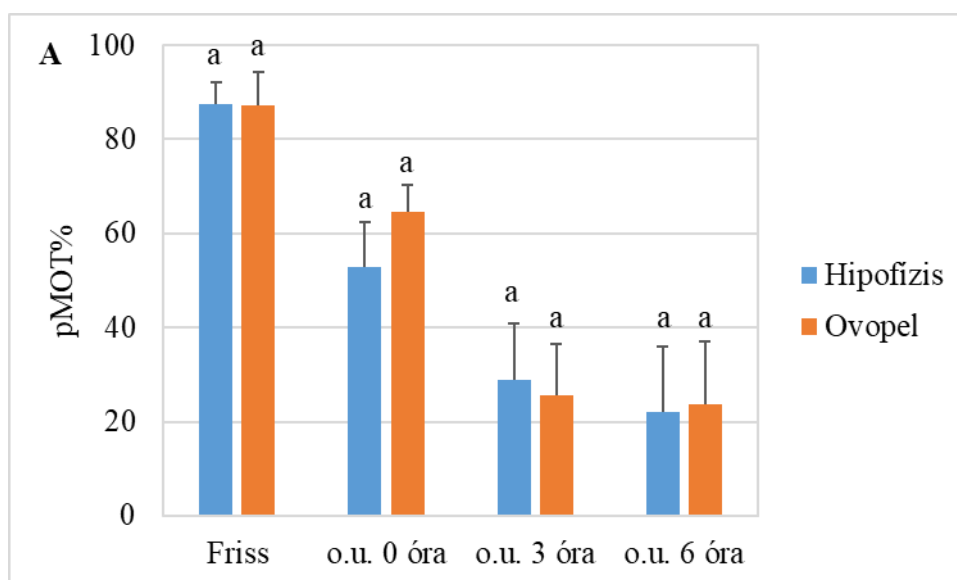
3.7. Adatok elemzése

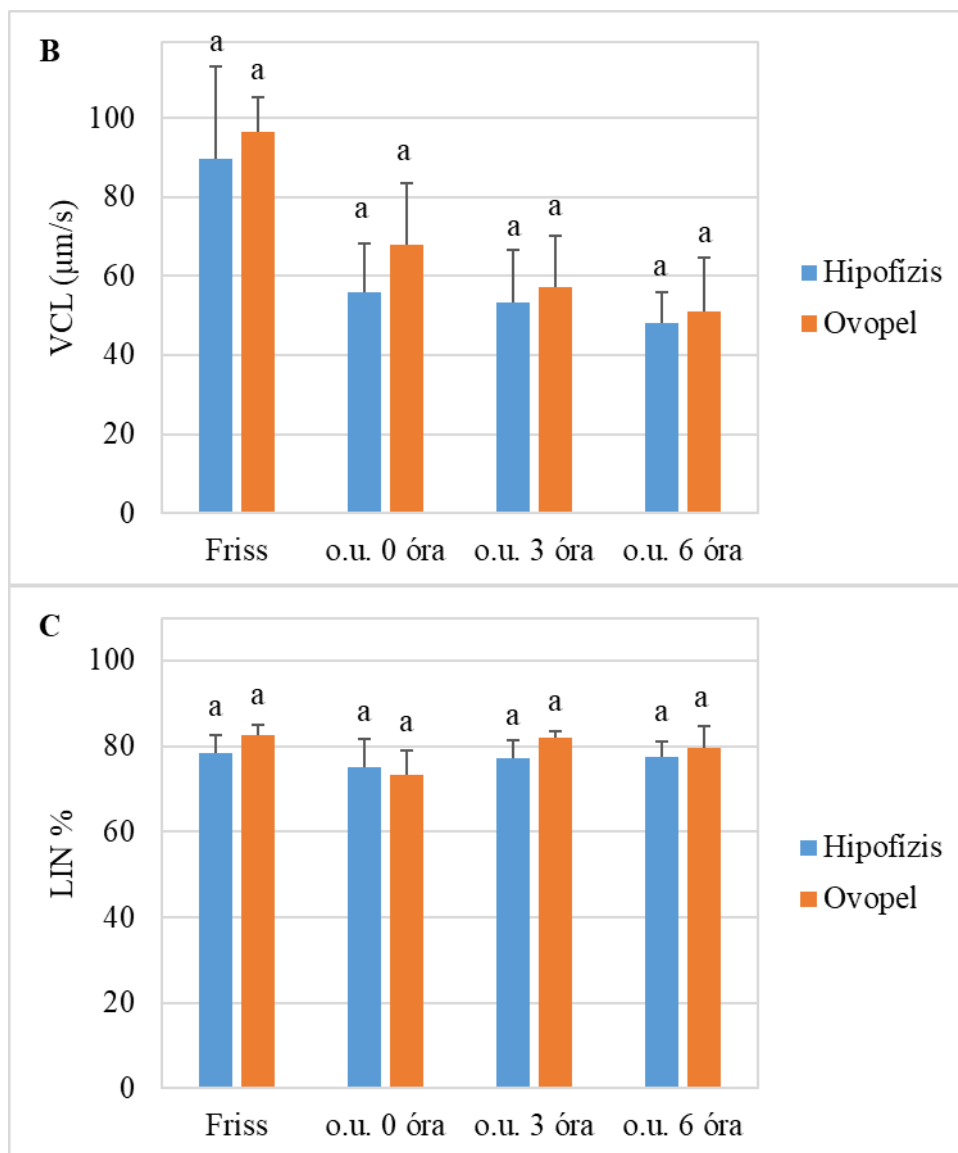
Az eredményeket Microsoft Excel és Word (Microsoft Office 2019; Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok) programok alkalmazásával dolgoztuk fel és értékeltük ki. A statisztikai elemzés során az SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago, USA) és a GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA) szoftvereket használtunk. Az adatsorok normál eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük (szignifikancia szint: $p<0,05$). A nem normál eloszlást mutató átlagértékek esetében logaritmikus és arkusz szinusz négyzetgyök transzformációt használtunk. Az eltérő csoportokat független kétmintás Student féle t próbával, egy és két szempontos varianciaanalízissel (one and two-way ANOVA) és Bonferroni, Tukey és Dunnett T3 „post hoc” tesztekkel hasonlítottuk össze (szignifikancia szint: $p<0,05$).

