

MTA Doktori értekezés

**A spermamélyhűtés szerepe egyes
természetvédelmi és gazdasági szempontból
jelentős halfajok genetikai tartalékainak
megőrzésében**

Dr. Horváth Ákos

Gödöllő
2018

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1 CÉLKITŰZÉS.....	8
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1 AZ ÉLŐ SEJTEK ÉS SZÖVETEK MÉLYHŰTÉSÉNEK ALAPJAI.....	9
2.2 SPERMAMÉLYHŰTÉS HALAKBAN	11
2.2.1 A halsperma alapvető szaporodásbiológiai tulajdonságai.....	11
2.2.2 A sperma gyűjtése, tárolása és minősítése.....	15
2.2.3 A sperma hígítása.....	17
2.2.4 A sperma mélyhűtése	18
2.2.5 Termékenyítés a mélyhűtött spermával	20
2.2.6 A halsperma vitrifikációja.....	20
2.3 A SPERMAMÉLYHŰTÉS SZEREPE A HALAK GENETIKAI TARTALÉKAINAK MEGŐRZÉSÉBEN	20
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	23
3.1 VIZSGÁLATOK TOKALAKÚAKBAN	23
3.1.1 A kísérleti állományok tartása, szaporítása és az ivartermék gyűjtése	23
3.1.2 A sperma mélyhűtése	24
3.1.3 Termékenyítés a mélyhűtött spermával	25
3.1.4 A felolvasztott sperma életképességének vizsgálata.....	25
3.1.5 Az eredmények statisztikai értékelése	26
3.1.6 Az egyes tokalakú fajokban végzett vizsgálatok.....	26
3.1.6.1 Rövidorrú tok fajban végzett vizsgálatok	26
3.1.6.2 Sápadt tok fajban végzett vizsgálatok.....	27
3.1.6.3 Lapátorrú tok fajban végzett vizsgálatok.....	28
3.2 VIZSGÁLATOK PONTY FAJBAN	29
3.2.1 A kísérleti állományok tartása, szaporítása és az ivartermék gyűjtése	29
3.2.2 A sperma mélyhűtése	29
3.2.3 Termékenyítés a mélyhűtött spermával	30
3.2.4 Kromoszóma-preparálás a kikelt ivadékból.....	30
3.2.5 Az eredmények statisztikai értékelése	30
3.2.6 A ponty fajban végzett vizsgálatok részletes ismertetése	31
3.3 VIZSGÁLATOK LAZACFÉLÉKBEN	32
3.3.1 A kísérleti állományok tartása, szaporítása és az ivartermék gyűjtése	32
3.3.2 A sperma mélyhűtése	33

3.3.3	Termékenyítés a mélyhűtött spermával	33
3.3.4	Az eredmények statisztikai értékelése	33
3.3.5	Az egyes lazacféle fajokban végzett kísérletek.....	34
3.3.5.1	<i>Sebes pisztrángban végzett kísérletek</i>	<i>34</i>
3.3.5.2	<i>Márványpisztrángban végzett kísérletek</i>	<i>34</i>
3.3.5.3	<i>Szivárványos pisztrángban végzett kísérletek</i>	<i>34</i>
3.3.5.4	<i>Pénzes pérben végzett kísérletek.....</i>	<i>35</i>
3.4	A KIDOLGOZOTT MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A GYAKORLATBAN	35
3.4.1	A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása.....	35
3.4.2	A lazacfélékben kidolgozott módszerek alkalmazása	36
4.	EREDMÉNYEK.....	37
4.1	A TOKALAKÚAKBAN KAPOTT EREDMÉNYEK	37
4.1.1	A rövidorrú tok fajban kapott eredmények.....	37
4.1.2	A sápadt tok fajban kapott eredmények	39
4.1.3	A lapátorrú tok fajban kapott eredmények.....	41
4.2	A PONTY FAJBAN VÉGZETT KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI	45
4.3	A LAZACFÉLÉKBEN VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	49
4.3.1	A sebes pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei	49
4.3.2	A márványpisztrángban végzett vizsgálatok eredményei.....	49
4.3.3	A szivárványos pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei.....	49
4.3.4	A pénzes pérben végzett vizsgálatok eredményei	50
4.4	A KIDOLGOZOTT MÓDSZEREK GYAKORLATI ALKALMAZÁSÁNAK EREDMÉNYEI.....	53
4.4.1	A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása.....	53
4.4.2	A lazacfélékben kidolgozott módszerek alkalmazása	53
5.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	57
5.1	A TOKALAKÚAKBAN KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	57
5.2	A PONTY FAJBAN KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	59
5.3	A LAZACFÉLÉKBEN KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	61
5.4	A KIDOLGOZOTT MÓDSZEREK GYAKORLATI ALKALMAZÁSÁNAK ÉRTÉKELÉSE.....	62
5.5	JÖVŐKÉP	63
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	65
7.	IRODALOMJEGYZÉK	67
8.	A DOLGOZAT ELKÉSZÍTÉSÉHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	77
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	79
10.	SUMMARY	81
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	83

Rövidítések jegyzéke

ASMA	A spermiumok fejének automatizált morfometriai vizsgálata
ATP	Adenozin-trifoszfát
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalcium-klorid dihidrát
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
CASA	Számítógépes spermavizsgálat
DMA	N,N-dimetil-acetamid
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
HAKI	Haltenyésztési Kutatóintézet
IUCN	Természetvédelmi Világszövetség
KCl	Kálium-klorid
KH_2PO_4	Kálium-foszfát
LHRH	Luteinizáló hormon releasing hormon
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnézium-szulfát heptahidrát
mHBSS	Modosított Hanks-féle sóoldat
MOHOSZ	Magyar Országos Horgász Szövetség
mT	Módosított Tsvetkova-féle hígító
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Dinátrium-foszfát heptahidrát
NaCl	Nátrium-klorid
NaHCO_3	Nátrium-hidrogénkarbonát (szódabikarbóna)
NAIK	Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ
oT	Eredeti Tsvetkova-féle hígító
PI	Propídium-jodid
PIT	Passzív integrált jeladó
Tris	Trisz(hidroximetil)-aminometán

1. Bevezetés

A genetikai tartalékok megőrzése egy sokat kutatott és sokat vitatott terület, amelynek a fontosságát azonban nem lehet eléggé hangsúlyozni. Az ember a természetnek az a része, amely képes ugyanennek a természetnek az értékeit, elemeit tudatosan használni és a saját javára fordítani. Az ember domesztikálja (házasítja) a különböző növény- és állatfajokat, ezek alapvető tulajdonságait tudatos tenyésztőmunkával szelektív módon kiemeli, felerősíti és ebből hasznot húz. Ahhoz, hogy a domesztikáció révén eljussunk odáig, hogy milliók élelmiszer-igényét elégíthessük ki, arra van szükség, hogy a tenyésztett fajok, fajták minél egységesebbek, egyformábbak legyenek, azaz csökkentenünk kell a tenyésztett csoportokon belüli változatosságot. A termelés intenzifikációjával természetes módon együtt jár a biológiai és genetikai változatosság csökkenése. Mivel az ember ösztönösen a többet termelő, gyorsabban növekedő fajtákat, változatokat részesíti előnyben, az ilyen kritériumoknak kevésbé megfelelő csoportok háttérbe szorulnak, tenyésztésük lényegtelenné válik, majd idővel meg is szűnik. Ezek a megszűnő vad, félvad formák képviselik ugyanakkor a genetikai változatosságot, hiszen az egységes tenyésztett állományok kialakulásához a legtöbb esetben több populáció génjeit használják fel.

A genetikai tartalékok megőrzése fontos a tenyésztés intenzitásának fenntartásához is. A tenyésztett állományok a fokozott szelekciós nyomás és termelési elvárások miatt különleges igényekkel rendelkeznek, ami sok esetben a fokozott igénybevétellel, a szervezet és az immunrendszer ellenálló-képességének csökkenésével és megnövekedett állategészségügyi kockázatokkal jár. Általános elv, hogy a szuperintenzíven tenyésztett fajták, állományok a legsérülékenyebbek egy adott fajon belül. A következmények kezelésének egyik módja a visszakeresztezés az adott fajta egyéb populációival és a genetikai változatosság növelése a fajtán belül. Ez azonban csak abban az esetben lehetséges, ha a fajtán belül léteznek is egyéb populációk.

A fentiek mellett nem szabad megfeledkezni a genetikai erőforrások megőrzésének kézenfekvő és a közvélemény által jobban ismert területéről, a természetes környezetben élő fajok megőrzéséről. A Természetvédelmi Világszövetség (International Union for Conservation of Nature – IUCN) által gondozott vörös könyv (<http://www.iucnredlist.org>) adatai szerint a védelemre szoruló növény- és állatfajok száma eleve igen magas és szinte minden kategóriában folyamatosan növekszik. A természetes környezetben élő fajok, illetve azok megőrzésének jelentősége megkérdőjelezhetetlen, ezt különböző nemzetközi szervezetek, az Európai Unió jogszabályai, illetve Magyarország Alaptörvénye is garantálja.

A tenyésztett és természetes környezetben élő fajok, populációk fent említett megőrzése ugyanilyen fontos a szűkebb szakterületemen, a halgazdálkodásban is. A domesztikáció igen alacsony foka miatt a halgazdálkodás nagyon is összefügg a természeti erőforrások hasznosításával és megőrzésével. A halgazdálkodásban kidolgozott módszerek és eljárások nem csak a kereskedelmi célú haltenyésztésben kapnak szerepet, hanem egyéb területeken is, pl. a természetvédelmi szempontból lényeges fajok megőrzésében is. Az indukált halszaporítást és ivadéknevelést például széles körben alkalmazzák a fajmegőrzéssel foglalkozó programok, amelyeknek célja a felnevelt ivadék kihelyezése természetes vizekbe, nevezetesen arra az élőhelyre, ahonnan azok származtak. Az ilyen programokba bevont

fajokból tenyészállományokat tartanak fent haltenyésztő telepeken, amelyek utána részt vesznek a kihelyezésre szánt állományok létrehozásában. A szaporítás módszereit, pl. az indukált ivarérelést, vagy a hormonkezelést az ovuláció és spermiáció végső kiváltására mind a halgazdálkodás gyakorlatában dolgozták ki először, majd alkalmazták őket a faj- vagy fajtamegőrzési programokban.

Értekezésemben a halászati genetikai erőforrások megőrzésének egyik módjával, a hímivarsejtek mélyhűtésével foglalkozom. Az élő sejtek és szövetek mélyhűtése lehetővé teszi azok megőrzését emberi léptékkal mérve korlátlan ideig. A mélyhűtött sperma bármikor felolvasztható és felhasználható termékenyítésre, függetlenül attól, hogy az azt adó egyed életben, vagy még szaporodásra alkalmas állapotban van-e. A mélyhűtési módszerek, receptúrák folyamatosan fejlődnek, azokat egyre több halfaj esetében dolgozzák ki. Az így kifejlesztett módszerek használatával jobb termékenyítési eredmények érhetők el, végső soron jobb termelési eredményeket is produkálva.

Előre bocsátom, hogy az értekezésemben felváltva használom a magyar nyelv egyes szám első személyű, illetve többes szám első személyű alakját. Meggyőződésem, hogy a 21. században senki nem végez kutatómunkát önmagában, mások segítségével nélkül. A csapatmunka, illetve a közreműködő kollégák iránti tisztelet okán a dolgozat nagy részében a többes szám első személyt használtam, kivéve azokat a vizsgálatokat, amelyeket valóban egyedül végeztem.

1.1 Célkitűzés

Az értekezésemben 11 év (2003-2014) kutatómunkáját foglaltam össze. A taglalt vizsgálatok célja a következő volt:

- Spermamélyhűtési eljárások fejlesztése tokalakúakban, pontyban és lazacfélékben.
- A mélyhűtött halsperma felolvasztás utáni minőségi paramétereinek vizsgálata, beleértve a sperma motilitását, életképességét (tokalakúakban) és termékenyítő képességét.
- Pontyban a mélyhűtött spermával termékenyített ikratételekből kikelő ivadék torzulásainak, illetve a torz fejlődésű ivadék ploidijának vizsgálata.
- A kifejlesztett spermamélyhűtési eljárások alkalmazása a haltenyésztés gyakorlatában.

2. Szakirodalmi áttekintés

Az ivarsejt-mélyhűtés tudománya 1949-ig nyúlik vissza, amikor Polge et al. először adott számot a szárazjég hőmérsékletére (-79°C) lehűtött sperma felolvasztást követő túléléséről, illetve a glicerin védőhatásáról. A felfedezést gyorsan követték a további hasonló témájú vizsgálatok, és két évvel később már beszámoltak az első mélyhűtött spermával végzett termékenyítésből származó borjú születéséről (Stewart, 1951). Halakban az első vizsgálatokról John Blaxter számolt be (Blaxter, 1953), aki a sperma mélyhűtését a hering (*Clupea harengus*) ősszel és tavasszal ívó változatának hibridizációjára használta – ami értelemszerűen lehetetlen lett volna természetes körülmények között. Az azóta eltelt több, mint 60 év alatt a spermamélyhűtés több gazdasági emlősfajban (mindenekelőtt a tejelő szarvasmarhában) egy több millió dolláros üzletaggá nőtte ki magát, míg a kereskedelmi célú halgazdálkodási alkalmazása csak néhány éve indult el, az is meglehetősen korlátozott mennyiségben. Dolgozatom első részében ennek a látszólagos kudarcnak az okait igyekszem feltárni, illetve a halsperma-mélyhűtésben rejlő lehetőségeket ismertetni.

2.1 Az élő sejtek és szövetek mélyhűtésének alapjai

Az élő szövetek és sejtek mélyhűtésének fő célja a biológiai idő megállítása, ami vízalapú rendszerekben (amilyenek az élő szervezetek is) extrém alacsony hőmérsékleten válik lehetségessé. Cseppfolyós víz nem létezik -130°C alatt. Ezen a hőmérsékleten a víz csak kristályos vagy üvegszerű amorf szilárd halmazállapotban lehet jelen, amelyben a molekulák mozgása olyan korlátozott, aminek hatása csak geológiai időben (tehát nem biológiai időben) mérhető. A mélyhűtött élő anyag tárolásához leggyakrabban használt cseppfolyós nitrogén forráspontján (-196°C) nem működik semmilyen hőigénylő kémiai vagy fizikai folyamat (Mazur, 1984).

A víz fagyáspontja 0°C , azonban a víz nem minden esetben alakul át szilárd jéggé ezen a hőmérsékleten. A víz túlhűlhet, azaz cseppfolyós halmazállapotban maradhat még a fagyáspont alatt is mindaddig, amíg a kristályos jég képződése el nem indul az ún. jégmagok mentén. A jégmagok képződése megkezdődhet spontán, vagy – ami a gyakoribb eset – jégmagképző elemek segítségével (Mazur, 1990). A vizes oldatok fagyáspontja 0°C -nál alacsonyabb, így adott esetben az oldat alacsonyabb hőmérsékletig is túlhűlhet. A túlhűlt cseppfolyós halmazállapotból a szilárdba való átmenet során energia (rejtett hő) szabadul fel, ami az oldatot felmelegíti a fagyáspontig. Fagyáskor a vízmolekulák épülnek bele először a jég kristályrácsába (nem az oldott anyag molekulái), így az oldat folyamatosan töményebbé válik és ezzel együtt a fagyáspontja is csökken. A folyamat az eutektikus pontig folytatódik, amikor végül az egész oldat megszilárdul (Denniston et al., 2011).

Az élő sejtek és szövetek mélyhűtésének hagyományos elmélete szerint a sejtek mélyhűtés során bekövetkező pusztulását a sejten belüli jégképződés okozza, így a sejtek túlélése maximalizálható a sejten belüli jégképződés minimalizálásával (Mazur, 1963). A jégképződés minimalizálása kétféle módon érhető el: a sejten belüli vízmennyiség csökkentésével (vagy más néven egyensúlyi – *equilibrium* – hűtéssel) vagy vitrifikációval (nem

egyensúlyi vagy *non-equilibrium* hűtéssel). A sejten belüli vízmennyiség csökkentése viszonylag lassú mélyhűtéssel érhető el. A sejt vízleadása során a legfontosabb szerepet a sejthártya, mint féligáteresztő membrán játssza. Mivel a sejten belül nincsenek hatékony jégmagképző elemek, a kristályos jég képződése minden esetben a sejten kívüli térben (extracellulárisan) indul el (Mazur, 1970), miközben a sejten belüli víz túlhűl és cseppfolyós marad. Az ozmotikus nyomáskülönbség kiegyenlítésére a sejt folyamatosan vizet ad le a körülötte besűrűsödő oldatba. Amennyiben a sejtnak elegendő ideje van arra, hogy megfelelő mennyiségű vizet adjon le ahhoz, hogy elkerülje az intracelluláris jégképződést, a sejt túlélheti a fagyasztást és felolvasztást. Ha erre nincs elegendő idő, abban az esetben a sejten belüli víz spontán jégmagképződéssel fagy meg, a jégkristályok szabálytalan szerkezete felszakíthatja a sejtek külső és belső membránjait, ami végső soron a sejtek pusztulását okozza.

A sejtek számára tehát fontos, hogy elég lassan hűtsük le őket annak érdekében, hogy biztosítsuk a túlélésüket. Mit jelent ugyanakkor az „elég lassan”? Ez értelemszerűen a sejt méretétől és annak víztartalmától függ. A nagyobb sejtek lassúbb hűtési sebességet igényelnek, míg a kisebbek esetében a gyors hűtés is megfelelő túléléshez vezet. Az egérembriókkal végzett korai kísérletek során pl. az optimális túléléshez 0,3-2°C/perc közötti hűtési sebességre volt szükség (Wittingham et al., 1972), és az 1°C/perc körüli hűtési sebességet ma is használják sejtek és szövetek mélyhűtésére (Lee et al., 2013). Kereskedelmi forgalomban kaphatók olyan mélyhűtőberendezések – hőszigetelt dobozok – amelyekre a gyártó garantálja a fent említett 1°C/perc-es hűtési sebességet amennyiben a dobozt -80°C hőmérsékletű közegbe helyezik (pl. szárazjég közé vagy laboratóriumi -80°C-os fagyasztóba).

Kisebbségek (pl. a kutatásom tárgyát képező halspermiumok) esetében a gyorsabb hűtési sebességek gyakran jobb túlélést eredményeznek, mint a lassúak. Ennek oka, hogy a halspermiumok igen tömör, speciális szerkezetű sejtek, amelyekben kevés citoplazma és ennek megfelelően víz található. Lassú hűtés esetében ezek a sejtek az őket körülvevő és egyre töményebbé váló oldat toxikus hatása miatt károsodhatnak, ami rontja a túlélésük esélyeit. Gyors hűtéskor a bennük maradó víz (ha marad bennük víz) kisméretű jégkristályok alakjában fagy meg, amik nem jelentenek jelentős veszélyt a sejtorganellumok számára. A gyors hűtési sebességek ilyenkor viszonylag széles tartományban mozognak, pl. az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) spermája esetében 11°C/perc sebességet használtak (Steyn & Van Vuren, 1987), míg a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) spermája a 92,7°C/perc hűtési sebességet is jól tolerálta (Cabrita et al., 2001).