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Két különböző hormonkészítmény hatékonyságának vizsgálata

Az Ovopellel beoltott halaknál mindegyik, még a hipofízissel oltottból egy kivételével minden domolykóból sikerült spermiumot fejnünk. Adott mérési időpontokon belül a kezelések között egyik vizsgált paraméterben sem volt megfigyelhető szignifikáns különbség (8. ábra A-C). A mélyhűtést követően (o.u. 0 óra) (pMOT: Hipofízis: $88 \pm 4\%$, Ovopel: $87 \pm 7\%$; VCL: Hipofízis: $90 \pm 24 \mu\text{m/s}$, Ovopel: $96 \pm 9 \mu\text{m/s}$; LIN: Hipofízis: $79 \pm 4\%$, Ovopel: $83 \pm 2\%$) a három rögzített értékben mindkét csoport esetén csökkenés volt mérhető a friss mintákhoz képest (pMOT: Hipofízis: $53 \pm 9\%$, Ovopel: $65 \pm 6\%$; VCL: Hipofízis: $56 \pm 12 \mu\text{m/s}$, Ovopel: $68 \pm 15 \mu\text{m/s}$; LIN: Hipofízis: $75 \pm 7\%$, Ovopel: $73 \pm 6\%$). A mélyhűtött minták motilitása olvasztást követően 3 órával (o.u. 3 óra) (pMOT: Hipofízis: $29 \pm 12\%$, Ovopel: $26 \pm 11\%$) szignifikánsan csökkent a közvetlenül olvasztást követően (o.u. 0 óra) mért értékekhez képest. A 3 (o.u. 3 óra) (pMOT: Hipofízis: $29 \pm 12\%$, Ovopel: $26 \pm 11\%$; VCL: Hipofízis: $53 \pm 13 \mu\text{m/s}$, Ovopel: $57 \pm 13 \mu\text{m/s}$; LIN: Hipofízis: $77 \pm 4\%$, Ovopel: $82 \pm 1\%$) és a 6 órás (o.u. 6 óra) (pMOT: Hipofízis: $22 \pm 14\%$, Ovopel: $24 \pm 13\%$; VCL: Hipofízis: $48 \pm 8 \mu\text{m/s}$, Ovopel: $51 \pm 13 \mu\text{m/s}$; LIN: Hipofízis: $78 \pm 4\%$, Ovopel: $80 \pm 5\%$) tárolás között nem volt megfigyelhető jelentős értékcsökkenés egyik paraméter esetén sem.