Extrém gyors hűtéssel a cseppfolyós halmazállapot kristályos jég képződése nélkül alakul át egy üvegszerű amorf szilárdká a vitrifikációnak nevezett folyamat során. A kristályosodás helyett a viszkozitás hirtelen és gyors megemelkedése vezet a szilárd halmazállapot létrejöttéhez. A sikeres vitrifikációhoz ugyanakkor a védőanyagok vagy más néven krioprotektánsok igen magas koncentrációjára van szükség, ami a sejtekre nézve toxikus lehet (Fahy et al. 1984). Az említett nehézségektől függetlenül a vitrifikáció egy igen népszerű és széles körben használt technika, elsősorban embriók mélyhűtésére (Carnevale, 2006; Liu et al., 2015; Kuwayama et al., 2005). A hagyományos fagyasztási eljárások egy jelentős része szintén részleges vitrifikációhoz vezet, elsősorban a sejten belüli (intracelluláris) térben (Leibo et al., 1978; Hirsh et al., 1985). A vitrifikált anyag ugyanakkor metastabil, csak meghatározott hőmérséklet alatt (-100-130°C) tartható fenn, ennél magasabb hőmérsékleten újra kristályosodik, ami szintén a sejtek károsodásához vezet.

Láttuk tehát, hogy az élő anyag számára az alacsony hőmérséklet önmagában nem jelent veszélyt, a károsodás elsősorban az átmeneti zónában (kb. -15°C és -60°C között) éri a mélyhűtésre szánt sejteket vagy szöveteket. Amennyiben a sejtek túléltek a hűtést, akkor számukra a biológiai idő megállt. Az egyetlen hatás, ami ilyenkor a vízalapú élő rendszereket éri, az a kozmikus háttérsugárzás, amely szabadgyökök kialakulásához és törésekhez vezet a makromolekulákban (pl. a DNS-ben). Megfelelően hosszú idejű háttérsugárzás valóban

károsodásokat válthat ki az élő rendszerekben, főleg mivel a tárolás hőmérsékletén nem lehetségesek a törések kijavításához szükséges enzimatis reakciók sem. Kísérletesen bebizonyították, hogy szobahőmérsékleten 2000-4000 évnek megfelelő háttérsugárzásra van szükség ahhoz, hogy egy emlős sejtenyészet 63%-a elpusztuljon (Mazur, 1984).

Fontos ugyanakkor, hogy a mélyhűtött élő anyag tárolásának hőmérséklete -130°C alatt legyen. A szárazjég (-79°) hőmérsékletén tárolt sejtek nem stabilak és folyamatosan – bár sejtípustól függően eltérő ütemben – pusztulnak (Mazur, 1984). Ennek az oka egyrészt a már fent leírt részleges vitrifikációban keresendő, ami lehetővé teszi a jég kristályrácsokba rendeződését, másrészt abban, hogy ezen a hőmérsékleten a cseppfolyós víz még nyomokban jelen lehet, csakúgy mint az ahhoz kötődő kémiai és fizikai reakciók.

A mélyhűtött élő anyag felolvasztásának üteme legalább olyan fontos, mint a hűtés. Lassú felolvasztás során a sejteken belül jelen lévő kisméretű jégkristályok növekedésnek indulhatnak, illetve a vitrifikált anyag újra kristályosodhat, aminek a káros hatásait a fentiekben már ismertettem. Ha a sejteket gyorsan olvasztjuk fel ($1000^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ sebességgel, vagy gyorsabban), akkor a sejtek gyorsan rehidratálódnak és javul a túlélésük (Denniston et al., 2011). A vitrifikált sejtek-szövetek esetében mára általánosan elterjedt az a nézet, hogy a felolvasztás üteme fontosabb az élő anyag túlélése szempontjából, mint a hűtés (Mazur & Seki, 2011, Seki et al., 2014). Ennek bizonyítására pulzáló lézeres melegítéssel $10\,000\,000^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ körüli felolvasztási sebességet értek el, ami a vitrifikált egér oociták közel 100%-os túlélését eredményezte (Jin et al., 2014).

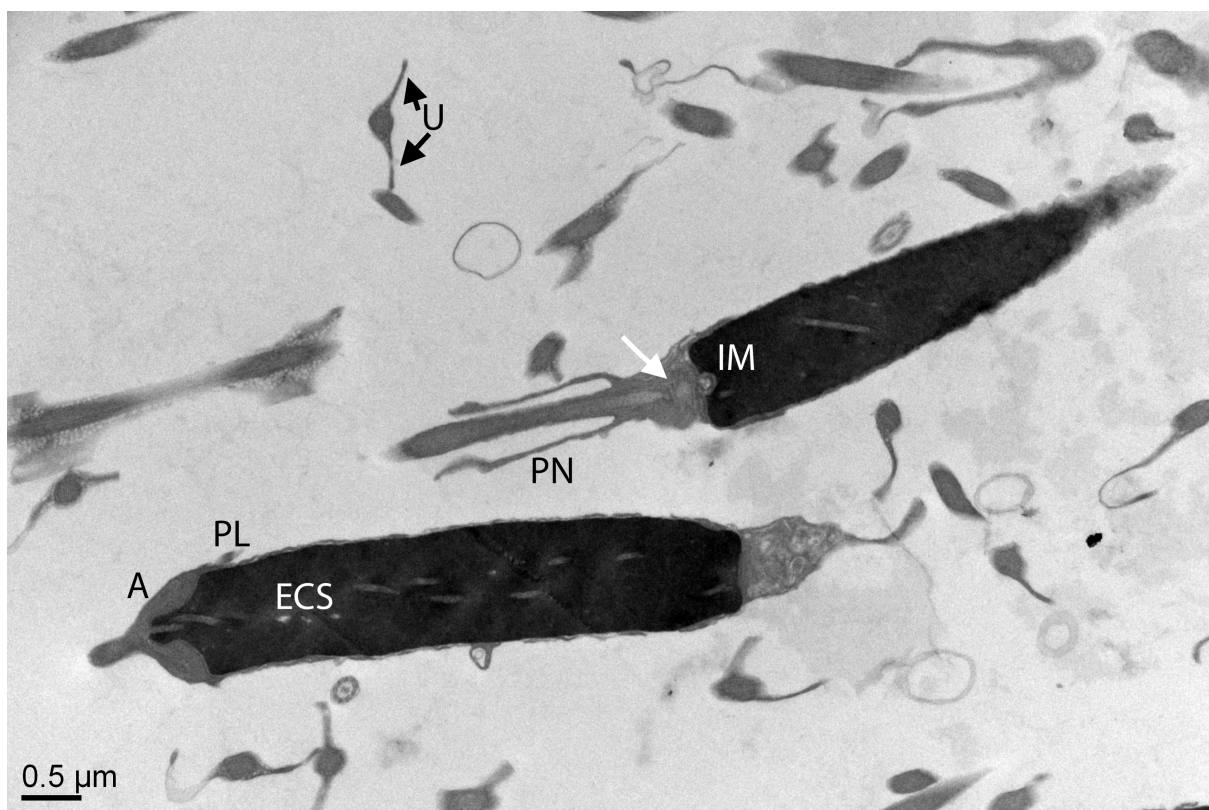
2.2 Spermamélyhűtés halakban

A sperma volt az első szövettípus, amelyre széles körben dolgoztak ki mélyhűtési eljárásokat. A halak spermája sok szempontból különbözik a gazdasági emlősállatokétól, azonban a spermamélyhűtés alapelvei azonosak. Ennek megfelelően a spermamélyhűtés lépéseit a halsperma mélyhűtésén keresztül mutatom be.

2.2.1 A halsperma alapvető szaporodásbiológiai tulajdonságai

A halak spermája ugyanúgy, mint más állatokban, a herében termelődik. A spermiumok a halakban igen változatos képet mutatnak, rendszertani csoporttól függően más és más alakúak (Mattei, 1991). Ettől függetlenül vannak bizonyos közös tényezők, amelyek minden hímivarsejtben azonosak. A spermium, mint sejt egy jelentősen egyszerűsödött és specializált szerkezetet mutat. A feji rész tartalmazza a sejtmagot az örökítőanyaggal. A sejtmag általában gömb alakú, amelynek disztális részén egy bemélyedés található. A bemélyedéshez közel találhatók a centriólumok (proximális és disztális), amelyek a mikrotubulusok polimerizációjáért felelősek és a spermium ostorának kialakításában, valamint osztódáskor a magorsó húzófonalainak létrehozásában játszanak kulcsfontosságú szerepet. A halspermiumok nagy részének nincs kifejezett nyaki része, csak egy gallérszerű kitüremkedés az ostor alapja körül, amitől a poszt nukleáris csatorna választja el. Ez tartalmazza a sejtek energiaellátásáért felelős mitokondriumokat. Végül a spermiumok ostora felelős a szaporítóközegben végzett haladó mozgásért. Az ostor belső szerkezete általában 9 periférikus dupla és két centrális szimpla mikrotubulusból áll ($9+2$ szerkezet). A periférikus dupla mikrotubulusok felszínén található dinein karok biztosítják az ostor mozgását azzal, hogy az egymás mellett álló mikrotubulusokat tengelyirányban elmozdítják egymástól. Dolgozatomban három rendszertani csoporttal foglalkozom, így ezen csoportok hímivarsejtjeit ismertetem részletesen.

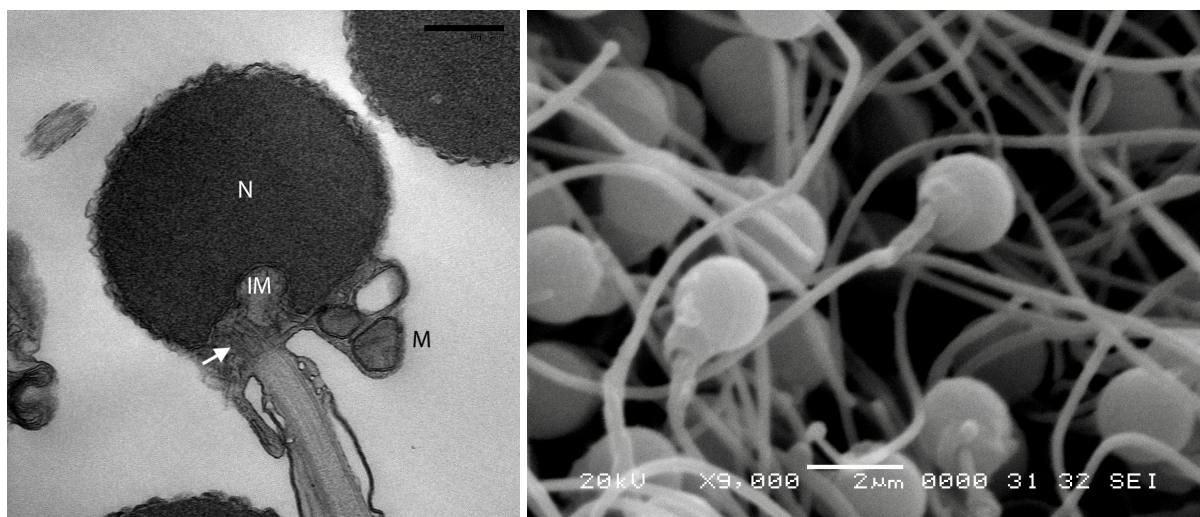
A tokalakúak (*Acipenseriformes*) igen ősi típusú rendszertani csoport, hímivarsejtjeik is jelentősen eltérnek a többi halfaj spermiumaitól. A tokalakúak spermiumainak feje hosszúkas, henger alakú, átlagosan 5 μm hosszú. A fej disztális végén található az akroszómasapka, ami a csontoshalak nagy részének spermiumaiból hiányzik. Az akroszóma a termékenyülés folyamata során segíti a spermiumfej behatolását a petesejt plazmamebránján, azonban a pontos fiziológiai szerepe a tokfélék termékenyülésében nem ismert (Pšenička et al., 2010). Az akroszómasapkát 3 db (ritkábban 2-4) endonukleáris csatorna köti össze a sejtmag alapi részében található implantációs mélyedéssel, amelyek hélix alakban átszelik a sejtmag teljes keresztmetszetét. Az akroszómasapkából alakul ki termékenyülés során egy aktin filamentum, az akroszómányúlvány. Az akroszómasapkát oldalról fajtól függően 8-13 posztero-laterális nyúlvány veszi körbe, amely a termékenyítés során feltételezhetően rögzíti a spermiumot a csírapu (mikropyle) csatornájában. Az implantációs mélyedés ad helyet a két centriólumnak. A mitokondriumok a már feljebb említett posztnukleáris csatornában foglalnak helyet, számuk valószínűleg 3-6, azonban ez a keresztmetszeti képeken nehezen igazolható. A spermiumok ostora 30-50 μm hosszú és a már ismert 9+2 szerkezetet mutatja. A tokfélék spermiumának másik érdekessége, hogy „úszókkal” rendelkezik, azaz az ostor két ellentétes oldalán két hosszában végigfutó citoplazmatikus kitüremkedés figyelhető meg (1. ábra), ami feltételezhetően a termékenyülési közegben végzett haladásukat segíti (Alavi et al., 2012b).



1. ÁBRA: Az atlanti tok (*Acipenser sturio*) spermiumai transzmissziós elektronmikroszkópos felvételen. A: akroszóma; ECS: endonukleáris csatornák; IM: implantációs mélyedés; PL: posztero-laterális nyúlvány; PN: posztnukleáris csatorna; U: „úszók”, a spermium ostorának két oldalán megfigyelhető citoplazmatikus kitüremkedések. A fehér nyíl a proximális centriólumra mutat. Fotó: Horváth Ákos

A pontyfélék (*Cyprinidae*) spermiumai a tokfélékhez képest egy rendkívül leegyszerűsített formát mutatnak és a fentebb leírt általános sémát követik. A sejtek nem rendelkeznek akroszómával. A sejtmagjuk gömbölyded vagy keresztmetszetben enyhén elliptikus, ami mindig az ostor tengelyéhez képest enyhén eltolódva helyezkedik el. A

sejtmagot egy citoplazmatikus kitüremkedés követi amely gyűrűszerűen veszi körül az ostor alapját és a poszt nukleáris csatornát. A mitokondriumok száma a kitüremkedésben 2 és 10 között változik. A centriólumok a pontyfélék spermiumaiban is a sejtmagba benyúló implantációs mélyedésben helyezkednek el. Az ostor hossza 30 és 60 μm között változik és hagyományos 9+2 szerkezetű (Bacetti et al., 1984). A pontyfélék között a compó (*Tinca tinca*) rendelkezik az egyik legkisebb spermiummal, az ostorának hossza mindössze $25,45 \pm 2,47 \mu\text{m}$ (Pšenička et al., 2006). A pontyfélék spermiumaiban nem figyelték meg a tokfélékben leírt úszószerű citoplazmatikus kitüremkedéseket az ostor két oldalán (2. ábra).



2. ÁBRA: A ponty spermiumai transzmissziós (bal) és pásztázó (jobb) elektronmikroszkópos felvételen. IM: implantációs mélyedés; M: mitokondriumok; N: sejtmag (*nucleus*); a fehér nyíl a disztális centriólumra mutat. A baloldali felvételen a skála 1 μm . Fotó: Horváth Ákos

A lazacfélék (*Salmonidae*) spermiumai bizonyos szempontból eltérnek az általános szerkezettől. A pisztrángspermiumok feji része tojás alakú, átmérője hossz tengelyben 2,5 μm , keresztmetszetben 1,5-2 μm . A fej hossz tengelye gyakorlatilag megegyezik az ostor hossz tengelyével. A centriólumok itt is egy a sejtmagba erősen betüremkedő implantációs mélyedésben ülnek és egymással derékszöget zárnak be. A mitokondriumok egyetlen megközelítőleg gyűrű alakú mitokondriális testté, kondrioszómává egyesülnek, amelyet egy belső és egy külső membrán határol (Billard, 1983). A mitokondriális test több faj esetében helikális szerkezetet vesz fel (Gwo et al., 1996; Lahnsteiner et al., 1991). Az ostor hossza 30-40 μm és az ostor két oldalán megfigyelhetők a citoplazmatikus kitüremkedések, amelyek valószínűleg a spermiumok előre haladását segítik a termékenyítő közegben.

A külső megtermékenyítéssel szaporodó halfajok spermiumai a vízben, mint szaporodási közegben aktiválódnak. Az aktiváció az előre haladó mozgás (motilitás) kiváltását jelenti. Az aktiváció feltételeitől függően azonban három különböző csoportot tudunk megkülönböztetni. A lazacfélék és tokalakúak esetében a spermiumok aktivációjáért a káliumion (K^+) koncentrációjának csökkenése felelős. A szeminális folyadékban viszonylag magas a K^+ koncentrációja, míg az ivásnak helyet adó vízben alacsony. Egyéb ionok jelenlétében (pl. Na^+) a sperma még izotóniás körülmények között is mozog (Morisawa et al., 1983a). A vízbe kikerülve a spermiumok sejtmembránja hiperpolarizálódik a K^+ -csatornákon beáramló káliumionok hatására. A hiperpolarizált membrán hatására aktiválódik az adenilil-cikláz enzimszisztéma, ami pedig cAMP-szintézist indukál. Ez vezet egy foszforilációs kaskádhoz keresztül a motilitás aktivációjához, azaz a dinein karok elmozdulásához az ostorban található mikrotubulusok mentén (Morisawa, 2008).

Az édesvízi halak nagy részében, így a pontyfélékben is a spermiumok aktivációjáért nem egy meghatározott ion koncentrációja, hanem a sejteket tartalmazó közeg ozmolalitása felelős. A szeminális folyadék magas (300 mOsmol/kg körüli) ozmolalitású közegéből kikerülő sejtek az alacsony ozmolalitású vízben aktiválódnak (Morisawa et al., 1983b). Az aktiváció folyamata ezekben a fajokban nem jár cAMP-szintézissel, azonban az ionos közeg összetétele itt is fontos szerepet játszik. Ca^{2+} -mentes közegben a pontyspermiumok nem aktiválhatók, ugyanakkor az aktivációhoz szükséges az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése, ami nyilvánvalóan Ca^{2+} -influxot feltételez a membránon keresztül (Krasznai et al., 2000). A hipoozmotikus közegben a sejtek vizet vesznek fel, ami jelentős mértékű duzzadással jár. Feltételezik, hogy a duzzadás közben átrendeződő foszfolipid membrán megnyúlása aktiválja az ionszűrőket, amelyeken keresztül megindul a káliumionok kiáramlása. Ez a sejtmembrán hiperpolarizációjához vezet, ami elindítja a Ca^{2+} -influxot, ami pedig egy máig ismeretlen aktivációs folyamatot eredményez (Morisawa, 2008).

Érdemes végül megemlíteni a tengeri halfajok spermájának aktivációját, ami a hiperozmotikus szaporodási környezet eredménye. Ebben az esetben is a mozgás aktivációja a sejten belüli Ca^{2+} -koncentráció növekedésétől függ, azonban a tengeri fajokban ez a Ca^{2+} intracelluláris forrásból és nem a sejten kívülről származik (Morisawa, 2008).

Függetlenül az aktivációs közegtől, a külső megtermékenyítésű halfajok esetében a sperma igen rövid ideig mozog. A sperma motilitása különböző fiziológiás oldatok segítségével meghosszabbítható, azonban a természetes ívási közegben (édesvíz vagy tengervíz) a mozgás időtartama 0,5-2 perc között ingadozik (Billard, 1978; Scott & Baynes, 1980; Ingerman, 2008). A tokalakúak ez alól kivételt képeznek, mivel hímivarsejtjeik 5-30 percig is képesek mozogni (Alavi et al., 2012b). A tokfélék esetében a szeminális folyadék ozmolalitása jóval alacsonyabb a csontoshalakban mérténél (~300 mOsmol/kg), fajtól függően 30-90 mOsmol/kg körüli. Így a vízben, mint szaporodási közegben a spermiumokat sokkal kisebb ozmotikus sokk éri, mint a csontoshalak spermiumait, és ez okozhatja a hosszabb motilitási időt. Az alacsony ozmolalitású szeminális folyadékért a tokfélék sajátos húgyivari szervrendszere felelős, mivel a herék a hímivarsejteket a vesén keresztül ürítik a külvilágba, és a sperma a fő vesevezetékben vizelettel keveredik (Alavi et al., 2012a). A sperma motilitásának időtartama meghosszabbítható különböző oldatok segítségével. Régi megfigyelés, hogy a lazacfélék hasüregében összegyűlő ovarialis folyadék meghosszabbítja a sperma termékenyítő képességét (Ginsburg, 1963) és motilitását, azonban ennek mértéke függ az ovarialis folyadék pH-értékétől (Wojtczak et al., 2007). Ugyanígy, a sügér (*Perca fluviatilis*) spermája is több, mint két óráig meg tudja őrizni az aktivációt követő motilitását számára kedvező körülmények között, azaz közel izotóniás sóoldatban (Lahnsteiner, 2011b).

A halak spermájának sejtsűrűsége rendszertani csoportonként változó, azonban általában magasabb, mint a gazdasági emlőssálatoké. Alavi et al. (2008) szerint a különböző halfajok spermájának sűrűsége ml-enként 2×10^6 és $6,5 \times 10^{10}$ spermium között váltakozik. A dolgozatomban tárgyalt rendszertani csoportok közül a tokalakúak spermája viszonylag híg, a sűrűség fajtól függően ml-enként $0,5-2,11 \times 10^9$ sejt között változik (Gallis et al., 1991; Glogowski et al., 2002; Havelka et al., 2016). Extrém magas értéket figyeltek meg az észak-amerikai tavi tok (*Acipenser fulvescens*) spermájában, amelynek koncentrációja $8,85 \times 10^9$ sejt/ml volt (Ciereszko et al., 2006). A ponty (*Cyprinus carpio*) spermája igen sűrű, azonban a sűrűsége igen tág határok között változik: 9×10^9 és 83×10^{10} spermium/ml közötti értékeket mértek (Christ et al., 1996), ami azonban több tényezőtől függ, pl. az egyedtől vagy a szaporodási időszak közelségétől. A lazacfélék közül a szivárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss*) ml-enként $11,80 \pm 6,19 \times 10^9$ spermiumot írtak le (Ciereszko & Dabrowski, 1993). Sebes pisztrángban (*Salmo trutta morpha fario*) az ívási időszak kezdetén ml-enként $2,91 \pm 0,03 \times 10^{10}$ spermiumról számoltak be, ami az ívási időszak végére $2,33 \pm 0,09 \times 10^{10}$ -re csökkent (Lahnsteiner et al., 2005). Végül a pénzes pér (*Thymallus thymallus*)

spermájának sűrűsége a szakirodalmi adatok szerint $12-13 \times 10^9$ sejt volt ml-enként (Lahnsteiner & Kletzl, 2012).

2.2.2 A sperma gyűjtése, tárolása és minősítése

A halfajok nagy részében a hímek a szaporítási időszakban nagy mennyiségű spermát termelnek, ami fejés útján gyűjthető be tőlük. Ez alól vannak kivételek (pl. harcsaalakúak – Siluriformes), ahol a fejés anatómiai okok miatt nem lehetséges, ezért ezekben a fajokban a halakat feláldozzák, majd a hasüregből kioperált heréből préselik ki a spermát (Legendre et al., 1996). A fejést megelőzheti hormonális indukció, amivel a sperma mennyisége, illetve térfogata növelhető. A fejés során általános alapelv, hogy el kell kerülni a sperma szennyeződését vízzel, vizelettel, illetve ürülékkel, mivel az előbbi kettő a sperma aktivációját okozhatja, az utóbbiban található baktériumok, enzimek pedig a sejteket károsíthatják. A lefejt vagy egyéb módon kinyert spermát célszerű felhasználásig alacsony hőmérsékleten (0–4°C-on, pl. olvadó jégen vagy hűtőszekrényben) tárolni, amivel szintén lassíthatjuk az ivartermekben zajló kémiai folyamatokat.

A sperma kinyerését követően meghatározzák a sperma minőségét. Halak esetében a sperma minősítésének szinte kizárólagos módja a motilitás meghatározása. Ezt végezhetik becsléssel vagy számítógépes spermavizsgálattal. A becsléssel végzett motilitásvizsgálat a legrégebbi módszer, amelyet – különösen kutatói körökben – sok kritika ért szubjektivitásáért. A módszer lényege, hogy a spermát mikroszkópos tárgylemezen aktiváló oldattal hígítják, majd $10\times-25\times$ nagyításon fénymikroszkóppal vizsgálják a mozgó sejteket, végül megbecsülik a motilitás százalékos arányát (Fauvel et al., 2010). A becslés több szempontból is pontatlan eredményt adhat. A nagy sűrűségű halsperma aktivációjakor az elégtelen hígítás eredményeként legfeljebb egy örvénylő tömeget figyelhetünk meg, ami semmiképpen nem alkalmas egy százalékos becslésre. A becslés pontossága függhet az azt végző személytől is. A problémák egy részének kiküszöbölésére javasolták egyes szerzők a sperma előhígítását egy immobilizáló oldatban, majd ennek az előhígított spermának az aktivációját igen nagy (akár $1000\times$) hígítás mellett aktiváló oldatban (Billard és Cosson, 1992). Az így végzett becsléssel már kiküszöbölhetők a túl sűrű sperma okozta pontatlanságok, azonban még így is csak a haladó mozgást végző spermiumok százalékos arányáról kapunk információt, a mozgás egyéb paramétereiről (pl. sebesség) nem.

A motilitás meghatározásának viszonylag objektívebb módja a számítógépes spermavizsgálat, vagy angol kifejezéssel Computer-assisted Sperm Analysis (CASA). Habár a CASA-rendszerek használata egyáltalán nem tekinthető újdonságnak (Amann & Hammerstedt, 1980; Amann & Waberski, 2012), a halsperma vizsgálatára csak a 90-es évek közepén kezdték el őket alkalmazni (Toth et al., 1995) és csak igen lassan terjedtek el. A rendszerek fő alkotóelemei a fáziskontraszt (sok esetben az egyéb alkalmazásokra ritkán használt negatív fáziskontraszt) mikroszkóp, a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett spermavizsgáló kamra, a mikroszkóp trinokuláris tubusára erősített kamera, amely a jelet továbbítja a képrögzítő egység (régebben video-felvevő, ma már közvetlenül a számítógép) felé, illetve a rögzített képet feldolgozó szoftver. A legtöbb gyártó komplett rendszert hoz forgalomba, azonban egyes cégek lehetővé teszik csak a szoftver megvásárlását is. Létezik ingyenes CASA szoftver is, ami az ImageJ szabad felhasználású képelemző szoftvercsomag egyik kiterjesztése (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007). Az egyre korszerűbb kameráknak és szoftveres háttérnek köszönhetően a viszonylagos objektivitáson kívül a CASA-rendszerek két fő előnye a becsléses motilitás-vizsgálattal szemben a mérési lehetőségek változatossága, illetve azok kifinomultsága, pontossága. A haladó mozgást végző spermiumok százalékos arányán kívül a CASA rendszerek mérik a sejtek sebességét (abból is három különböző

sebességet), a mozgás egyenes vonalúságát, a spermiumok fejének oldalirányú elmozdulását és számos egyéb tényezőt.

A CASA-rendszerek ugyanakkor szintén erősen függenek a felhasználótól, ami miatt az objektivitásuk csak meghatározott feltételek mellett érvényesül a becsléses motilitás-vizsgálattal szemben. A felhasználónak pl. ismernie kell a rendszer beállításait ahhoz, hogy a szoftver egyáltalán felismerje a sejteket, vagy elkülönítse azokat a nem sejtes elemektől, szennyeződésektől. A korai rendszerek esetében még az a feltétel sem érvényesült, hogy a számítógépes spermavizsgálat pontosabb eredményeket ad, mint a vizuális becslés (Krause et al., 1993). Ennek megfelelően a CASA egy fontos és hasznos eszköz a hozzáértő felhasználó kezében, azonban a jelentőségét nem szabad túlbecsülni vagy túlmisztifikálni.

A sperma minősége jellemezhető annak sűrűségével is, amit ml-enkénti sejtszámban fejeznek ki. A sűrűség mérésére alkalmasak a különböző sejtszámláló kamrák (Bürker-Türk, Thoma, Neubauer, Neubauer Improved, Makler), amelyekbe megfelelő hígítást követően kell betölteni a sejtszuszpenziót, majd a kamra egyes négyzeteiben megszámlálva, valamint a megfelelő szorzóval és a hígítási aránnyal felszorozva megkapjuk a ml-enkénti sejtszámot. A különböző sejtszámláló kamrák pontossága eltérő (Christensen et al., 2005). A sejtszámlálásra használható még a spektrofotometria, amelynek elve, hogy az adott hullámhossz-tartományban a spermaszuszpenzió fényelnyelése arányos annak koncentrációjával. A módszert először emlősökben fejlesztették ki, azonban több kutató használta halsperma sűrűségének meghatározására is (Ciereszko & Dabrowski, 1993, Fauvel et al., 1999). Emellett a halsperma sűrűségének meghatározására használhatók még olyan eszközök, amelyeknek nem ez az elsőrendű alkalmazási területe, pl. áramlási citométerek vagy Coulter számlálók (Fauvel et al., 2010).

A sperma minősége jellemezhető még a spermiumok morfológiájával, azaz alaktani épségével is. A halak esetében ezek a módszerek nagyok kevés teret kaptak, mivel a legtöbb halfaj spermiumai egyrészt nagyon kicsik, másrészt igen egyszerű szerkezetet mutatnak, amelyeken nehéz morfológiai vizsgálatokat végezni. Ennek megfelelően olyan fajokban használták a morfológiai elváltozások mérését, ahol a spermiumoknak jellegzetes alakjuk van, pl. spanyol kutatók az angolnasperma morfológiai elváltozásait mérték az ASMA (Automated Sperm Head Morphometry Analysis) szoftver segítségével (Asturiano et al., 2006). Valószínűleg használható lenne a módszer a tokfélék spermájának vizsgálatára is, azonban erről irodalmi adatokkal nem rendelkezünk.

A sperma minősítésének utolsó általam tárgyalt módszere a sejtmembrán épségének vizsgálata, amit szoktak a sperma életképességének is nevezni. A emlősök spermiumai esetében használt eozin/nigrozin festést (ahol a sérült sejtmembránnal rendelkező sejtek felveszik a sötét színű nigrozint, míg az eozin háttérfestékként szolgál) már az 50-es években kifejlesztették (Blom, 1950), azonban halakban igen ritka az alkalmazása. A tengeri süllő (*Dicentrarchus labrax*) spermájának vizsgálatára használtak ugyan ilyen festést olasz kutatók, azonban ők csak nigrozint alkalmaztak, eozint nem (Zilli et al., 2004). A fluoreszcens festési eljárások közül elterjedt a SYBR-14/propídium jodid (PI) festés, ahol a SYBR-14 áthatol az élő sejtek membránján és a sejtmag DNS-éhez kötődve zöld fluoreszcens fényt bocsát ki, míg a PI csak a sérült sejtmembránon képes behatolni és szintén a DNS-hez kötődve vörös fényt bocsát ki. A zöld és vörös sejtek aránya meghatározható mikroszkópos számlálással vagy áramlási citometriával is. Mivel a SYBR-14/PI kombinációt spermavizsgálati kit formájában is forgalomba hozzák, a használata viszonylag elterjedt és halakban is többen alkalmazták (Segovia et al., 2000; Flajshans et al., 2004; Cabrita et al., 2011). Folytattak még kísérleteket egyéb fluoreszcens festékekkel is, mint pl. a Hoechst 33258-t használtak a sérült membránnal rendelkező sejtek festésére (Asturiano et al., 2007), illetve Rh123-t a mitokondriális működés ellenőrzésére (Ogier de Baulny et al., 1997).

Érdemes még megemlíteni két másik módszert, amit halakban alkalmaztak a sperma minősítésére. A Comet assay a sejtmag DNS-tartalmának károsodását vizsgálja egy viszonylag egyszerű gél-elektroforézises eljárással, így alkalmas a genotoxicitás mérésére is (Zilli et al., 2003; Cabrita et al., 2005a). A sperma energiatartalmát kifejező ATP-koncentrációt is több kutató mérte halspermában (Perchec et al., 1995, Boryshpolets et al., 2009).

A fent felsorolt módszerek azonban halak esetében kizárólag kutatási célokat szolgálnak. A halgazdálkodás gyakorlatában a sperma minőségét adottnak tekintik és szinte soha nem vizsgálják és a termékenyítés sikerét vagy kudarcát az ikra minőségével hozzák összefüggésbe. A domesztikáció ugyanakkor bizonyítottan hatást gyakorol a tenyészállomány hím egyedei által termelt sperma mennyiségére és minőségére egyaránt. Zohar (1996) jelentése szerint a lazac különböző vonalainak szelekciója eredményeként a tejesek által termelt sperma mennyisége 20-szorosával csökkent az említett állományokban.

2.2.3 A sperma hígítása

A halaktól kinyert és minősített spermát a mélyhűtés előtt hígítani kell az ún. hűtőmediummal. A hűtőmedium két alapvető összetevőből áll, a hígítóból és a védőanyagból. A hígítók só- vagy cukoroldatok (vagy a kettő kombinációja) és feladatuk a sperma reverzibilis immobilizációja (Glenn et al., 2011). Ezt a feladatukat azzal látják el, hogy izotóniás körülményeket biztosítanak a sejteknek, illetve olyan fajokban, ahol a K^+ -koncentráció felelős a sperma aktivációjáért (pl. lazacfélék) a megfelelő káliumion-koncentrációt is tartalmazzák. Pufferrendszereik révén megakadályozzák a fagyasztás során a pH jelentős ingadozását. A hígítók segítségével a sperma a felhasználó által kívánt sűrűségűre hígítható.

A hígítónál is fontosabb szerepet játszanak a hűtőmediumban a különböző krioprotektánsok vagy védőanyagok. A védőanyagok, mint a nevük is mutatja, a fagyás károsító hatásaitól védik meg a sejteket, amit többféle módon érnek el. Csökkentik az oldatok fagyáspontját; vizet kötnek meg, amivel megakadályozzák annak beépülését a jég kristályrácsaiba, illetve feltételezhetően stabilizálják a sejtmembránokat. Kétféle védőanyagot különböztetünk meg, a sejtekbe be nem hatoló külső védőanyagokat és a sejtekbe behatolni képes belső védőanyagokat (Denniston et al., 2011). A külső védőanyagok különböző cukrok és polimerek, amelyek magának a hígítónak is a részei lehetnek, tehát a feladatuk is többféle: egyrészt fenntartják a sejteket körülvevő oldat ozmolalitását, ozmoprotektánsként megvédik a sejteket az extrém ozmotikus sokktól, az oldat elemeiként csökkentik annak fagyáspontját, valamint (elsősorban a monoszacharidok) tápanyagként is szolgálhatnak a spermiumok számára (Lanhsteiner et al., 1993). A belső védőanyagok kis molekulású anyagok, amelyek a sejtmembránon áthatolva az intracelluláris térben fejtik ki védőhatásukat. A legkorábban felfedezett belső védőanyag a glicerín volt (Polge et al., 1949), halakban is ezt használták először spermamélyhűtéshez (Blaxter, 1953). A halsperma mélyhűtéséhez a belső védőanyagok viszonylag szűk skáláját használják. A legelterjedtebb a dimetil-szulfoxid (DMSO) használata (Mounib, 1978; Legendre & Billard, 1980, Kurokura et al., 1984), ezen kívül alkalmazzák még a metanolt (Lanhsteiner et al., 1996a, 1997; Harvey et al., 1982; Horváth et al., 2003), az N,N-dimetilacetamidot (DMA, McNiven et al., 1993; Horváth & Urbányi, 2000; Morris et al., 2003; Warnecke & Pluta, 2003), az etilén-glikolt (Jähnichen et al., 1999) a propilén-glikolt (Conget et al., 1996), illetve a 2-metoxi-etanolt (Viveiros et al., 2012). Érdemes megemlíteni, hogy a külső védőanyagokat szinte mindig belső védőanyagokkal kombinálva használják.

A külső védőanyagok általában nem toxikusak, míg a belsők egy része bizonyos mértékű toxicitással bír. Ennek megfelelően koncentrációjukat is eltérő elvek alapján kell

megválasztani. Míg a külső védőanyagok esetében az ozmotikus egyensúly fenntartása és a hipo- vagy hiperozmotikus sokk elkerülése a legfontosabb tényező, a belső védőanyagok esetében a toxikus hatást is figyelembe kell venni. Így a külső védőanyagok esetében a molális (mmol) vagy moláris (mM) koncentrációt szokták megadni és ennek maximuma általában 300 mmol vagy 300 mM (ilyen alacsony koncentrációknál a két érték között nincs jelentős eltérés). A belső védőanyagok esetében is a moláris koncentráció megadása lenne a helyes, azonban a legtöbb esetben az adagolás egyszerűsége miatt a térfogatszázalékot alkalmazzák.

A hígítást követi a sperma ekvibrációja, azaz a védőanyagok felszívódása a sejtekbe. Régebben nagy jelentőséget tulajdonítottak a sperma mélyhűtés előtti ekvibrációjának, illetve az ekvibrációs idő hosszának, mivel a legrégebben védőanyagként felfedezett glicerin védőhatása 30–60 perces ekvibráció után érvényesült (Suquet et al., 2000). Szintén pozitív hatást figyeltek meg 10 perces ekvibrációt követően DMA védőanyag használata mellett (Babiak et al., 2001). A jobb motilitást és termékenyülést eredményező DMSO védőanyag esetében ugyanakkor az ekvibrációs idő inkább károsnak bizonyult, mint hasznosnak (Stoss & Holtz, 1983; Gwo, 1994), a metanol védőanyag esetében pedig az ekvibrációs idő hosszának nincs lényeges hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére (Lahnsteiner et al., 1997).