8. ábra (A-C). A két eltérő hormonkészítmény összehasonlítása során mért pMOT, VCL és LIN értékek a friss, a mélyhűtött, valamint az olvasztást követően tárolt spermamintákban ($N=7-7$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

4.2. A 4 ml-es kriocső, valamint az 5 ml-es műszalma összehasonlítása a fagyasztás során

A mélyhűtött minták esetén mind a három vizsgált paraméterben szignifikáns csökkenés volt mérhető a friss mintákhoz képest. Az 5 ml-es műszalmában, illetve a 4 ml-es kriocsőben mélyhűtött minták között nem rögzítettünk szignifikáns különbséget (3. táblázat).

3. táblázat. A friss, az 5 ml-es műszalma, valamint a 4 ml-es kirocsó összehasonlítása során mért pMOT, VCL és LIN értékek (N=5). A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek adott paraméter esetében (p<0,05). A táblázatban az átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

	Friss	Szalma	Kriocsó
PMOT%	84 ±5 ^a	25±13 ^b	45±19 ^b
VCL (µ/S)	63±14 ^a	43±6 ^b	44±10 ^b
LIN%	77±4 ^a	67±5 ^b	68±3 ^b

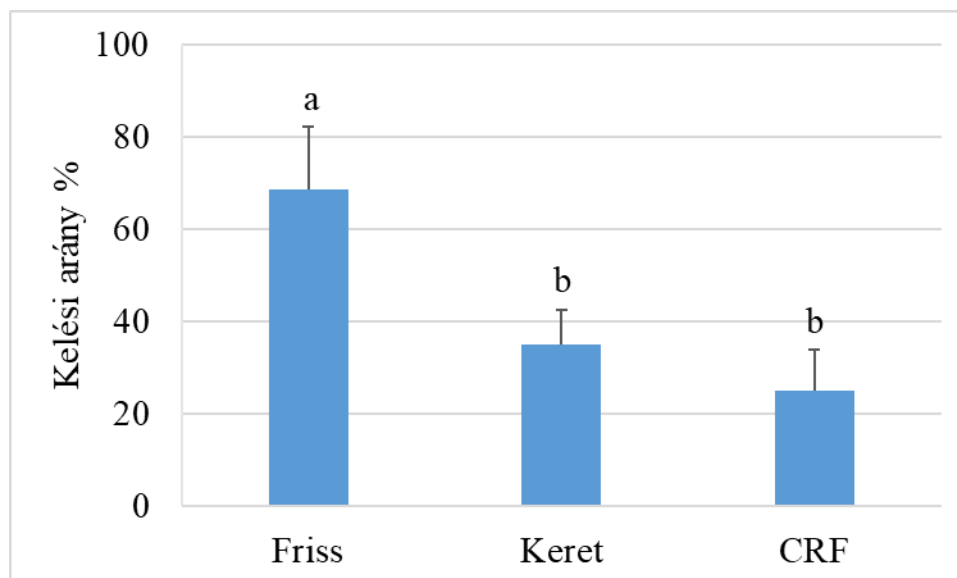
4.3. Két különböző fagyasztási módszer összehasonlítása a szaporítás során

A mélyhűtött minták esetén a pMOT és a VCL paraméterben szignifikáns csökkenés volt mérhető a friss mintákhoz képest. LIN%-ban nem mértünk szignifikáns különbséget. A kereten, illetve a CRF-ben mélyhűtött spermaminták között a vizsgált paraméterekben nem rögzítettünk szignifikáns különbséget (4. táblázat).

4. táblázat. A friss, a kereten, valamint a -es kirocsó összehasonlítása során mért pMOT, VCL és LIN értékek (N=5). A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek adott paraméter esetében (p<0,05). A táblázatban az átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

	FRISS	Keret	CRF
PMOT%	84 ±5 ^a	10±3 ^b	5±2 ^b
VCL (µM/S)	76±12 ^a	42±2 ^b	35±3 ^b
LIN%	66±5 ^a	72±2 ^a	70±3 ^a

A mélyhűtött minták esetén (keret: 35±7% és CRF: 25±9%) a kelési arányban szignifikáns csökkenés volt mérhető a friss spermával termékenyített mintákhoz képest (69±14%). A kereten, illetve a CRF-ben mélyhűtött spermamintákkal történő szaporítás során a kelési arányban a két mélyhűtési módszer között nem mutatkozott szignifikáns különbség (9. ábra)