2.2.4 A sperma mélyhűtése

A hígítást és ekvibrációt követi a sperma mélyhűtése. A mélyhűtésre az elmúlt 70 évben több különböző hűtőközeget és módszert használtak. A legkorábbi hűtőközeg a szárazjég volt, amelynek szublimációs hőmérséklete (-79°C) elég alacsony volt ahhoz, hogy a sejtekben megakadályozza a jelentős mértékű jégképződést.

Szárazjégen többféle módszerrel hűtöttek halspermát. A pellet-módszer lényege, hogy a szárazjégtömb felszínébe mélyedéseket olvasztanak, amelyekbe azután belecseppentik a hígított spermát (Billard et al., 1993). A megfagyott pelleteket összegyűjtik, majd speciális tárolódobozokban cseppfolyós nitrogénben tárolják. A módszer jelentős hátránya, hogy a felolvasztáshoz külön médiumra van szükség. Tört szárazjégbe helyezett ampullákban hűtötték francia kutatók a tőkehal (*Gadus morhua*) spermáját, majd felolvasztás után 36% termékenyülést értek el (Mounib et al., 1968). A műszalmákba töltött halsperma szárazjégen végzett mélyhűtésére is ismert példa tilápiában (*Oreochromis spp.*) és az ilyen módon hűtött spermával a kontrollal megegyező termékenyülést értek el tajvani kutatók (Chao et al., 1987).

A szárazjeget azonban több ok miatt is egyre ritkábban használják a sperma mélyhűtésére. Ennek talán a legfontosabb oka, hogy a szárazjég kevésbé alkalmas a sperma tárolására, mivel a szublimációs hőmérsékletén folyamatos a jég kristályosodása és a sejtek pusztulása (lásd a 2.1 szakaszban leírtakat). Az alternatív hűtőközeg a cseppfolyós nitrogén, amelynek forráspontja -196°C . Mivel a sejteket már korábban is cseppfolyós nitrogénben tárolták, gyakorlati szempontból is feleslegessé vált a kétféle hűtőközeg használata. A cseppfolyós nitrogén nem toxikus, erős kovalens kötését megtartva nehezen vagy egyáltalán nem lép reakcióba. Kezelésével kapcsolatban néhány alapvető biztonsági intézkedéssel tisztában kell lenni. A bőrrel érintkezve súlyos fagyási sérülést okozhat, azonban ez csak néhány másodperccel a bőrre kerülés után jelentkezik, mivel a jelentős hőmérséklet-különbség hatására a nitrogén gyors párolgása egy szigetelő gázréteget hoz létre (*Leidenfrost-hatás*) a folyadék és a bőr között. A cseppfolyós nitrogén csak jól szellőzött helyiségben tárolható és használható, illetve szállítani csak az utastértől elkülönített légtérben szabad.

A halsperma többféle módon mélyhűthető cseppfolyós nitrogén gőzében. A spermamintákat valamilyen tárolóeszközbe töltik. Ezek lehetnek kriocsövek, ampullák, illetve a bikasperma mélyhűtésére kifejlesztett műszalmák. A műszalmákat Robert Cassou

fejlesztette ki Franciaországban (Cassou et al., 1993) és az egész világon elterjedtek a sperma mélyhűtésére. A műszalmák különböző térfogatban (0,25; 0,5; 1,2 és 5 ml) gyártott műanyag csövek, amelyeknek egyik végében két pamutszövet között polimer por található. A por a hozzá érő hígított sperma hatására gélesedik és megakadályozza a sperma kifolyását a műszalmákból. Ez alól az 5 ml-es makrocövek képeznek kivételt, amelyeknek mindkét vége nyitott és elzárásukra a gyártók fém vagy műanyag golyókat forgalmaznak. A halsperma mélyhűtésére kevés kivételtől eltekintve műszalmákat használnak.

A műszalmákba vagy egyéb tárolókba töltött spermát a cseppfolyós nitrogén gőzében három alapvető módszerrel lehet mélyhűteni. A cseppfolyós nitrogént egy hőszigetelő anyagból, pl. polisztirolból készült dobozba önthetjük, ilyenkor a föltte lévő gőzréteget használhatjuk a mélyhűtésre. A mintákat a folyadék felszínétől bizonyos magasságban kell elhelyezni. Ezeknek a dobozoknak a mérete igen változatos, alapvetően a felhasználó kutatótól függ a működése. Egy viszonylag jól egységesíthető mélyhűtő dobozt mutatott be Lahnsteiner (2011a) a lazacfélék spermájának mélyhűtésére. A cseppfolyós nitrogén feletti magasság illetve az itt tartás időtartamának változtatásával szabályozható a hűtés sebessége és ez jelentős hatást gyakorolhat a sperma felolvasztás utáni motilitására (Boryshpolets et al., 2017). Hasonló elven működik a kaniszteres szállítóedényben végzett mélyhűtés, amelynek sebességét még kevésbé lehet változtani, azonban ez láthatóan nem vezet jelentősebb veszteségekhez. Ezt a módszert halsperma mélyhűtésére eredetileg brazil kutatók kezdték el használni az 1980-as években (Viveiros & Godinho, 2009). A módszer előnye a polisztirol dobozban végzett mélyhűtéssel szemben, hogy amíg ez utóbbi esetében a hűtés sebességét és eredményességét jelentős mértékben befolyásolja a hűtött minták térfogata (a műszalmák száma), addig a kaniszteres kannában végzett mélyhűtéskor ilyen probléma nem jelentkezett (Horokhovatsky et al., 2017).

A programozható számítógépes hűtés kiküszöböli a fent említett két módszer legfőbb problémáját, a szabályozatlanságot. Ezek a szerkezetek egy hűtőkamrából és egy számítógépből állnak. A számítógépre telepített szoftver szabályozza a hűtés sebességét egy előre, a felhasználó által megírt program szerint. A programozható hűtőkben külön hőmérőszonda méri a kamra és a minta hőmérsékletét, ami alapján a szoftver korrigálni tudja a hűtési sebességet. A legtöbb programozható hűtő szintén a cseppfolyós nitrogén gőzét használja hűtőközegnek, azonban léteznek hűtőközeg nélküli közvetlen hőleadáson alapuló készülékek is. Halsperma mélyhűtésére már viszonylag korán elterjedt a programozható hűtők használata (Steyn & Van Vuren, 1987; Magyary et al., 1996). A programozható hűtők további előnye, hogy a szabályozatlan rendszerekkel (hűtődoboz, kaniszteres kanna) szemben lassú hűtési sebességre is képesek. A legtöbb halfaj spermájának mélyhűtésékor ez nem jelent gondot, azonban a legfontosabb laboratóriumi halfaj, a zebradánio (*Danio rerio*) spermája saját tapasztalatom alapján kifejezetten igényli a lassú hűtést.

A mélyhűtött spermát szinte kizárólag cseppfolyós nitrogénben tárolják. Erre kettős falú tartályok szolgálnak, amelyekben a két fal között hőszigetelő réteg található. A hosszabb távú tárolásra kifejlesztett tartályok falában vákuum van, ami kiváló hőszigetelő. A minták szállítására, ennek megfelelően rövidebb időtartamú tárolására szolgáló tartályok (angolul dry shipper) falában egy, a cseppfolyós nitrogént megkötő porózus anyag található. A tartályokon belül a minták elhelyezkedhetnek ún. kaniszterekben (műszalmákban hűtött minták tárolására), illetve fiókos-dobozos tárolókban (kriocövekben hűtők minták számára). A tárolás idejét kizárólag a felhasználás célja, illetve bizonyos törvényi korlátok szabályozzák, annak fizikai határai gyakorlatilag nincsenek (lásd a 2.1 szakaszban leírtakat).

A mélyhűtött halsperma-minták felolvasztását viszonylag gyorsan kell elvégezni a devitrifikáció és újrakristályosodás elkerülésére. Erre a legtöbb esetben egy 37-40°C-os vízfürdő szolgál, amibe meghatározott ideig merítik a műszalmákat vagy kriocöveket.

2.2.5 Termékenyítés a mélyhűtött spermával

A felolvasztást követően a spermát jellemzően újabb motilitásvizsgálatnak vetik alá (esetleg egyéb minőségvizsgálatnak, lásd a 2.2.1 szakaszban ismertetett módszereket), majd termékenyítést végeznek vele. A felolvasztott halsperma motilitása a legtöbb esetben alacsonyabb, mint a frissen kifejté, még akkor is, ha ismert ezzel ellentétes példa is (Viveiros et al., 2010). Korábban tartotta magát az a nézet, hogy az elérhető felolvasztás utáni motilitás rendszertani csoportonként változó, azonban a folyamatos módszertani fejlesztés eredményeként ezek a határértékek sorozatosan megdőlnék.

A mélyhűtött spermával végzett termékenyítés metodikája általában megegyezik a friss spermával végzettel. Termékenyítéskor gyakran figyelembe veszik a megfelelő sperma-ikra arányt, amivel maximalizálható a termékenyítés sikere. Mivel a felolvasztás utáni motilitás különböző paraméterei gyakran alacsonyabbak, mint a friss spermáé, a sperma-ikra arány is sokszor eltér a friss sperma esetében használttól (Ciereszko et al., 2014). A mélyhűtött spermával végzett termékenyítéskor a termékenyülés sikerét általában keléskor ellenőrzik, illetve több esetben a lárvakori károsodásokat, torzulásokat is vizsgálják (Horváth & Urbányi, 2000; Young et al., 2009).

2.2.6 A halsperma vitrifikációja

A halsperma vitrifikációja ugyan nem témája dolgozatomnak, azonban az utóbbi tíz évben olyan mértékben felkeltette a tudományos közösség érdeklődését (Cuevas-Urbe et al., 2011a,b, 2015; Figueroa et al., 2013, 2015), hogy ha röviden is, de mindenképpen érdemes tárgyalni. A halsperma vitrifikációját az teszi érdekessé, hogy a kis testméretű laboratóriumi halfajok (zebradánió, mexikói kardfarkú hal *Xiphophorus hellerii*, rizshal vagy medaka *Oryzias latipes*, szivárványos guppi *Poecilia reticulata*) spermáját a kinyerhető kis mennyiség miatt nehéz a hagyományos fagyasztással mélyhűteni. A zebradániótól általában egyedenként legfeljebb 1-1,5 μ l sperma nyerhető ki, ami még a legkisebb térfogatú, 0,25 ml-es műszalmákban is nagyon komplikálttá teszi a fagyasztást. A vitrifikáció alapvetően kis térfogatú (20-30 μ l) folyadékok esetében hatékony (Schuster et al., 2003), sőt a saját tapasztalataink alapján inkább 2,5-5 μ l-es térfogatok a reálisak (Kása et al., 2017). A sikeres vitrifikációhoz általában többféle védőanyag viszonylag magas koncentrációjú (együtt 30-40%) alkalmazása szükséges. Műszalmák helyett olyan eszközöket érdemes használni, amelyeken a hígított sperma vékony folyadékréteget vagy filmet képez. Ilyenek a különböző, vitrifikációhoz speciálisan kifejlesztett eszközök, pl. a Cryotop, illetve jól használhatók pl. a sejttenyészetekből ismert oltókacsok. A halsperma vitrifikációját kísérő jelentős érdeklődés ellenére a felolvasztás utáni motilitási és termékenyülési eredmények messze elmaradnak a hagyományos fagyasztással elérhetőktől.

2.3 A spermamélyhűtés szerepe a halak genetikai tartalékainak megőrzésében

A halsperma-mélyhűtés génmegőrzési célú fejlesztése elég gyakori és számos rendszertani csoportot érint: a tokalakúakat (Horváth et al., 2005; Ciereszko et al., 2006), a lazacféléket (Sarvi et al., 2006; Martínez-Páramo et al., 2009; Nynca et al., 2015), pontyféléket (Basavaraja & Hegde, 2004; Tiersch et al., 2004), valamint egyéb halfajokat (Asturiano et al., 2003; Maria et al., 2006; Orfão et al., 2011). Több tanulmány foglalkozott a mélyhűtés, illetve a mélyhűtött sperma alkalmazásának az adott populáció genetikai diverzitására gyakorolt hatásával is (Van Der Walt et al., 1993; Martínez-Páramo et al., 2009).

Ennek megfelelően, a mélyhűtött sperma szerepe a halpopulációk genetikai tartalékainak megőrzésében tudományosan kellőképpen megalapozott.

Egyes szerzők már a kilencvenes évek elején felvetették a mélyhűtött halsperma használatát a fajmegőrzésben, pl. az észak-amerikai lazacfélék esetében (Cloud et al., 1990), azonban a konkrét programokról kevés szót ejtettek. Az elméleti felvetést követően világszerte több mélyhűtött génbank is létrejött, amely vagy kifejezetten halsperma tárolását célozza meg, vagy halsperma-mintákat is tartalmaz. Az első ilyen génbankot 1981-ben még a volt Szovjetunióban hozta létre a moszkvai székhelyű Össz-szövetségi Tógazdasági Halászati Tudományos Kutatóintézet (Всесоюзный научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства – ВНИИПРХ) és a harkovi székhelyű Kriobiológiai és Krio-orvostani Intézet (Институт проблем криобиологии и криомедицины). A génbank a mai napig létezik, jelenlegi fenntartója azonban már csak az utóbbi intézmény, amely az Ukrán Tudományos Akadémia részlegeként működik. A génbankban több pontyfajta, tok- és lazacféle és egyéb halfajok mélyhűtött spermáját tárolják, sok minta már több, mint 30 éves. A tenyésztett halfajok (elsősorban ponty- és lazacfélék) mélyhűtött génbankjait több ország kutatóintézetei is létrehozták, pl. Izraelben (Lubzens et al., 1997), Norvégiában (O'Reilly & Doyle, 2007), Csehországban és Franciaországban (Martínez-Páramo et al., 2017). Magyarországon a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ szarvasi székhelyű Halászati Kutatóintézete hozott létre 2005-ben egy mélyhűtött génbankot, amelynek szerepe a különböző hazai és külföldi pontyfajtákból álló élő génbank támogatása és részbeni kiváltása. A génbank jelenleg is működik, 25 különböző pontyfajta spermamintáját tárolja. Európán kívül hasonló nemzeti génbankokat működtetnek az Egyesült Államokban (National Animal Germplasm Program – NAGP, www.ars.usda.gov/plains-area/fort-collins-co/center-for-agricultural-resources-research/plant-and-animal-genetic-resources-preservation/docs/national-animal-germplasm-program-nagp/) és Brazíliában a Brazil Mezőgazdasági Kutatóintézet (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, www.embrapa.br) gondozásában (Martínez-Páramo et al., 2017).

A brit Frozen Ark projektet (www.frozenark.org) 2000-ben hozta létre a londoni Természettudomány Múzeum. A projekthez csatlakozva a Bedfordshire-i Egyetem számos veszélyeztetett halfaj mélyhűtött spermáját tárolta el 2008-tól. A projekt azóta már nem csak brit génbankokat foglal magában, hanem a németországi Cryo-Brehm projektet is, amit a Fraunhofer intézeti szövetség (Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.) indított el 2007-ben és amiben több németországi pontytenyésztő is jelezte a részvételi szándékát. Nem halsperma-mintákkal ugyan, de a projekthez csatlakoztak további intézmények az Egyesült Államokból, Kanadából, Dél-Afrikából, Ausztráliából és Új-Zélandról, ami lehetővé teszi, hogy a kezdeményezés az első valóban nemzetközi és az egész világra kiterjedő génbank-hálózattá váljon.

Látható tehát, hogy a génmegőrzés szempontjából a tenyésztett és vadon élő populációk számos hasonlósággal rendelkeznek. A mélyhűtött génbankok ritka, parlagi vagy veszélyeztetett háziállatfajták, vadon élő fajok vagy fajok belüli populációk mintáinak adnak helyet. A tenyésztett halfajok esetében a génbankok potenciális felhasználási lehetősége az alacsony genetikai változatossággal rendelkező populációk nemesítése, vérfrissítése. Ez alapvető eleme a tudatos tenyésztőmunkának: a tenyésztő a saját (vagy a piac) igényeinek megfelelően formálja az általa gondozott populációt. A vadon élő fajok esetében az emberi beavatkozás megítélése már ellentmondásosabb. A vadon élő halfajok megőrzési programjaiban fogságban tartott tenyészállományokat szaporítanak, majd a fajonként változó életkorig felnevelt ivadékot telepítik ki a faj eredeti élőhelyére a vadon élő populáció fenntartására és támogatására. Ez általánosan elterjedt gyakorlat pl. Észak-Amerikában és Európában az ott élő tok- és lazacfélék állományainak utánpótlására. Mivel azonban a

telepített természetes vizek jelentős része nem csak természetvédelmi, de rekreációs-gazdasági jelentőségű (pl. horgászturizmus), maga a telepítés is csak ritkán pusztán fajmegőrzési célú. Ezt a gyakorlatot a természetvédelmi szakemberek egy része aggályosan kezeli: a faj mesterséges nevelése és telepítése helyett a természetes szaporodás és állomány-utánpótlás elősegítését tartanak helyesnek. A mélyhűtés előnyös tulajdonságait ettől függetlenül többen elismerik (Fraser, 2008). A mélyhűtés lehetővé teszi, hogy az alapító populáció genetikai változatosságának jelentős részét megőrizzük. Megakadályozhatók a mélyhűtött sperma használatával a beltenyésztés és domesztikáció káros hatásai (O'Reilly & Doyle, 2007). Ugyanakkor genetikai szempontból problémás lehet, ha a mélyhűtött mintákat viszonylag hosszú ideig nem használják fel, különösen a gyorsan adaptálódó populációk esetében. Ebben az esetben az alapító populáció és az ikrát adó (tehát jelen idejű) populáció között már jelentős genetikai különbség állhat fenn, ami introgresszióhoz, ennek következtében adaptációs nehézségekhez vezethet (Fraser, 2008). A genetikailag jelentős különbségekkel rendelkező populációk hibridizációjával és introgressziójával járó hibridizációra és a bekövetkező alkalmazkodási problémákra kísérletes példák is ismertek természetes pisztrángpopulációkban (Vincenzi et al., 2010; Muhlfeld et al., 2009).

A mélyhűtött génbankok létrehozásának egyik legproblematisabb szempontja a célok meghatározása. A legrosszabb esetre, azaz egy populáció kipusztulására való felkészülés véleményem szerint nem megfelelő cél egy génbank létrehozásához. Ha az alkalmazott fajmegőrzési program sikeres, akkor a mélyhűtött mintákra egyáltalán nem lesz szükség. Egy valóban kritikus helyzetben ugyanakkor a mélyhűtött sperma nem lesz alkalmas a populáció megőrzésére ikrás egyedek nélkül. A mélyhűtött sperma korlátlan idejű tárolása jelentős költséggel is jár, amelyhez a pénzügyi fedezet előteremtése szintén nehézségekbe ütközhet. Ennek megfelelően a mélyhűtött génbankok kialakítását gondos tervezés, a felek közötti eredményes együttműködés és a célok megfelelő kitűzése kell megelőzze.