9. ábra. Kelési arány a friss, a kereten és a CRF-ben mélyhűtött spermamintákkal történő termékenyítést követően. A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

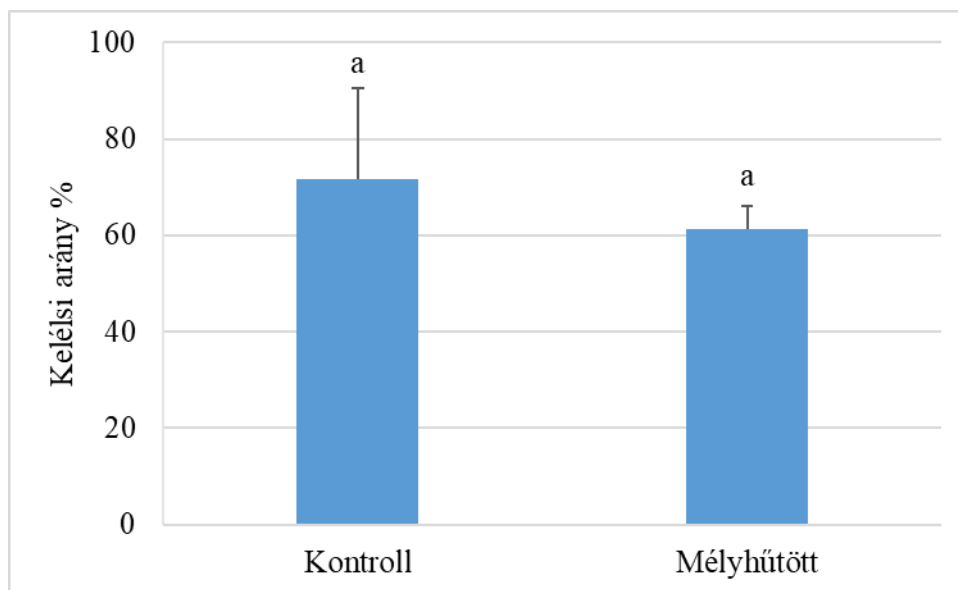
4.4. Friss és mélyhűtött sperma összehasonlítása szaporítás során

A mélyhűtött minta esetén a pMOT és a VCL paraméterben szignifikáns csökkenés volt mérhető a friss és a kontroll mintákhoz képest. A friss, illetve a kontroll (termékenyítés pillanatában) spermaminták között a LIN paraméterben nem rögzítettünk szignifikáns különbséget (5. táblázat).

5. táblázat. A friss, a kontroll, valamint a mélyhűtött spermaminták összehasonlítása során mért pMOT, VCL és LIN értékek ($N=5$). A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek adott paraméter esetében ($p < 0,05$). A táblázatban az átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

	Friss	Kontroll	Mélyhűtött
PMOT%	81 ± 6 ^a	65 ± 17 ^a	5 ± 3 ^b
VCL (μM/S)	77 ± 11 ^a	74 ± 15 ^a	35 ± 6 ^b
LIN%	77 ± 3 ^a	68 ± 14 ^a	70 ± 13 ^a

A mélyhűtött minta (61 ± 5%) esetén a kelési arányban nem volt szignifikáns különbség (10. ábra) a friss spermával termékenyített mintához (72 ± 19%) képest.



10. ábra. Kelési arány a kontroll és a mélyhűtött spermamintákkal történő termékenyítést követően. A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