A mélyhűtés kombinálható különböző biotechnológiai módszerekkel, amelyek segíthetnek a veszélyeztetett állományok megőrzésében. Az egyik ilyen genommanipulációs módszer az androgenezis, amelynek lényege, hogy egy inaktivált genommal rendelkező petesejtet termékenyítenek meg friss vagy mélyhűtött spermával, majd az így létrejövő haploid zigótát az első mitotikus osztódáskor valamilyen sokkhatásnak teszik ki, hogy helyreállítsák a diploid (vagy helyesebben di-haploid) állapotát (Horváth & Orbán, 1995; Dunham, 2004; Komen & Thorgaard, 2007). A módszer elvileg lehetővé teszi egy populáció helyreállítását akár egyetlen hím egyed spermájának felhasználásával is. A mélyhűtött spermát sikerrel használták fel androgenezises kísérletekben tokalakúakban (Grunina et al., 2006), lazacfélékben (Scheerer et al., 1991; Babiak et al., 2002), illetve a ponty és aranyhal közötti interspecifikus androgenezisben is (Bercsényi et al., 1998). Az androgenezis hatékonysága azonban nagyon alacsony, a diploid felnevelhető adrogenetikus utódok aránya jóval 20% alatt marad (Komen & Thorgaard, 2007). Ezen kívül az androgenetikus utód az anyától örökli a mitokondriumait (ennek következtében a mitokondriális DNS-ét is), így mindenképpen hibrid lesz, még akkor is, ha a nukleáris örökítőanyaga csak a hím szülőtől származik. A fent felsorolt problémák miatt az androgenezist ma már kevesen tekintik valódi megoldásnak a fajmegőrzésben.

Használható-e tehát a mélyhűtés a populációk védelmében és a génbanki munkákban? Meggyőződésem, hogy gondos tervezés, pontosan megfogalmazott célok és jól megválasztott módszertan mellett igen. Dolgozatom végén ismertetek két olyan területet, ahol a spermamélyhűtést sikeresen alkalmaztuk veszélyeztetett vad populációk és tenyésztett halfajták megőrzésére, illetve megfogalmazok egy jövőképet is az ivarsejt-mélyhűtés szerepéről a konzervációs programokban.

3. Anyag és Módszer

Az értekezésben ismertetett vizsgálatokat halfajok különböző csoportjaiban végeztem el. Ezek közé tartoznak a tokalakúak, pontyfélék és lazacfélék. A logikai sorrend miatt a vizsgálatokat a különböző rendszertani csoportok szerint ismertetem. Mivel a vizsgálatok egy részében a keltetőházi személyzet, illetve kollégáim, hallgatóim segítségét vettem igénybe, a szövegben szándékoltan keverten használom a többes szám első személyi és az egyes szám első személyi fogalmazást. Ennek használata minden esetben attól függ, hogy a munka meghatározó részét egyedül, vagy csapatban végeztem.

3.1 Vizsgálatok tokalakúakban

A tokalakúakkal kapcsolatos kísérleteket az Amerikai Egyesült Államokban végeztem a 2003-2005 közti időszakban. Az egyes fajokkal különböző helyszíneken végeztem a vizsgálataimat:

- Rövidorrú tok (*Acipenser brevirostrum* Lesueur, 1818) – Bears Bluff National Fish Hatchery, 7030 Bears Bluff Rd, Wadmalaw Island, South Carolina 29487
- Sápadt tok (*Scaphirhynchus albus* Forbes & Richardson, 1905) – Natchitoches National Fish Hatchery, 615 South Dr, Natchitoches, Louisiana 71457
- Ásóorrú tok (*Scaphirhynchus platyrhynchus* Rafinesque, 1820) – Natchitoches National Fish Hatchery, 615 South Dr, Natchitoches, Louisiana 71457
- Lapátorrú tok (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792) – Aquaculture Research Center, Kentucky State University, 103 Athletic Road, Frankfort, Kentucky 40601

Az analitikai vizsgálatok egy részét a Louisianai Állami Egyetem Akvakultúra Kutatóállomásán (Aquaculture Research Station, Louisiana State University, 2410 Ben Hur Rd. Baton Rouge, LA 70820) végeztem.

3.1.1 A kísérleti állományok tartása, szaporítása és az ivartermék gyűjtése

A rövidorrú tok tenyészállományát 2864 és 4820 literes műanyag tartályokban tartottuk 16°C-on. A tenyészállomány átlagéletkora 13 év volt. A halakban a spermiációt és az ovulációt a szaporítási időszakban (március) pontyhipofízis-oldat hasüregbe injektálásával indukáltuk. A tejes egyedek 1 mg/testtömeg kg dózist kaptak egy adagban, míg az ikrások dózisa 4 mg/testtömeg kg volt két adagra elosztva. A tejesek 24 órával a tervezett fejés előtt kapták meg a teljes hormondózist, míg az ikrások a teljes dózis 10%-át előadagként, a fennmaradó 90%-ot pedig döntőadagként 12 órával később kapták.

A tejesek spermáját az ivarnyílásba illesztett szilikoncsövön keresztül fejtük steril száraz fecskendőbe, amiket felhasználásig 4°C-on tároltunk. Az ikrásoktól az ikrát fejéssel nyertük ki. Amint az ovuláció jeleként az első ikraszemek megjelentek a tartály alján, az egyedek ivarnyílásának tájékát szárazra töröltük, majd a halaktól egy adagban kifejhető ikrát száraz fémtálakban fogtuk fel. Mivel az egy alkalommal így kinyerhető ikra mennyisége korlátozott

(legfeljebb 100 g), a fejést 4-5 alkalommal megismételtük az alkalmak között kétórás eltéréssel. Az ikrát fejést követően 30 percen belül felhasználtuk termékenyítésre.

A sápadt tok tejeseit 18°C-on tartottuk. A halakban a spermiációt 10 µg/testtömeg kg Ovaprim luteinizáló hormon releasing hormon (LHRH) analóggal váltottuk ki. A hormonkészítményt a hátizomzatba injektáltuk. A spermát a rövidorrú toknál leírt módon nyertük ki és tároltuk 4°C-on 15 ml-es csavaros kupakkal ellátott centrifuga-csövekben. Mivel a vizsgálatokhoz nem rendelkezünk sápadt tok ikrásokkal, ezért a közeli rokon ásóorrú tok nőtény egyedek ikráját használtuk a vizsgálatokhoz. Az ásóorrú tok ikrásokat szintén 18°C-on tartottuk, és az ovuláció kiváltására 100 µg/testtömeg kg Ovaprim LHRH analógot használtunk, amit két adagban (előadag a teljes dózis 10%-a és döntőadag a teljes dózis 90%-a) oltottunk be a halak hátizomzatába 12 órás eltéréssel. Az ovuláló halaktól az ikrát a rövidorrú tok esetében leírtakkal megegyező módon, 2 órás időközönként nyertük ki. A vizsgálatokban két ikrás ivartermékét használtuk fel.

A lapátorrú tok tejes egyedeit 3000 literes körkörös tartályokban tartottuk 19°C-on 12 l/óra vízfolyás mellett. A tejesek spermiációját LHRH analóg 50 µg/testtömeg kg dóziséval indukáltuk, amelyet egy adagban a halak hasüregébe fecskendeztünk legalább 24 órával a tervezett fejés előtt. A spermát a fent leírt módon fejtük ki és felhasználásig 25 ml-es sejtenyésző edényekben tároltuk olvadó jégén. Az ikrásoknak az ásóorrú tok esetében leírtaknak megfelelően 100 µg/testtömeg kg Ovaprim LHRH-t adtunk 10% előadagra és 90% döntőadagra elosztva, 12 órás várakozási idővel a két adag között. Az ovulációra általában 12-16 órával a döntő adag beadását követően került sor. Az elbódított halak hasán egy 3-4 cm hosszú bemetszést ejtettünk és az ikrát azon keresztül fejtük ki. Az ikra kinyerése után a bemetszést steril sebészeti cérnával bevarrtuk és a halakat visszahelyeztük a medencéjükbe.

A spermaminták motilitását az összes vizsgált fajban fénymikroszkópos vizsgálattal becsültem meg. Egy tárgylemezen 2 µl spermát kevertem bele 20 µl keltetőházi vízbe, majd sötét látótérben, 200× nagyításon figyeltem meg a sejtek mozgását. A lapátorrú tok esetében aktiváló oldatot (20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; Cosson et al., 2000) használtam keltetőházi víz helyett. Mindent spermavizsgálatot kétszeres ismétlésben végeztem el. A sperma koncentrációját 100× hígításban határoztuk meg, a rövidorrú és sápadt tok esetében Makler-, a lapátorrú tok esetében pedig Bürker- vagy Neubauer-kamrás vizsgálattal.

3.1.2 A sperma mélyhűtése

A tokalakúak spermáját minden esetben 1:1 arányú hígításban, cseppfolyós nitrogén gőzében mélyhűtöttük. A mélyhűtéshez a spermát különböző összetételű hígítóban hígítottuk (1. táblázat), amelyhez a vizsgálatról függően adagoltunk metanol vagy dimetilszulfoxid (DMSO) védőanyagot 5-15% végső koncentrációban.

A felhígított spermát 0,5 ml térfogatú műszalmákba szívtuk fel, kivéve a lapátorrú tokét, amelyben 5 ml térfogatú műszalmát is használtunk. Ez utóbbi esetben a műszalmák két végét felforrósított csipesszel zártuk le a sperma kifolyásának megakadályozására. A műszalmák mélyhűtésére egy cseppfolyós nitrogénnel töltött polisztirol dobozban került sor. A cseppfolyós nitrogén felszínére egy 3 cm magas polisztirol keretet helyeztünk, majd erre fektettük rá a megtöltött műszalmákat. A hűtés ideje a műszalma méretétől függött, a 0,5 ml-es műszalmák esetében 3 perc, az 5 ml-es műszalmák esetében 5, illetve 7 perc volt. A műszalmákat felhasználásig kaniszteres kannában tároltuk. A minták felolvasztására 40°C-os vízfürdőben került sor, a felolvasztás ideje 0,5 ml-es műszalmák esetében 13 másodperc, míg az 5 ml-es műszalmák esetében 40 másodperc volt.

A hűtés sebességét digitális hőmérővel (OM-550, Omega Engineering, Stamford, CT, USA) mértük. A hőmérő szondáját egy hígítóval és védőanyaggal (10% metanol vagy 10% DMSO) megtöltött műszalmába helyeztük és azt a polisztirol hűtőkeretre fektettük. A hőmérsékleti értékeket 5 (0,5 ml-es műszalma esetében), illetve 1 (5 ml-es műszalma esetében) másodpercenként jegyeztük fel, majd számítógépes programmal ábrázoltuk a hűtési görbét.

1. TÁBLÁZAT: A tokalakúak spermájának mélyhűtéséhez használt hígítók kémiai összetétele mM-ban kifejezve. mT: módosított Tsvetkova-féle hígító, oT: eredeti Tsvetkova-féle hígító, mHBSS: módosított Hanks-féle sóoldat. A módosított Hanks-féle sóoldat alábbi összetétele a koncentrációra vonatkozik, amit 100 mOsmol/kg-ig hígítottunk desztillált vízzel.

Hígító neve	NaCl	KCl	CaCl ₂ • 2H ₂ O	MgSO ₄ • 7H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	Glükóz	Szacharóz	Tris	Ozmolalitás (mOsm/kg)
mT		0,25							23,40	30	82
oT									23,40	118	222
mHBSS	137	5,36	1,09	0,81	0,45	0,44	4,17	5,55			100

3.1.3 Termékenyítés a mélyhűtött spermával

A felolvasztást követően ismét ellenőriztük a minták motilitását, a friss spermánál leírt módon. A termékenyítés körülményei minden faj esetében különbözők voltak, ezért itt csak a közös jellemzőket ismertetem.

Termékenyítéshez az ikrát száraz műanyag edényekbe adagoltuk ki az adott kísérletnek megfelelő mennyiségben. Minden esetben száraz termékenyítést alkalmaztunk, azaz a friss vagy felolvasztott spermát kevertük először az ikrához, majd ezt követően aktiváltuk az ivarsejteket keltetőházi víz hozzáadásával. Azokban a kísérletekben, ahol a ragadósság elvétele nélkül inkubáltuk a termékenyített ikrát, az ikraszemeket egyetlen rétegben terítettük ki a termékenyítő edény aljára, majd az edényeket áramló vízbe (12 l/perc) helyeztük. Azokban az esetekben, amikor sor került az ikrá ragadósságának elvételére, a termékenyítést követően a ikrához agyagoldatot adtunk és azt folyamatos keverés mellett duzzasztottuk 30 percig. Ezt követően az ikrát 7 l-es McDonald-típusú keltetőedénybe helyeztük és kelésig abban inkubáltuk. A termékenyülés sikerességét 4-8 sejtes állapotban, gerinchúros vagy szívveréses stádiumban, illetve kelés körül ellenőriztük. A termékenyülési és kelési arányokat a termékenyült és termékenyített ikraszemek hányadosaként, százalékos formában fejeztük ki.

3.1.4 A felolvasztott sperma életképességének vizsgálata

A sperma életképességét a sejtmembrán épségével jellemeztük, amit áramlási citometriával mértünk. A sejtmembrán épségét kettős festéssel ellenőriztük, ahol a SYBR-14 magfesték áthatol az ép sejtmembránon és a sejtmagban található DNS-hez kötődve fluoreszcens zöld fényt bocsát ki. A halott sejtek festésére használt propídium-jodid (PI) csak a sérült sejtmembránon keresztül tud bejutni a sejtekbe, ahol szintén a sejtmag DNS-éhez kötődve megfelelő gerjesztést követően fluoreszcens vörös fényt bocsát ki. A zöld és vörös fényt kibocsátó sejtek aránya adja a sperma életképességét.

A felolvasztott spermát 10 ml, a mélyhűtésre használt hígítóban oldottuk fel, annak érdekében, hogy a ml-enkénti sejtsűrűség megközelítőleg 10⁶ legyen. Öt µl SYBR-14-et (20

μM) adagoltunk 250 μl sejtszuspenzióhoz, amit 24°C -on sötétben inkubáltunk 10 percig. Az inkubációt követően a szuspenzióhoz 2,5 μl PI-t (1 mM) adagoltunk és újból az említett módon inkubáltuk. A sejtszuspenziót ezt követően FACSCALIBUR (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) áramlási citométerrel vizsgáltuk két ismétlésben. A vizsgálat sebessége kb. 300 sejt/másodperc volt. A vizsgálat előtt a készüléket jelölt fluoreszcens gyöngyökkel és a FACSCOMP szoftverrel kalibráltuk. A sejtszuspenziók vizsgálati eredményeit 10 000 esemény (sejt) adatai alapján kétdimenziós pontdiagrammon ábrázoltuk, majd ez alapján kapuztuk ki az élő és halott sejteket. Az adatok vizsgálatát a CELLQUEST szoftverrel végeztük.

Az áramlási citometriás vizsgálat érvényességét friss rövidorrútok-spermával ellenőriztük. Az egy egyedtől származó spermát a gyűjtést követően 24 órán belül használtuk fel. A ml-enként 10^6 sejtet tartalmazó szuspenziót 80°C -os vízfürdőbe merítettük 10 percre, így ölve el a sejteket. Ezek után az elölt és élő sejteket tartalmazó szuspenziókból ismert arányú (0, 25, 50, 75 és 100% élő) keverékeket képeztünk és a fent említett módon vizsgáltuk két ismétlésben.

3.1.5 Az eredmények statisztikai értékelése

Az eredmények statisztikai vizsgálatát SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) és GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) statisztikai szoftvercsomagokkal végeztük. A kapott motilitás, termékenyülés, kelés és életképesség eredményeket homogenitás- és normalitás-vizsgálatoknak vetettük alá és ahol szükséges volt, az adatokat transzformáltuk. A szignifikancia-szintet $\alpha = 0,05$ -ben határoztuk meg minden vizsgálat esetében. A vizsgált kísérleti tényezők fő hatásának meghatározására azok számától (2, 3 vagy 4) függő többtényezős variancia-analízist használtunk $\alpha = 0,05$ szignifikanciaszint mellett. Az adott vizsgálati tényezőket az egyes vizsgálatok leírásánál tárgyalom részletesen.

3.1.6 Az egyes tokalakú fajokban végzett vizsgálatok

3.1.6.1 Rövidorrú tok fajban végzett vizsgálatok

1. A védőanyag fajtájának és koncentrációjának hatása a mélyhűtött sperma motilitására, termékenyítő- és életképességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Védőanyagok: metanol vagy DMSO;

1.1.2. Védőanyag-koncentrációk: 5, 10 vagy 15%;

1.1.3. Termékenyítéshez használt sperma mennyisége: 1 műszalma vagy fél műszalma.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás (%);

1.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejttes embriókban (%);

1.2.3. Termékenyülési arány gerinchúros embriókban (%);

1.2.4. Kikelt ivadékok aránya (%);

1.2.5. Életképes spermiumok aránya (%).

A vizsgálatot két egymást követő héten végeztük el, mindkét alkalommal 3-3 tejes és 1-1 ikrás egyed ivartermékének felhasználásával. A spermát mT hígítóval hígítottuk és a fent ismertetett védőanyagokat adagoltuk hozzá. A mélyhűtéshez 0,5 ml-es műszalmákat használtunk. A termékenyítéshez az ikrát 140-310 ikraszemet tartalmazó adagokba osztottuk el, majd a termékenyítés egy egész (500 μl) vagy egy fél (250 μl) műszalmányi felolvasztott

spermával termékenyítettük meg. A kontroll csoport termékenyítéséhez ugyanazon tejesek friss spermáját használtuk a mélyhűtött spermával megegyező mennyiségben (hígítás nélkül 250 vagy 125 μ l). Az ikra ragadosságát agyagoldattal vettük el a 3.1.3 szakaszban ismertetett módon. A termékenyülést 4-8 sejtes állapotban, gerinchúros embriókban, illetve keléskor ellenőriztük. A kísérleti tényezők hatását a végpontokban mért paraméterekre háromtényezős varianciaanalízissel határoztuk meg.

2. Különböző hígítók hatása a mélyhűtött sperma motilitására, termékenyítő- és életképességére.

2.1. Kísérleti tényezők:

2.1.1. Hígítók: mT, oT és mHBSS;

2.1.2. Védőanyag-koncentrációk (csak metanol): 5, 10, 15%.

2.2. Végpontok:

2.2.1. Felolvasztás utáni motilitás (%);

2.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejtes embriókban (%);

2.2.3. Kikelt ivadékok aránya (%);

2.2.4. Életképes spermiumok aránya (%).

A vizsgálat körülményei megegyeztek az elsőével. Kívételt képez, hogy ebben az esetben a termékenyülést csak egy műszalmányi spermával végeztük el, és nem vizsgáltuk a termékenyülést gerinchúros embriókban. A hígítók ozmolalitását védőanyagok nélkül és azok (metanol és DMSO) különböző koncentrációinak (5, 10 és 15%) jelenlétében Wescor 5500 páramérés-ozmométerrel (Wescor, Logan, UT, USA) mértük meg. A kísérleti tényezők hatását a végpontokban mért paraméterekre kéttényezős varianciaanalízissel határoztuk meg. A hígítók, védőanyagok és ezek koncentrációinak az ozmolalitásra gyakorolt hatását háromtényezős varianciaanalízissel számítottuk ki.