5. Következtetések és javaslatok

5.1. Következtetések

A hipofízis (pMOT: $88\pm4\%$ VCL: 90 ± 24 $\mu\text{m/s}$ LIN: $79\pm4\%$) és az Ovopel (pMOT: $87\pm7\%$ VCL: 96 ± 9 $\mu\text{m/s}$, LIN: $83\pm2\%$) összehasonlítása során egyik vizsgálat paraméter esetében sem tapasztaltunk jelentős hatást a mélyhűtést követően. Hasonló eredményt találtak korábban frissen fejt domolykó sperma esetében (Cejko et al. 2011). Négy különböző készítményt hasonlítottak össze (Ovopel, Ovaprim, LHRHa- luteinizáló hormon felszabadító hormon, és ponty hipofízis). Kísérletünkhöz hasonlóan magas pMOT értékeket rögzítettek (pMOT:~60-60%). Az Ovopel állandó és precízen beállított hatóanyag tartalma okán megfelelő készítmény lehet a domolykó sperma hormonális indukciója során. A gyűjtött és acetonosan kezelt hipofízis hatóanyag tartalma azonban nehezen becsülhető. A felolvasztást követően tapasztalt mozgási képesség csökkenés a spermiumok fagyás okozta stressz faktorok hatására következett be (Bernáth 2016). A minták tárolhatóságát azonban a különféle alkalmazott hormon készítmények nem befolyásolták. A domolykó magas érzékenységet mutatott a 6 órás tárolás során, már 3 óra elteltével jelentősen csökkent a mozgó sejtek aránya. Bernáth et al 2016-os vizsgálatukban ellentétes eredményt rögzített a felolvasztott ponty sperma esetén 6 órás tárolást követően. Egy másik, 2017-es vizsgálatukban pedig a Black moor és Oranada aranyhalaknál írtak le magas toleranciát (Bernáth et al. 2017). A domolykó sperma más pontyféléktől eltérően nem alkalmas hosszabb távú tárolásra a felolvasztást követően.

Mind az 5 ml-es műszalma, mind pedig a 4 ml-es kriocső hasonlóan eredményesnek bizonyult a nagy mennyiségű domolykó sperma fagyasztása során. A módszerek optimalizálása során Bokor és Bernáth et al. 2019-es és Várkonyi 2021-es munkáit vettük alapul, ahol a harcsa és a ponty esetében kerültek kidolgozásra az említett mélyhűtési protokollok. Mindkét fajban, (munkánkhoz hasonlóan) egyaránt eredményesnek bizonyult mindkét módszer. A kriocső alkalmazása egy sztenderd, ismételhető alkalmazást tesz lehetővé műszalmával szemben. A műszalma esetében a töltést követően manuálisan kell azok lezárásáról gondoskodni (gézlap és specifikus polimer por). E folyamat számos hibalehetőséget és eltérő effektivitást hordozhat magában. Ezzel szemben a kriocső egy előre legyártott kupakkal rendelkezik.

A szaporítás során igazoltuk, hogy a hűtőkereten polisztirol dobozban, valamint a programozható fagyasztó berendezésben mélyhűtött sperma egyaránt eredményes lehet. A hígítási arány optimalizálásával (1:1-es hígítási arány) továbbá, a friss spermához hasonló kelési arányt figyeltünk meg (friss: $72\pm19\%$, mélyhűtött: $61\pm5\%$). Bokor és Bernáth et al. a harcsa fajnál 10 ml-es kriocsövet és 1:1-es hígítást alkalmazva ugyan csak a friss kontrollhoz

hasonló kelést rögzített (friss: $68\pm4\%$ mélyhűtött: $66\pm6\%$). Lahnsteiner et al. (2000) tudomásunk szerint egyedülként számoltak be sikeres domolykó sperma mélyhűtésről 0,5 ml-es műszalma felhasználásával, ahol magas $61\pm5\%$ -os motilitás, $58\pm10\ \mu\text{m/s}$ -os VCL értékeket rögzítettek. Kísérletükben azonban nem végeztek termékenyítést. Vizsgálataink minden tekintetben úttörőnek tekinthetők a faj spermamélyhűtés módszerének fejlesztése vonatkozásában. A domolykóállományok szaporítási és nevelési technológiájának fejlesztése, génmegőrzése a halgazdálkodás egy fontos feladata, melyhez kísérletünk egy kiváló kiindulási pont lehet a jövőben.

5.2. Javaslatok

Eredményeim alapján a fejes domolykó spermájának nagy mennyiségben történő mélyhűtését illetően a következő javaslatokat szeretném tenni:

1. Javaslom az Ovopel alkalmazását a spermáció hormonális indukciója során. A mélyhűtött domolykó sperma felhasználását továbbá a termékenyítés során a felolvasztást követően 3 órán belül végre kell hajtani.