3.1.6.2 Sápadt tok fajban végzett vizsgálatok

1. Kétféle hígító és védőanyag-koncentráció hatása a mélyhűtött sperma motilitására, termékenyítő- és életképességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Hígítók: mT, mHBSS;

1.1.2. Védőanyag-koncentrációk (csak metanol): 5 és 10%.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás (%);

1.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejtes embriókban (%);

1.2.3. Termékenyülési arány szívveréses embriókban (%);

1.2.4. Életképes spermiumok aránya (%).

A vizsgálatához 3 sápadt tok tejes és 2 ásóorrú tok ikrás egyed ivartermékét használtuk fel. A spermát a fent felsorolt két hígítóval hígítottuk és metanol védőanyagot adagoltunk hozzá. A mélyhűtéshez 0,5 ml-es műszalmákat használtunk. A termékenyítési kísérletekhez az ikrát 2 g-os (122-187 ikraszem) adagokra osztottuk fel. Minden adagot egy műszalmányi mélyhűtött spermával termékenyítettük meg, majd 5 ml keltetőházi víz hozzáadásával aktiváltuk az ivarsejteket. A megtermékenyített ikrát hagytuk letapadni a termékenyítő edény aljára, amit áramló vízbe helyeztünk. A kontroll csoport termékenyítésére 250 μ l friss sápadttok-spermát használtunk. A termékenyítést 4-8 sejtes állapotban, illetve szívveréses embriókban határoztuk meg. A kísérleti tényezők hatását a végpontokban mért paraméterekre kéttényezős varianciaanalízissel határoztuk meg.

3.1.6.3 Lapátorrú tok fajban végzett vizsgálatok

1. Kétféle hígító és védőanyag hatásának vizsgálata a mélyhűtött lapátorrútok-sperma felolvasztás utáni motilitására, termékenyítő- és életképességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Hígítók: mT, mHBSS;

1.1.2. Védőanyagok: metanol és DMSO;

1.1.3. Védőanyag-koncentrációk: 5 és 10%.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás;

1.2.2. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;

1.2.3. Életképes spermiumok aránya.

A vizsgálathoz 3 tejes és egy ikrás egyed ivartermékét használtunk fel. A mélyhűtéshez ebben az esetben is 0,5 ml-es műszalmákat használtunk. A termékenyítéshez az ikrát 4 g-os (400 ikraszem) adagokra osztottuk és száraz üvegedényekbe osztottuk szét. A termékenyítéshez egy műszalmányi felolvasztott spermát használtunk fel, a kontroll csoport termékenyítésére pedig 250 µl friss spermát. Termékenyítőoldatként 5 ml keltetőházi vizet használtunk. A megtermékenyített ikrát hagytuk letapadni az üvegedények aljára, majd az edényeket áramló vízbe helyeztük. A termékenyülés eredményességét ebben az esetben csak 4-8 sejtes állapotban határoztuk meg. A kísérleti tényezők hatását a végpontokban mért paraméterekre háromtényezős varianciaanalízissel határoztuk meg.

2. A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek termékenyülése és kelése közötti különbségek vizsgálata.

2.1. Kísérleti tényezők:

2.1.1. Különböző tejes egyedek.

2.2. Végpontok:

2.2.1. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;

2.2.2. Kelési arány.

A vizsgálathoz 3 tejes és egy ikrás egyed ivartermékét használtuk fel. A mélyhűtéshez mT hígítót, 5% metanol védőanyagot és 0,5 ml-es műszalmákat használtunk. A termékenyített ikrát 40 g-os (4000 ikraszem) adagokra osztottuk szét. Mindegyik adagot 5 műszalmányi felolvasztott spermával termékenyítettük meg, tejes egyedenként 4 ismétlésben. Az ikra ragadósságát agyagoldattal szüntettük meg, majd az ikrát McDonald-féle keltetőedényekben inkubáltuk. A termékenyülés sikerességét 4-8 sejtes állapotban, illetve keléskor határoztuk meg. Az adott tejes egyedek mélyhűtött spermájával kapott termékenyülési és kelési eredmények közti különbségeket kétmintás t-próbával vizsgáltuk.

3. A védőanyag-koncentráció hatása a mélyhűtött lapátorrútok-sperma termékenyítő képességére.

3.1. Kísérleti tényezők:

3.1.1. Védőanyag-koncentrációk: 5 és 10%.

3.2. Végpontok:

3.2.1. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;

3.2.2. Kelési arány.

A vizsgálathoz 3 tejes és egy ikrás egyed ivartermékét használtuk fel. A mélyhűtéshez mT hígítót, metanol védőanyagot (két koncentrációban) és 0,5 ml-es műszalmát használtunk. A termékenyítéshez az ikrát 4 g-os adagokra osztottuk szét, amit egy műszalmányi mélyhűtött spermával termékenyítettünk meg, illetve 40 g-os adagokra, amelyeket pedig 5 műszalma felolvasztott spermával. A 4 g-os adagokban az ikrát 4-8 sejtes állapotig inkubáltuk és kiszámoltuk a termékenyülési arányt. A 40 g-os adagokat a ragadósság elvétele után McDonald-féle keltetőedényekben inkubáltuk és keléskor leszámoltuk a kikelt lárvák arányát.

Kísérleti tényező (védőanyag-koncentráció) hatását a termékenyülési és kelési arányra egyszempontos varianciaanalízissel vizsgáltuk.

4. A védőanyag-koncentráció és a hűtési idő hatása az 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött lapátorrútok-sperma termékenyítő képességére.

4.1. Kísérleti tényezők:

4.1.1. Védőanyag-koncentrációk: 5 és 10%;

4.1.2. Hűtési idők (5 és 7 perc).

4.2. Végpontok:

4.2.1. Termékenyülési arány 4-8 sejtes állapotban;

4.2.2. Kelési arány.

A vizsgálathoz 3 tejes és egy ikrás egyed ivartermékét használtuk fel. A mélyhűtéshez mT hígítót, metanol védőanyagot (két koncentrációban, 5 és 10%), 5 ml-es műszalmákat és két hűtési időt (5 és 7 perc) használtunk. Termékenyítéskor 40 g ikrát termékenyítettünk meg egy műszalmányi felolvasztott spermával és az ikra ragadósságát agyagoldattal szüntettük meg. A termékenyülést 4-8 sejtes állapotban határoztuk meg, illetve kiszámoltuk a kelő lárvák arányát.

3.2 Vizsgálatok ponty fajban

3.2.1 A kísérleti állományok tartása, szaporítása és az ivartermék gyűjtése

A pontyfélék közül a vizsgálataimat kizárólag ponty (*Cyprinus carpio* Linnæus, 1758) fajban végeztem. A vizsgálatokat a Haltermelői Országos Szövetsége (jelenleg: Magyar Akvakultúra és Halászati Szakmaközi Szervezet) Dinnyési Ivadékevelő Tőgazdaságában, illetve a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén végeztem. A kísérletekhez a Dinnyési Tükrös pontyfajta egyedeit használtam. A teleltető tavakban tartott anyaállományt 48 órával a tervezett szaporítás előtt szállítottuk be a keltetőházba, ahol 20-21°C-on tartottuk őket. A spermiáció és az ovuláció kiváltására Ovopel emlős GnRH-analógot használtunk, amelynek dózisa azonos volt mindkét ivar esetében, azaz 1 egység testtömeg kg-onként. A tejes egyedek a teljes dózist 24 órával a tervezett fejés időpontja előtt kapták meg, míg az ikrások két adagban, az előadagot (a teljes dózis 10%-a) 24 órával, a döntőadagot (a teljes dózis 90%-a) pedig 12 órával a tervezett fejés előtt kapták meg. Az ikrás egyedek ivarnyílását bevarrtuk, hogy megakadályozzuk az ikra elszórását.

Az ivartermék gyűjtésére altatásban került sor. A halak elbódítására Quinaldin 5‰-es oldatát használtunk. A tejesek ivarnyílását szárazra töröltük és minden egyedről kb. 10 ml tejet fejtünk 12 ml-es kémcsövekbe. A spermát felhasználásig 4°C-on tároltuk. Az ikrások esetében az ikrát száraz tálakba fejtük és környezeti hőmérsékleten (23-24°C) tároltuk felhasználásig, de legfeljebb 30 percig.

A spermaminták motilitását fénymikroszkópos vizsgálattal határoztam meg. Kb. 0,2 µl spermát 20 µl keltetőházi vízzel kevertem el egy tárgylemezen és a motilitást 200× nagyításon becsültem meg. Csak az 50%-nál magasabb motilitással rendelkező mintákat használtam fel a mélyhűtési kísérletekhez.

3.2.2 A sperma mélyhűtése

A pontysperma mélyhűtéséhez minden esetben egy 350 mM glükóz és 30 mM Tris összetételű hígítót használtam, amelynek pH-értékét 8,0-ra állítottam be tömény sósavval. A hígítóhoz metanol védőanyagot adagoltam úgy, hogy annak végső (hígítás utáni)

koncentrációja 10% legyen. A spermát 1:9 arányban (sperma:hígító+védőanyag) hígítottam. A hígított spermát 1,2 és 5 ml-es műszalmákba töltöttem úgy, hogy az 1,2 ml-esekbe 1, az 5 ml-esekbe pedig 4 ml folyadék került. A mintákat a tokalakúak esetében leírt módon hűtöttem cseppfolyós nitrogén gőzébe. Az egyetlen különbség a hűtés idejében volt, ami 1,2 ml-es műszalmák esetében 3, 4, 5 vagy 6 perc, míg az 5 ml-es műszalmák esetében 3, 5, 7 vagy 9 perc volt. A mintákat 40°C-os vízfürdőben olvasztottam fel, a felolvasztás ideje 1,2 ml-es műszalmák esetében 20, 5 ml-es műszalmák esetében pedig 40 másodperc volt.

A hűtési sebességet digitális hőmérő segítségével mértem meg, mind a 1,2 ml-es, mind az 5 ml-es műszalmákban. A műszalmákba hígítót és 10% metanolt töltöttem, majd egy K típusú hőmérőszondát vezettem beléjük, ami a digitális hőmérőhöz csatlakozott. A műszalmákat a 3 cm magas polisztirol keretre fektettem, ami a cseppfolyós nitrogén felszínén úszott. A hőmérsékletet 1 másodperces intervallumonként jegyeztem fel. A kapott értékek alapján kiszámoltam a hűtés átlagos sebességét, illetve számítógépes programmal megrajzoltam a hűtési görbét is. A méréseket mindkét műszalma-típus esetében háromszor ismételttem meg.

3.2.3 Termékenyítés a mélyhűtött spermával

A termékenyítéshez felhasznált ikra és sperma mennyisége kísérletenként eltért, ezt az egyes kísérletek leírásánál ismertetem. Termékenyítéskor száraz termékenyítést alkalmaztam, azaz az ikrához először a spermát adtam hozzá, majd utána a termékenyítő oldatot. A ivarsejteket keltetőházi víz hozzáadásával aktiváltam. Két perc keverés után a termékenyített ikrához Woynárovich-oldatot (0,4% NaCl, 0,3% karbamid) adagoltam, amelyben kb. egy órán keresztül duzzasztottam az ikrát. A duzzasztást követően az ikra ragadosságát véglegesen 5% csersavoldatos fürdővel vettem el, amelynek időtartama 20 másodperc volt. Ez után 7 l-es Zuger-üvegekben inkubáltam az ikrát kelésig. Keléskor meghatároztam a kelő ivadék százalékos arányát, illetve a torz fejlődésű ivadék arányát az összes kikelthez képest. A torzulások különböző típusúak lehetnek: szívburok-vizenyő, gerinctorzulások, rendellenesen fejlődött farki rész, illetve szervek, szervrendszerek hiánya.

3.2.4 Kromoszóma-preparálás a kikelt ivadékból

A kromoszómavizsgálatokhoz nem táplálkozó lárvákat (szabadembriókat) használtam. A kromoszóma-preparálást a torz ivadékból végeztem, kivéve a kontroll csoportot, ahol mind a torz, mind az alaktanilag ép lárvákból válogattam ki egyedeket a vizsgálathoz.

Üveg Petri-csészékben 50-100 ivadékot inkubáltam 0,05%-os kolhicin-oldatban 3 órán keresztül. A kolhicin-oldat eltávolítását követően a szabadembriókat 25 percig 0,075 M KCl-oldatban hipotonizáltam, majd metanol és ecetsav 3 : 1 arányú elegyében rögzítettem őket. A preparátumokat minden vizsgálati kezelés esetében 8-20 rögzített ivadékból készítettem. Az egyedeket 50% ecetsavoldatban szuszpendáltam, majd a szuszpenziót tárgylemezre cseppentettem. A száradást követően az elkészült tárgylemezeket 4%-os Giemsa-oldatban festettem 8 percig. A kromoszómákat fénymikroszkóppal vizsgáltam, illetve számoltam meg 1000× nagyításon. A jól sikerült metafázisokról digitális felvételt készítettem. Végpontként a haploid, diploid, illetve bizonytalan ploidiajú egyedek arányát hasonlítottam össze.

3.2.5 Az eredmények statisztikai értékelése

Az eredmények értékeléséhez a GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) statisztikai szoftvert használtam. Az egyes vizsgálatok eredményeinek

értékelésére eltérő statisztikai próbákat alkalmaztam, amelyeket a vizsgálatok leírásánál külön ismertetek.

3.2.6 A ponty fajban végzett vizsgálatok részletes ismertetése

1. A hűtési idő hatása az 1,2 illetve 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött pontysperma termékenyítő képességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Hűtési idők:

1.1.1.1. 1,2 ml-es műszalmáknál: 3, 4, 5 és 6 perc;

1.1.1.2. 5 ml-es műszalmáknál: 3, 5, 7 és 9 perc.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Kelő ivadék százalékos aránya.

A vizsgálatban 4 tejes egyed spermáját és 3 ikrás összekevert ikráját használtuk fel. Az 1,2 ml-es műszalmában mélyhűtött spermával 20 g-os ikradagokat termékenyítettünk meg, míg az 5 ml-es műszalmában mélyhűtött spermával pedig 80 g-osakat. A termékenyítéshez 2 (20 g-os ikratételek) vagy 8 ml (80 g-os ikratételek) keltetőházi vizet használtunk. A kontroll csoportok ikratételeit 0,1 (20 g-os ikratételek) vagy 0,4 ml (80 g-os ikratételek) spermával termékenyítettük meg. A hűtési idők fő hatását a kelő lárvák arányára egyszempontos varianciaanalízissel vizsgálunk $\alpha = 0,05$ szignifikanciaszint mellett, míg az egyes kezelések közti különbségeket Tukey-próbával.

2. A sperma-ikra arány hatása az 1,2 és 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött pontysperma termékenyítő képességére, illetve az ivadékkori torzulásokra.

2.1. Kísérleti tényezők:

2.1.1. Különböző térfogatú műszalmák: 1,2 ml és 5 ml;

2.1.2. Különböző ikratételek:

2.1.2.1. 1,2 ml-es műszalmáknál: 10, 20 és 30 g;

2.1.2.2. 5 ml-es műszalmáknál: 40, 80 és 120 g.

2.2. Végpontok:

2.2.1. Kelő ivadékok százalékos aránya;

2.2.2. Torz felődésű ivadékok százalékos aránya;

2.2.3. A torz fejlődésű ivadékok ploidijája.

A vizsgálatban az előzőhöz hasonlóan 4 tejes egyed spermáját és 3 ikrás összekevert ikráját használtam fel. A mélyhűtéskor az 1,2 ml-es műszalmák esetében a hűtési idő 4 perc, az 5 ml-es műszalmák esetében 5 perc volt. Az ikrát az 1,2 ml-es műszalmákban mélyhűtött sperma esetében 10, 20 vagy 30 g-os adagokra osztottam fel, az 5 ml-es műszalmák esetében pedig 40, 80 vagy 120 g-osakra. Az ikratételeket minden esetben egy műszalma tartalmával termékenyítettem meg, ami a 10, illetve 40 g-os ikratételek esetében $1,775 \times 10^6 : 1$, a 20 és 80 g-os ikratételek esetében $8,875 \times 10^5 : 1$, a 30 és 120 g-os ikratételek esetében pedig $5,917 \times 10^5 : 1$ sperma-ikra arálynak felelt meg. A kontroll csoport esetében 80 g ikrát termékenyítettem meg 0,4 ml friss pontyspermával. Az eredmények értékelésekor kétszempontos varianciaanalízist használtam $\alpha = 0,05$ szignifikanciaszint mellett a kétféle műszalma-típusnak és a különböző sperma-ikra arányoknak a kikelt lárvák százalékos arányára, illetve a torz lárvák százalékos arányára gyakorolt fő hatásának meghatározására. Ezen kívül vizsgáltam a torz lárvák ploidiját is.

3.3 Vizsgálatok lazacfélékben

A lazacfélékben végzett vizsgálataimat a tokfélékhez hasonlóan különböző helyszíneken végeztem a 2009-2014 közötti időszakban. Az egyes fajokkal végzett vizsgálatok helyszínei a következők voltak:

- Sebes pisztráng (*Salmo trutta morpha fario* Linnæus, 1758) – Hoitsy & Rieger Kft., Lillafüredi Pisztrángtelep, 3517 Miskolc-Lillafüred, Erzsébet sétány 55.
- Márványpisztráng (*Salmo marmoratus* Cuvier, 1829) – Tolmini Horgászegyesület, Trg 1. maja 7, 5220 Tolmin, Szlovénia.
- Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) – INRA Fish Physiology and Genomics, Bat 16A, Campus de Beaulieu, F-35000 Rennes, Franciaország.
- Pénzes pér (*Thymallus thymallus* Linnæus, 1758) – Tolmini Horgászegyesület, Trg 1. maja 7, 5220 Tolmin, Szlovénia.

A számítógépes spermavizsgálatok egy részét a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén végeztem Gödöllőn.

3.3.1 A kísérleti állományok tartása, szaporítása és az ivartermék gyűjtése

A kísérleti állományokat minden gazdaság más körülmények között tartotta, azonban a szaporításra és ivartermékek begyűjtésére igen hasonló körülmények között került sor. Mind a négy faj esetében a szaporodási időszakban végeztük a vizsgálatainkat. A halakban a spermiációt és az ovulációt hormonkezeléssel nem indukáltuk, azt kizárólag a természetes megvilágítás változása, illetve pénzes pérben és márványpisztrángban a hőmérséklet változása váltotta ki. A fejésre elkülönített halakat 2-fenoxietanol 0,8 ml/l-es oldatában bódítottuk el. Az elbódított halak ivarnyílásának tájékát szárazra töröltük, majd a spermát 12 ml-es kémcsövekbe vagy 15 ml-es csavarmenetes kupakkal ellátott centrifuga-csővekbe gyűjtöttük. A szivárványos pisztráng esetében a spermát 10 ml-es fecskendőbe gyűjtöttük, amelyekbe előzetesen kb. 100 µl Cryofish (IMV, l'Aigle, Franciaország) hígítót szívtunk fel annak érdekében, hogy megakadályozzuk a sperma vizelet általi aktivációját. A sebes pisztráng spermájának gyűjtésére szolgáló kémcsövekbe szintén a vizelet általi aktiváció megakadályozása céljából 1 ml, 200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris (pH 8,0, tömény sósavval beállítva) összetételű hígítót (pér hígító) adagoltunk ki. A három pisztrángfajtól kinyerhető sperma mennyisége átlagosan 2-4 ml, a pénzes pértől kinyerhetőé pedig 1-1,5 ml volt. Minden spermamintát a gyűjtést követően 4°C-on tároltunk felhasználásig.