2. Javaslom a domolykó sperma fagyasztása során az 1:1 hígítási arányt, 4 ml-es kriocsövet, polisztirol keretet (és dobozt) vagy a programozható fagyasztó berendezést alkalmazni

6. Összefoglalás

Horgászati értéke miatt a domolykó mesterséges szaporítására, illetve ivadéknevelésére egyre nagyobb igény van. Azonban a horgászat miatt az őshonos halak állományának pótlása egy megoldandó feladat. Ennél az oknál fogva a fejes domolykó szaporítási, nevelési technológiáját az utóbbi években ki kellett dolgozni, viszont a hatékonyságát még növelni kell. Ennek egyik eszköze a genetikai tartalékok megőrzésén túl a spermamélyhűtés. Kísérletünk során meg kívántuk vizsgálni két hormonkészítmény hatását a friss és mélyhűtött domolykó sperma minőségére vonatkozóan (4 °C történő, 6 órás tárolási kísérlet a felolvasztást követően). Munkánkban továbbá összehasonlítottuk két, nagy mennyiségű sperma mélyhűtésére alkalmas eszköz (5 ml-es műszalma és 4 ml-es kriocső) alkalmazhatóságát. Szaporítási kísérletben megvizsgáltuk két fagyasztási módszer (polisztirol hűtőkeret és programozható fagyasztó berendezés-CRF) eredményességét, mely során friss és a kétféle eljárással fagyasztott spermával végeztünk termékenyítést. Második szaporítási kísérletünkben optimalizáltuk a hígítási arányt a fagyasztás során és ugyan csak termékenyítést hajtottunk végre friss és nagy mennyiségben fagyasztott domolykó hímivartermék alkalmazásával. Vizsgálatainkban általánosan három különböző mozgási paramétert rögzítettünk (számítógépes spermavizsgáló rendszer, pMOT %, VCL $\mu\text{m/s}$, LIN %), valamint meghatároztuk a kelési arányt. Az ovopel és hipofízis egyaránt jó minőségű spermát eredményezett a fejest követően. A domolykó sperma jelentős érzékenységet mutatott a felolvasztást követő tárolás során. Az 5 ml-es műszalmában, illetve a 4 ml-es kriocsőben mélyhűtött minták között nem rögzítettünk szignifikáns különbséget a pMOT (műszalma: $25\pm 13\%$, kriocső: $45\pm 19\%$), VCL (műszalma: $43\pm 6 \mu\text{m/s}$, kriocső: $44\pm 10 \mu\text{m/s}$) és LIN (műszalma: $67\pm 5\%$, kriocső: $68\pm 3\%$) paraméterek esetében. A kereten ($35\pm 7\%$), illetve a CRF-ben ($25\pm 9\%$) mélyhűtött (4 ml-es kriocső) spermamintákkal történő szaporítás során a kelési arányban a két mélyhűtési módszer között nem mutatkozott szignifikáns különbség. A hígítási arány optimalizálásával (1:1-es hígítási arány) továbbá, a friss spermához hasonló kelési arányt figyeltünk meg (friss: $72\pm 19\%$, mélyhűtött: $61\pm 5\%$) a második szaporítás során. Vizsgálataink minden tekintetben úttörőnek tekinthetők a faj spermamélyhűtés módszerének fejlesztése vonatkozásában. A domolykóállományok szaporítási és nevelési technológiájának fejlesztése, génmegőrzése a halgazdálkodás egy fontos feladata, melyhez kísérletünk egy kiváló kiindulási pont lehet a jövőben.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, Nagy Borbálának, Dr. Bernáth Gergelynek és Dr. Bokor Zoltánnak segítségükért, sok hasznos szakmai tanácsukért, türelmükért. Szeretném megköszönni Bartucz Tamásnak, Láng Levente Zetének, Gyurcsák Márknak, Molnár Józsefnek, Dr. Csorbai Balázsnak, illetve a Halgazdálkodási Tanszék minden munkatársának, hogy segítették munkám elkészülését. Kísérleteink elvégzéséhez a „Piacorientált horgászati innováció egyes halfajok termelés technológiájának és környezettudatos horgászeszközök-halcsalik fejlesztésének területén (GINOP-2.2.1-18-2020-00026)” című pályázat járult hozzá. Kutatásunkat az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatta a Tématerületi Kiválósági Program 2020, Nemzeti Kihívások Alprogram (TKP2020-NKA-16) keretében. A Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-22-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

8. Irodalomjegyzék

- Bartucz, T. (2020): A domolykó (*Squalius cephalus* L.) ivadéknevelése recirkulációs rendszerben, Szakdolgozat, Gödöllő p. 37.
- Bernáth, G., Bokor, Z., Horváth, Á., Csorbai, B. (2021): A természetes populációk megőrzésének lehetőségei In: Urbányi, B., Szabó, T., Horváth, Á. (Szerk.): Horgászati szempontból jelentős pontyfélék biológiája és tenyésztése, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő. 169-180. p.
- Bernáth, G., Ittész, I., Szabó, Z., Horváth, Á., Krejszeff, S., Lujic, J., Várkonyi, L., Urbányi, B., Bokor, Z. (2017). Chilled and post-thaw storage of sperm in different goldfish types. *Reproduction in Domestic Animals* 52, 680–686.
- Bernáth, G., Źarski, D., Kása, E., Staszny, Á., Várkonyi, L., Kollár, T., Hegyi, Á., Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, Á. (2016). Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation using a programable freezer. *Gen Comp Endocrinol* 237, 78–88.
- Bernáth, G. (2016): A halsperma minősítési rendszerének gazdasági célú fejlesztése. Doktori értekezés, Gödöllő. p. 112.
- Bernáth, G., Bokor, Z., Kása, E., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Kollár, T., Urbányi, B., Zarski, D., ifj. Radóczy, J., Horváth, Á. (2015): Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. *Cryobiology*, 70, 76–78. p.
- Blaxter, J.H.S (1953): Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172. p. 1189-1190.
- Bokor, Z., Źarski, D., Palinska-Zarska, K., Król, Krejszeff, S., Radóczy, J., Horváth, Á., Várkonyi, L., Urbányi, B., Bernáth, G. (2021): Standardization of sperm management for laboratory assessment of sperm quality and in vitro fertilization in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*), *Aquaculture International*, p. 16.
- Bokor, Z., Bernáth, G., Várkonyi, L., Molnár, J., Láng, Z.L., Tarnai-Király, Z., Solymosi, E., Urbányi, B. (2019). The applicability of large-scale sperm cryopreservation in wels catfish (*Silurus glanis*) optimized for hatchery practice. *Aquaculture* 506, 337–340.
- Bokor, Z. (2009): A harcsa (*Silurus glanis*) és a süllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata gyakorlati szempontok alapján. Doktori értekezés, Gödöllő. p. 102.

- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M.P. (2010): Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26 p.
- Caffrey, J. M., Acevedo, S., Gallagher, K., Britton, R. (2008): Chub (*Leuciscus cephalus*): a new potentially invasive fish species in Ireland, *Aquatic Invasions*, Reabic. 201-209. p.
- Cejko, B. I., Krejszeff, S., Żarski, D., Targońska, K., Kucharczyk, D., Glogowski, J. (2011). The effectiveness of selected hormonal preparations in stimulating the spermatogenesis of the chub *Leuciscus cephalus* (L.). *Pol J Nat Sci*, 26, 235-245.
- Cloud, J., Patton, S. (2009): Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis Group, 237–250. p.
- Cosson, J., Groison, A.-L. Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., Billard, R. (2008): Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art, 1-27. p.
- Czeglédi, I., Erős, T. (2013): Characterizing the long-term taxonomic and functional variability of a stream fish assemblage. *Fundamental and Applied Limnology*, 153-162. p.
- Csorbai, B., Urbányi, B., Bernáth, G., Szabó, T., Várkonyi, L., Molnár, J., Csenki-Bakos, Zs., Bokor, Z. (2020): Kisméretű recirkulációs keltetők felhasználásának lehetősége Magyarországon. *HALÁSZAT-TUDOMÁNY*. 6. évfolyam. 1. szám.
- Durbin, H., Durbin F.J., Scott, B. (1982): A note on the cryopreservation of Grass carp Milt, *National Center for Biotechnology Information*. 115-117. p.
- Harka, Á., Sallai, Z. (2004): Magyarország halfaunája, *Nimfea Természetvédelmi Egyesület*, Szarvas. 94-95. p.
- Hegyi, Á. (2021): Élettartam és növekedés In: Urbányi, B., Szabó, T., Horváth, Á. (Szerk): *Horgászati szempontból jelentős pontyfélék biológiája és tenyésztése*, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő. 91-93. p.
- Herman, O. (1887): *A magyar halászat könyve II.*, K. M. Természettudományi Társulat, Budapest. 663-759. p.
- Horváth, Á. (2018): A spermamélyhűtés szerepe egyes természetvédelmi és gazdasági szempontból jelentős halfajok genetikai tartalékainak megőrzésében. *MTA Doktori értekezés*, Gödöllő. 1-22. p.
- Izsák, T. (2019): Nagy mennyiségben mélyhűtött csuka (*Esox lucius*) sperma alkalmazása keltetőházi szaporítás során és a kikelt lárvák fejlődésének vizsgálata, *Tudományos Diákköri Dolgozat*, Gödöllő. p. 34.