A lazacfélék spermájának motilitását mikroszkópos becsléssel vagy számítógépes spermavizsgálattal határoztuk meg. A becslés esetében a spermából 1 µl-t 19 µl DIA532 termékenyítő oldattal (1 l vízben 2,42 g Tris, 3,76 g glicin, 5,5 g NaCl, Billard (1977) alapján) elegyítettünk egy mikroszkópos tárgylemezen, majd 200× nagyításon fénymikroszkóppal vizsgáltuk a sejtek mozgását. A számítógépes spermavizsgálat esetében (Computer-assisted Sperm Analysis – CASA) a spermát egy Makler-típusú sejtszámláló kamrában 20-50× arányban hígítottuk a fent említett termékenyítő oldattal, majd a CASA-rendszerrel vizsgáltuk. A rendszer egy 20× negatív fáziskontraszt objektívvel felszerelt Olympus BX41 fénymikroszkópból, egy, a mikroszkóp trinokuláris tubusához csatlakoztatott kamerából, illetve az annak felvételeit feldolgozó számítógépből és szoftverből (SpermVision 3.7.4, Minitüb, Tiefenbach, Németország) áll. A szoftver által mért paraméterekből mi kizárólag a progresszív motilitást (előre haladó mozgást végző spermiumok százalékos aránya) vettük figyelembe.

A pénzes pér spermájának koncentrációját Bürker-kamrás számlálással határoztuk meg. A spermát 100× vagy 1000× hígítottuk a fent említett pér hígítóban annak érdekében, hogy

egy kamramezőben 50-100 közötti spermium legyen. A vizsgálatot Olympus BX41 fénymikroszkóppal és 20× negatív fáziskontraszt objektívvel végeztük. A vizsgálat során megszámoltuk a spermiumok számát 20 db nagyméretű négyzetben, majd ezt az értéket átlagoltuk. A spermiumok ml-enkénti koncentrációját ezek után úgy kaptuk meg, hogy az átlagot megszoroztuk 250 000-rel és a hígítási aránnyal.

Az ikrát minden vizsgált fajban több egyedtől gyűjtöttük be és keverten használtuk fel a termékenyítési kísérletekhez. Az ikrát legfeljebb 2 órán keresztül tároltuk 4°C-on, kivéve a szivárványos pisztráng ikráját, amit 18 órán át tároltunk a termékenyítési kísérletek előtt.

3.3.2 A sperma mélyhűtése

A sperma mélyhűtésében bizonyos eltérésekkel azonos módszert használtunk mind a négy fajban. A sebes pisztráng, márványpisztráng és pénzes pér spermáját a fent leírt pér hígítóval hígítottuk, míg a szivárványos pisztráng spermáját a kereskedelmi forgalomban is kapható Cryofish hígítóval. Védőanyagként a sebes pisztráng és pénzes pér esetében 10% metanolt, míg a márvány- és szivárványos pisztráng esetében 10% metanolt vagy 10% DMSO-t használtuk. A végső hígítási arány a pénzes pér spermájánál 1:1, míg a három pisztrángfaj esetében 1:4 volt.

A hígított spermát mind a négy faj esetében 0,5 ml-es műszalmákba töltöttük és cseppfolyós nitrogén gőzébe hűtöttük a 3.1.2 szakaszban a tokalakúaknál ismertetett módon. A mélyhűtött mintákat cseppfolyós nitrogénben, kaniszteres kannákban tároltuk. A tárolás ideje fajonként és vizsgálatonként eltérő volt, 2 óra és 30 nap között változott. A mintákat 40°C-os vízfürdőben olvasztottuk fel 13 másodpercig.

3.3.3 Termékenyítés a mélyhűtött spermával

A mélyhűtést követően a felolvasztott sperma motilitását a friss spermánál leírt módon ellenőriztük, kivéve a szivárványos pisztráng spermáját, ahol nem végeztünk ilyen vizsgálatot. A termékenyítéshez a három pisztrángfaj esetében egységesen 15 g-os ikraadagokat (135-170 ikraszem), míg a pénzes pér esetében 10 g-os adagokat (800-840 ikraszem) használtunk. A termékenyítéshez használt sperma mennyisége márványpisztrángban és pénzes pérben 200 µl, sebes pisztrángban 300 µl, szivárványos pisztrángban pedig a mintától függően 200 vagy 300 µl volt. Ez alól kivételt képzett az egyik pénzes pérben végrehajtott kísérlet, amelynek célja a sperma-ikra arány optimalizálása volt. A kontroll termékenyítéshez használt sperma térfogata mindegyik fajban megegyezett a hígítatlan spermáéval. A termékenyítéshez minden esetben DIA532 termékenyítő oldatot használtunk, kivéve a szivárványos pisztrángot, ahol a kereskedelmi forgalomban kapható Actifish oldattal aktiváltuk az ivarsejteket. A termékenyítést követően az ikrát keltetőházi körülmények között inkubáltuk. A termékenyítést szempontos stádiumban határoztuk meg, illetve megszámoltuk a kelő lárvák százalékos arányát is.

3.3.4 Az eredmények statisztikai értékelése

Az eredmények statisztikai értékeléséhez a GraphPad Prism 5.0 és 6.0 szoftvereket használtuk. A különböző kísérleti tényezők fő hatásának meghatározásához egy- vagy kétszemponos varianciaanalízist használtunk $\alpha = 0,05$ szignifikanciaszint mellett.

3.3.5 Az egyes lazacféle fajokban végzett kísérletek

3.3.5.1 Sebes pisztrángban végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás hatása a mélyhűtött sperma motilitására és termékenyítő képességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 10 és 60 perc.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás;

1.2.2. Szempontos ikra százalékos aránya.

A vizsgálatokhoz 6 tejes egyed spermáját és 3 ikrás egyed kevert ikráját használtuk fel. A felolvasztást követően a spermát a fent említett ideig tároltuk 4°C-on. A tárolási idő elteltével megmértük a minták motilitását, majd termékenyítési tesztekkel végeztünk velük. A termékenyülés sikerességét szempontos stádiumban határoztuk meg. A felolvasztás után eltelt idő fő hatásának meghatározásához egyszempontos varianciaanalízist végeztünk.

3.3.5.2 Márványpisztrángban végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás és kétféle védőanyag hatása a mélyhűtött sperma motilitására és termékenyítő képességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 10 és 60 perc;

1.1.2. Védőanyagok: metanol és DMSO.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Felolvasztás utáni motilitás;

1.2.2. Szempontos ikra százalékos aránya;

1.2.3. Kikelt ivadék százalékos aránya.

A vizsgálatokhoz 5 tejes egyed spermáját és 3 ikrás egyed kevert ikráját használtuk fel. A felolvasztást követően a spermát a fent említett ideig tároltuk 4°C-on. A tárolási idő elteltével megmértük a minták motilitását, majd termékenyítési tesztekkel végeztünk velük. A termékenyülés sikerességét szempontos stádiumban, illetve kelés után határoztuk meg. A felolvasztás után eltelt idő és a védőanyagok fő hatásának meghatározásához kétszempontos varianciaanalízist végeztünk.

3.3.5.3 Szivárványos pisztrángban végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás és kétféle védőanyag hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére.

1.1. Kísérleti tényezők:

1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 10 és 60 perc;

1.1.2. Védőanyagok: metanol és DMSO.

1.2. Végpontok:

1.2.1. Szempontos ikra százalékos aránya;

1.2.2. Kikelt ivadék százalékos aránya.

A vizsgálatokhoz 6 tejes egyed spermáját és 5 ikrás egyed kevert ikráját használtuk fel. A felolvasztást követően a spermát a fent említett ideig tároltuk 4°C-on. A tárolási idő elteltével termékenyítési tesztekkel végeztünk. A termékenyülés sikerességét szempontos stádiumban, illetve kelés után határoztuk meg. A felolvasztás után eltelt idő és a védőanyagok fő hatásának meghatározásához kétszempontos varianciaanalízist végeztünk.

3.3.5.4 Pénzes pérben végzett kísérletek

1. A felolvasztás utáni tárolás hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére.

- 1.1. Kísérleti tényezők:

- 1.1.1. Felolvasztás utáni tárolás ideje: 0, 2, 5, 10, 30, 60 és 120 perc.

- 1.2. Végpontok:

- 1.2.1. Szempontos ikra százalékos aránya;

- 1.2.2. Kikelt ivadékok százalékos aránya.

A vizsgálatokhoz 6 tejes egyed spermáját és 3 ikrás egyed kevert ikráját használtuk fel. A felolvasztást követően a spermát a fent említett ideig tároltuk 4°C-on. A tárolási idő elteltével termékenyítési tesztek végeztünk. A termékenyülés sikerességét szempontos stádiumban és kelés után határoztuk meg. A felolvasztás után eltelt idő fő hatásának meghatározásához egyszempontos varianciaanalízist végeztünk.

2. A sperma-ikra arány hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére.

- 2.1. Kísérleti tényezők:

- 2.1.1. Sperma-ikra arányok: 5×10^4 , 10^4 , 5×10^3 és 10^3 .

- 2.2. Végpontok:

- 2.2.1. Szempontos ikra százalékos aránya;

- 2.2.2. Kikelt ivadékok százalékos aránya.

A vizsgálatokhoz 5 tejes egyed spermáját és 10 ikrás egyed kevert ikráját használtuk fel. A felolvasztás után ellenőriztük a minták motilitását. A termékenyítési vizsgálatok előtt megszámoltuk az 1 g ikrában lévő ikraszemek számát. Az ikrát 10 g-os tételekre osztottuk fel, majd az egyes tételeket megtermékenyítettük a fent említett sperma-ikra aránynak megfelelő mennyiségű spermával. A termékenyítést mind az 5 tejes spermájával elvégeztük két ismétlésben, kivéve az 5×10^4 sperma-ikra arányt, ahol csak 4 egyed spermáját tudtuk felhasználni, szintén két ismétlésben. A termékenyítés sikerességét szempontos stádiumban és kelés után határoztuk meg. A sperma-ikra arány fő hatásának megállapításához egyszempontos varianciaanalízist végeztünk.

3.4 A kidolgozott módszerek alkalmazása a gyakorlatban

3.4.1 A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása

A ponty fajban kidolgozott módszertant a Haltenyésztési és Öntözési Kutató Intézet HAKI, mai jogutódja a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Halászati Kutatóintézet – NAIK-HAKI) hasznosította 2005-2007-ben a ponty mélyhűtött génbankjának létrehozásához. A HAKI által kezdeményezett munkát két időszakban hajtottuk végre, 2005. május 18 – június 29. között, illetve 2007. április 20-24. között. A 2005-ben végrehajtott munkát teljes egészében a HAKI szarvasi telephelyén, míg a 2007-ben elvégzett munkát a HAKI telephelyén, illetve a Magyar Országos Horgász Szövetség (MOHOSZ) kajászói tógazdaságában végeztük.

A munka során 17 hazai és 5 külföldi ponty tájfajta spermáját terveztük lehűteni, amelyek az élő génbank részét képezték. Az eredeti tervek szerint fajtánként 10-10 egyedtől nyertünk volna ki spermát és egyedenként 40-40 műszalmányi spermát hűtöttünk volna le. A tejes egyedek spermiációját az adott halgazdaság váltotta ki hormonális indukcióval. A sperma lefejeése előtt leolvastuk az adott egyed bőr alá beültetett azonosítóját (PIT-tag), majd egyedenként 5-10 ml spermát fejtünk, amit 4°C-on olvadó jégen tároltunk. A lefejt spermaminták motilitását mikroszkópos becsléssel határoztuk meg 100× nagyításon. A mélyhűtéshez használt hígító összetétele 300 mM glükóz, 30 mM Tris (pH 8,0 tömény

sósavval beállítva) volt. Védőanyagként metanolt használtunk 10% végső hígításban. A spermát 1:9 arányban hígítottuk a hígító-védőanyag eleggyel, majd 0,5 ml-es műszalmákba szívtuk fel. Logisztikai okokból az egyedenként tervezett 40 db műszalma helyett egyedenként 42 db műszalmával dolgoztunk. A mintákat cseppfolyós nitrogén gőzében, egy nitrogénnel megtöltött polisztirol dobozban hűtöttük. A nitrogén felszínére egy 3 cm magas polisztirol keretet helyeztük, majd erre fektettük a hígított spermával megtöltött műszalmákat. A mélyhűtött mintákat a HAKI tárolóedényeiben helyeztük el. A 2005-ben lehűtött minták közül a hűtést követően 6 hónappal 50 műszalmát szűrőpróbaszerűen felolvasztottunk és a fent leírtak szerint ellenőriztünk a motilitását.

3.4.2 A lazacfélékben kidolgozott módszerek alkalmazása

A lazacfélékben kidolgozott módszereket jelenleg a szlovéniai Tolmin városában működő Tolmini Horgászegyesület, illetve az annak tulajdonában lévő Faronika d.o.o. cég alkalmazza. A spermamélyhűtést az általuk gondozott két faj, a márványpisztráng és a pénzes pér tenyésztőmunkája során használják az általam vezetett kutatócsoport aktív közreműködésével. Mindkét faj esetében a vadon élő populációk egyedeit használjuk.

A vadon élő tejes egyedek befogására az ivási időszak kezdetén kerül sor, azaz a márványpisztráng esetében november elején, míg a pénzes pér esetében április első heteiben. A tejes egyedeket elektromos halászgéppel fogják be a horgászegyesület munkatársai. A halakat 2-fenoxietanol 0,8 ml/l vizes oldatában bódítjuk el, majd az ivarnyílás tájékának szárazra törlését követően a halaktól a spermát száraz 15 ml-es centrifuga-csővekbe fejjük. A lefejt spermát a fejest követően még a helyszínen mélyhűtjük. A mélyhűtéshez a spermát 1:1 arányban hígítjuk a 3.3.1 szakaszban említett „pér hígítóval” (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0), amelyhez metanol védőanyagot adagolunk 10% végső koncentrációban. A hígított spermát 0,5 ml-es műszalmákba szívjuk fel, majd cseppfolyós nitrogén gőzében hűtjük. A mintákat a ponty fajban (3.4.1 szakasz) már leírt módon mélyhűtjük és tároljuk el a Tolmini Horgászegyesület tárolóedényeiben.

A pénzes pér esetében a horgászegyesület munkatársai mintát vesznek az egyedek farokúszójából, amit 96%-os etanolban tárolnak, majd elküldenek a Ljubljana-i Egyetem Állattenyésztési Tanszékére. Az egyedekben 11 mikroszatellit marker és a mitokondriális DNS szekvenálása alapján határozzák meg a dunai (betelepített) és adriai (őshonos) genotípus arányát (Sušnik et al., 1999, 2004). A kapott eredményeket elküldik a Tolmini Horgászegyesület munkatársainak, akik meghatározzák az adriai genotípus minimális hányadát, amely fölött felhasználhatónak ítélik meg a mintákat. A határértéket meghaladó egyedek spermáját felolvasztják, majd felhasználják termékenyítésre. A termékenyítéshez az egyesület tenyészállományából olyan ikrásokat válogatnak ki, amelyekben magas az adriai genotípus hányada. A termékenyítésből származó ivadékokat tenyészállományként nevelik fel.

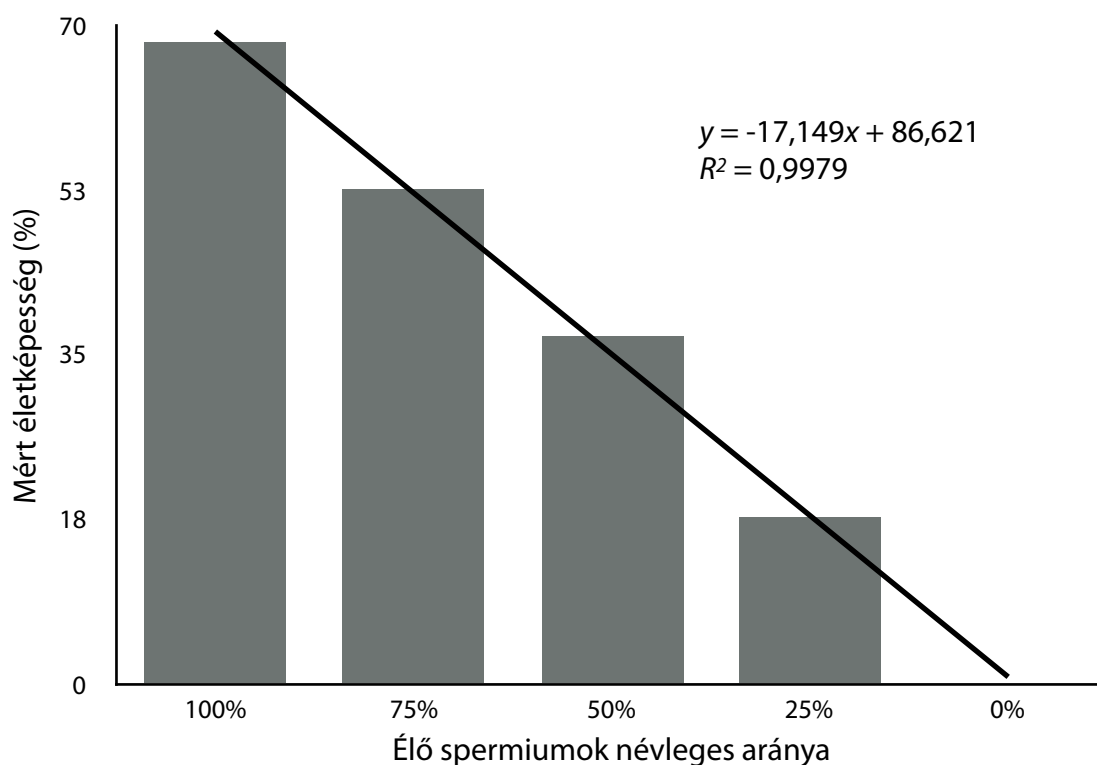
A márványpisztráng mélyhűtött spermájának felhasználását az Eredmények és Eredmények értékelése fejezetekben ismertettem.

4. Eredmények

4.1 A tokalakúakban kapott eredmények

4.1.1 A rövidorrú tok fajban kapott eredmények

Az életképesség-vizsgálatok érvényességét ellenőrző kísérletben szoros lineáris összefüggést ($R^2 = 0,9979$, 3. ábra) találtunk az élő és elölt sejtek névleges aránya és az ép sejtmembránnal rendelkező sejtek áramlási citometriával mért aránya között. A kapott eredmények alapján az áramlási citometriás vizsgálatot alkalmasnak találtuk a sejtek életképességének mérésére.