- Jászfalusi, L. (1944): A fejes domolykó (*Squalis cephalus* L.). Halászat. XLV. évfolyam. 4. szám.
- Koldras, M., Bieniarz, K., Bhattacharya, S., Kime D. E. (1993): Steroidogenesis by ovaries and testes of the European catfish, the wels (*Silurus glanis*), *in vitro* 389-398. p.
- Kottelat, M., Freyhof, J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol & Freyhof, Berlin, 646 pp.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., (1984): Cryopreservation of carp sperm. In: Aquaculture, 37, 267–273. p.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbányi, B., & Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54(9), 1477-1498.
- Láng, L. Z. (2021): Mélyhűtött spermából származó balatoni sudár ponty (*Cyprinus carpio morpha accuminatus*) ivadék vizsgálata tógazdasági körülmények között, Tudományos Diákköri Dolgozat, Gödöllő p. 40.
- Lente, V., Staszny, Á., Weiperth, A., Ferincz, Á. (2021): Alaktan és testfelépítés In: Urbányi, B., Szabó, T., Horváth, Á. (Szerk.): Horgászati szempontból jelentős pontyfélék biológiája és tenyésztése, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő. 41-51. p.
- Mézes, M. (2021): Táplálkozás In: Urbányi, B., Szabó, T., Horváth, Á. (Szerk.): Horgászati szempontból jelentős pontyfélék biológiája és tenyésztése, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő. 125-131. p.
- Moczarski, M., (1977): Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. In: Bulletin of the Polish Academy of Sciencis: Biological Sciencis, 25 (3), 187-90. p.
- Nagy, B. (2019): A balatoni kősüllő (*Sander volgensis*) állomány hímivarsejt minőségének és mélyhűtésének vizsgálata az indukált szaporítás fejlesztése és a génbanki megőrzés céljából. Tudományos Diákköri Dolgozat, Gödöllő. pp.24.
- Pintér K., (2015): Magyarország halai. Biológiájuk és hasznosításuk. Negyedik, átdolgozott és bővített kiadás: Mezőgazda Kiadó, Budapest, 360 pp
- Pintér, K. (2002): Magyarország halai. Akadémia kiadó, Budapest, 75–77. p.
- Sneed, K., Clemens, P. (1956): Survival of fish sperm after freezing and storage at low temperatures, The Progressive Fish-Culturist. 99-103. p.
- Szabó, T., Csorbai, B. (2021): Szaporítás és tenyésztés In: Urbányi, B., Szabó, T., Horváth, Á. (Szerk.): Horgászati szempontból jelentős pontyfélék biológiája és tenyésztése, Magyar

- Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő. 223-243. p.
- Thapliyal, M., Thapliyal, A., Bhatt, J. P. (2011): Cryopreservation of fish semen. *Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology*, 104–127. p
- Urbányi, B. (2011): Egyes gazdasági haszonhalaink hímivartermékeinek mélyhűtése, a technológia standardizálásának kidolgozása és gyakorlati alkalmazása. MTA Doktori értekezés, Gödöllő. pp.119.
- Várkonyi L. (2021): A balatoni sudár ponty (*Cyprinus carpio morpha accuminatus*) és a hévízi törpenövésű magyar vadponty (*Cyprinus carpio morpha hungaricus*) spermamélyhűtésének és intenzív rendszerben történő szaporításának vizsgálata, valamint in vitro spermabankjának megalapozása Doktori disszertáció, Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Gödöllő, 139 p.
- Weiperth, A., Hegyi, Á., Lente, V., Staszny, Á., Ferincz, Á. (2021): Környezeti igények, rendszertan és élőhely In: Urbányi, B., Szabó, T., Horváth, Á. (Szerk.): Horgászati szempontból jelentős pontyfélék biológiája és tenyésztése, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Gödöllő. 19-36 p.
- Zhang, X., Liu, Y. (1991): Study of cryopreservation of fish spermatozoa. *Acta Sci.Nat. Univ. Norm. Hunanensis*, 14: 255-259. p.