3. ÁBRA: Élő és elölt tokspermiumok ismert arányú elegyében áramlási citometriával mért életképesség értékek az életképesség-vizsgálatok ellenőrzésére végzett kísérlet során.

A védőanyag fajtájának és koncentrációjának hatásait vizsgáló kísérletben a friss rövidorrútok-sperma motilitása $77 \pm 8\%$ volt (2. táblázat). Az átlagos hűtési sebesség metanol védőanyag esetében $70^\circ\text{C}/\text{perc}$, míg DMSO védőanyag esetében $66^\circ\text{C}/\text{perc}$ volt. A legmagasabb felolvasztás utáni motilitás $26 \pm 13\%$ volt, amit 5% DMSO védőanyag

használatával értünk el. A kapott felolvasztás utáni motilitás eredmények statisztikai értékelése során azt tapasztaltuk, hogy a védőanyag típusa nem, ugyanakkor a koncentrációja szignifikáns hatást ($P = 0,0027$) gyakorolt az eredményekre.

2. TÁBLÁZAT: A rövidorrú tok kétféle védőanyag (dimetil-szulfoxid – DMSO és metanol) és ezek háromféle koncentrációja (5, 10 és 15%) jelenlétében mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni motilitása, termékenyítő- és életképessége. A kitevőben azonos betűkkel jelölt és azonos oszlopban lévő értékek között nincs szignifikáns különbség ($P > 0,05$).

Védőanyag	Védő- anyag koncent- ráció (%)	Sperma térfogata (μ l)	Motilitás (%)	4-8 sejtes termé- kenyülés (%)	Gerinchúros termé- kenyülés (%)	Kelés (%)	Élet- képesség (%)
DMSO	5	125	26 ± 13^b	0 ± 0^d	1 ± 1^d	1 ± 1^d	7 ± 4^{ab}
		250		1 ± 2^d	1 ± 1^d	1 ± 1^d	
	10	125	17 ± 6^{cb}	2 ± 2^d	0 ± 1^d	0 ± 0^d	12 ± 8^a
		250		1 ± 1^d	1 ± 1^d	0 ± 1^d	
	15	125	2 ± 3^d	0 ± 0^d	0 ± 0^d	0 ± 0^d	4 ± 1^b
		250		0 ± 0^d	0 ± 0^d	0 ± 0^d	
Metanol	5	125	16 ± 7^{cb}	40 ± 15^b	35 ± 17^b	31 ± 15^b	5 ± 2^{ab}
		250		39 ± 11^b	38 ± 13^b	32 ± 12^b	
	10	125	13 ± 8^c	19 ± 13^c	22 ± 17^c	18 ± 16^c	6 ± 3^{ab}
		250		21 ± 12^c	21 ± 11^c	16 ± 8^c	
	15	125	10 ± 5^{cd}	3 ± 5^d	2 ± 4^d	2 ± 2^d	7 ± 6^{ab}
		250		8 ± 9^d	7 ± 6^d	5 ± 4^d	
Kontroll		125	77 ± 8^a	78 ± 26^a	69 ± 24^a	51 ± 22^a	68 ± 1
		250		79 ± 23^a	71 ± 20^a	53 ± 21^a	

A rövidorrú tok spermájának koncentrációja $1,3 \pm 1,1 \times 10^9$ volt, így a fél műszalmányi felolvasztott sperma használata esetében a sperma-ikra arány $1,5 \pm 1,3 \times 10^6$ spermium/ikraszem volt, míg az egész műszalmányinál $3,3 \pm 2,8 \times 10^6$ spermium/ikraszem. A sperma-ikra aránynak nem volt szignifikáns hatása a termékenyülési és kelési eredményekre. A legmagasabb termékenyülési arány 4-8 sejtes stádiumban $40 \pm 15\%$, gerinchúros stádiumban $35 \pm 17\%$, illetve a legmagasabb kelési arány $31 \pm 15\%$ volt, mindhárom eredményt 5% metanol védőanyag használatakor kaptuk. A sejtek mért életképesség-értékei között nem találtunk szignifikáns különbséget, egyedül a 15% DMSO védőanyag használata eredményezett kevesebb ép membránnal rendelkező sejtet. A védőanyag-koncentrációk szignifikáns hatást ($P < 0,0001$) gyakoroltak mindhárom paraméterre, illetve szignifikáns interakciót figyeltünk meg a védőanyag és koncentrációik között ($P < 0,0001$), szintén mindhárom vizsgált végpont esetében.

A különböző hígítók hatását összefoglaló kísérletben a friss sperma motilitása $73 \pm 16\%$, míg a koncentrációja $2,5 \pm 1,4 \times 10^9$ volt, így a kísérletben alkalmazott sperma-ikra arány $7,0 \pm 3,6 \times 10^6$ volt. A legmagasabb felolvasztás utáni motilitást mT ($18 \pm 10\%$) és oT ($12 \pm 6\%$) hígítók és 5% metanol használata mellett figyeltük meg (3. táblázat). A hígító típusa nem gyakorolt szignifikáns hatást ($P = 0,1586$) a felolvasztás utáni motilitásra,

ugyanakkor a védőanyag koncentrációja igen ($P = 0,0003$). A legmagasabb termékenyülési és kelési eredményeket mT ($18 \pm 11\%$ termékenyülés és $17 \pm 12\%$ kelés), illetve mHBSS ($12 \pm 10\%$ termékenyülés és $11 \pm 12\%$ kelés) hígító és 5% metanol védőanyag használata mellett érték el. Meglepő módon a sejtek életképessége általánosságban az mT hígító használata mellett volt a legalacsonyabb. Mind a hígító típusa, mind a védőanyag koncentrációja szignifikáns hatást gyakorolt a termékenyülésre (hígító típusa: $P = 0,0197$, védőanyag-koncentráció: $P = 0,0002$) és a kelésre (hígító típusa: $P = 0,0500$, védőanyag-koncentráció: $P = 0,0004$).

3. TÁBLÁZAT: A rövidorrú tok háromféle hígító (oT: eredeti Tsvetkova-féle hígító, mT: módosított Tsvetkova-féle hígító, mHBSS: módosított Hanks-féle sóoldat) és háromféle metanol-koncentráció (5, 10 és 15%) jelenlétében mélyhűtött spermájának motilitása és termékenyítő képessége. A kitevőben azonos betűkkel jelölt és azonos oszlopban lévő értékek között nincs szignifikáns különbség ($P > 0,05$).

Hígító	Metanol-koncentráció (%)	Motilitás (%)	4-8 sejtes termékenyülés (%)	Kelés (%)	Életképesség (%)
oT	5	12 ± 6^{bc}	3 ± 7^{cd}	2 ± 2^{cd}	9 ± 4^a
	10	11 ± 2^{bcd}	2 ± 3^{cd}	3 ± 4^{cd}	9 ± 5^a
	15	8 ± 3^{cd}	0 ± 1^d	1 ± 1^d	7 ± 5^a
mT	5	18 ± 10^b	18 ± 11^b	17 ± 2^b	5 ± 3^b
	10	8 ± 5^{cd}	7 ± 11^{cd}	3 ± 4^{cd}	5 ± 3^b
	15	6 ± 4^{cd}	2 ± 2^{cd}	1 ± 2^d	5 ± 3^b
mHBSS	5	11 ± 7^{bcd}	12 ± 10^{bc}	11 ± 12^{bc}	10 ± 8^a
	10	8 ± 7^{cd}	4 ± 5^{cd}	5 ± 6^{cd}	7 ± 4^a
	15	3 ± 2^d	1 ± 1^{cd}	0 ± 0^d	8 ± 4^a
Kontroll	-	73 ± 16^a	40 ± 22^a	27 ± 13^a	

Összehasonlítottuk továbbá az oT és mT hígítók, a DMSO és metanol védőanyagok és az utóbbiak különböző koncentrációinak (5, 10 és 15%) hatását az így létrehozott hűtőmediumok ozmolalitására. Mindhárom tényező szignifikáns hatást gyakorolt a mért ozmolalitás értékekre ($P < 0,0001$ mindhárom esetben, 4. táblázat). Az eredményekből kiderült, hogy az oT hígító ozmolalitása (204 ± 8 mOsm/kg) szignifikánsan magasabb volt, mint az mT hígítóé (73 ± 9 mOsm/kg), illetve az is, hogy a DMSO védőanyag hozzáadása mindkét hígító esetében statisztikailag igazolható és koncentráció-függő módon növelte a mért ozmolalitás értékét, míg a metanol védőanyag használata nem változtatta meg az oldat ozmolalitását.

4.1.2 A sápadt tok fajban kapott eredmények

A sápadt tok mélyhűtött spermája mT hígító és 10% metanol védőanyag használata mellett mutatta a legmagasabb felolvasztás utáni motilitást ($70 \pm 10\%$) és életképességét, illetve ugyanezen hígító és 5% metanol kombinációjával eredményezte a legmagasabb termékenyülést ($88 \pm 6\%$ 4-sejtes stádiumban és $73 \pm 14\%$ szívveréses stádiumban). Összességében a hígítók szignifikáns fő hatást gyakoroltak a szívveréses stádiumban mért termékenyülési eredményekre ($P = 0,0072$) és a felolvasztás utáni motilitásra ($P = 0,0056$), azonban a felolvasztott sperma életképességére nem (5. táblázat).

4. TÁBLÁZAT: Az eredeti Tsvetkova- (oT) és a módosított Tsvetkova-féle (mT) hígító ozmolalitása dimetil-szulfoxid (DMSO) és metanol védőanyagok különböző koncentrációi mellett ($n=3$). A kitevőben azonos betűkkel jelölt és azonos oszlopban lévő értékek között nincs szignifikáns különbség ($P > 0,05$). Az oT hígító és 15% DMSO védőanyag használata esetében az ozmolalitás magasabb volt, mint a méréshez használt ozmométer felső mérési határértéke.

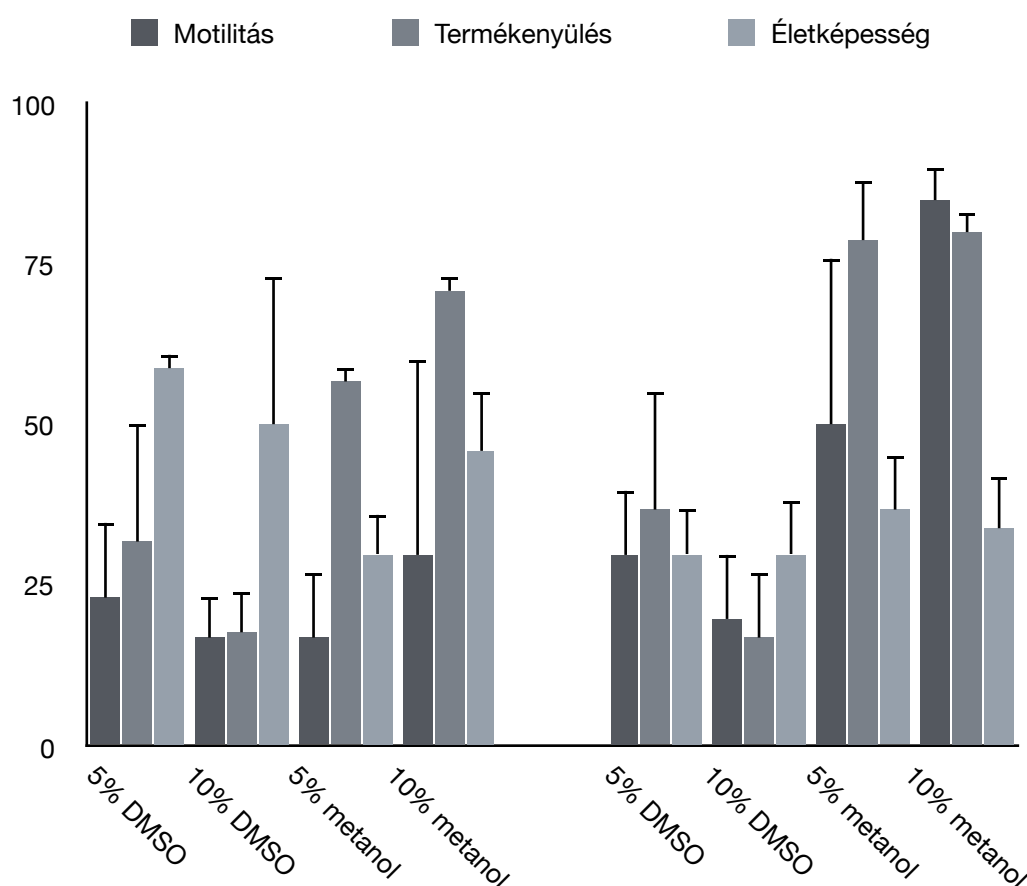
Hígító	Védőanyag	Védőanyag-koncentráció (%)	Ozmolalitás (mOsm/kg)
mT	DMSO	-	73 ± 2^g
		5	719 ± 9^e
		10	1421 ± 26^c
		15	1985 ± 12^a
	metanol	5	75 ± 1^g
		10	78 ± 15^g
		15	84 ± 14^g
		-	204 ± 8^f
oT	DMSO	5	840 ± 15^d
		10	1481 ± 24^b
		15	>2000
	metanol	5	196 ± 13^f
		10	187 ± 3^f
		15	204 ± 8^f

5. TÁBLÁZAT: A sápadt tok mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni motilitása, termékenyítő képessége (4-sejtes és szívveréses stádiumban), illetve életképessége kétféle hígító (módosított Tsvetkova-féle – mT, módosított Hanks-féle sóoldat – mHBSS) és kétféle metanolkoncentráció (5 és 10%) használata mellett. A kitevőben azonos betűkkel jelölt és azonos oszlopban lévő értékek között nincs szignifikáns különbség ($P > 0,05$).

Hígító	Metanol koncentráció (%)	Motilitás (%)	4-sejtes termékenyülés (%)	Szívveréses stádiumú termékenyülés (%)	Életképesség (%)
mT	5	60 ± 10^a	88 ± 6^{ab}	73 ± 14^a	50 ± 11^a
	10	70 ± 10^a	85 ± 3^{ab}	71 ± 10^a	58 ± 13^a
mHBSS	5	60 ± 0^a	84 ± 9^{ab}	56 ± 16^b	44 ± 2^a
	10	57 ± 12^a	79 ± 9^b	52 ± 10^b	58 ± 5^a
Kontroll	-	-	89 ± 6^a	80 ± 4^a	

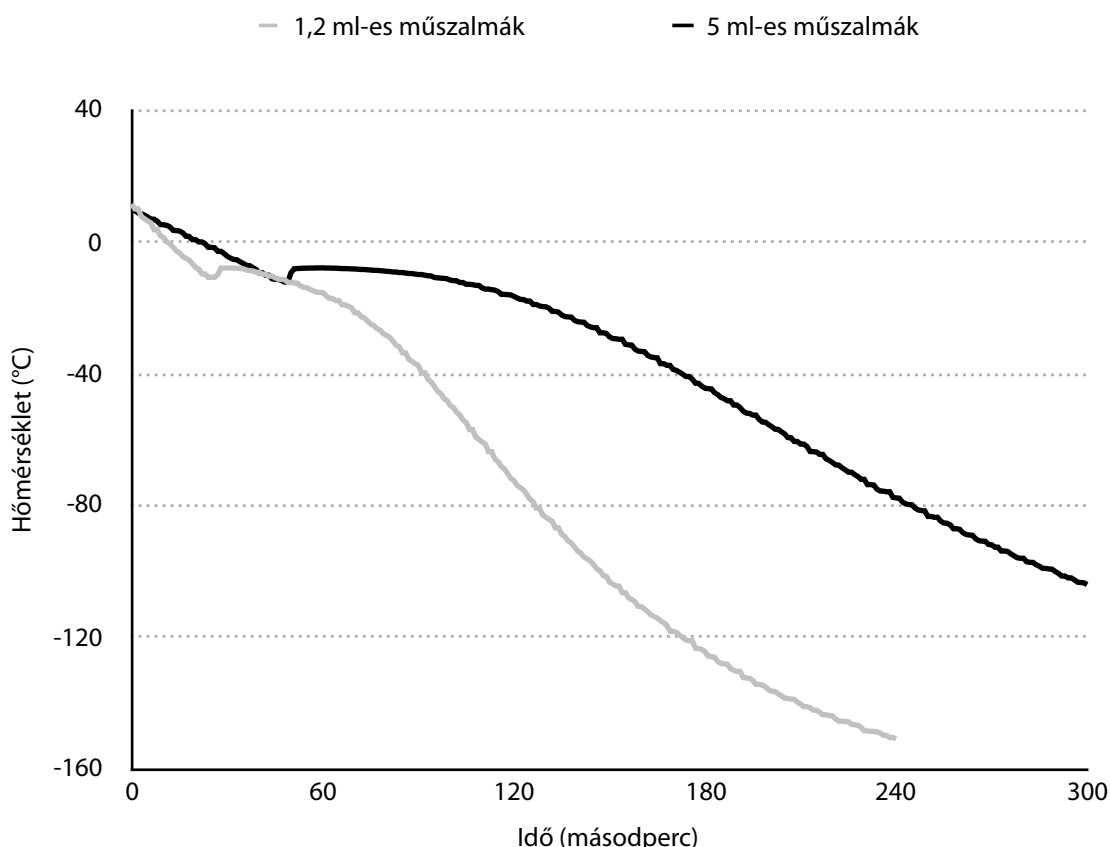
4.1.3 A lapátorrú tok fajban kapott eredmények

A kétféle hígító és védőanyag hatását vizsgáló kísérletben a legmagasabb felolvasztás utáni motilitás ($85 \pm 2\%$) és termékenyülési ($80 \pm 3\%$) eredményeket mT hígító és 10% metanol védőanyag használata mellett érték el, azonban a legmagasabb életképességet ($59 \pm 2\%$) mHBSS és 5% DMSO használata eredményezte (4. ábra). A hígítók és védőanyagok ($P = 0,0011$), illetve a védőanyagok és koncentrációik között ($P = 0,0021$) is szignifikáns kölcsönhatást figyeltünk meg. Az mT hígító magasabb és szignifikánsan különböző motilitást, életképességet ($P = 0,0125$ mindkét paraméter esetében) és termékenyülést ($P = 0,0248$) eredményezett metanol védőanyag használata mellett, mint az mHBSS hígító. A termékenyülés esetében is szignifikáns kölcsönhatás volt megfigyelhető a védőanyagok és koncentrációik között ($P = 0,0025$), azonban a 10% metanol használata minden esetben magasabb termékenyülést eredményezett, mint a többi kombináció.



4. ÁBRA: A lapátorrú tok kétféle hígító (mHBSS és mT), védőanyag (DMSO és metanol), illetve védőanyag-koncentráció (5 és 10%) jelenlétében mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni motilitása, termékenyítő képessége (Termékenyülés), illetve életképessége százalékos értékben kifejezve. Az adatok átlagértékek, a hibásávok a szórást jelentik, $N = 3$.

A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek termékenyülését és kelését vizsgáló kísérletsorozatban a három tejes egyed felolvasztott spermájával kapott eredményeket külön vizsgáltuk. A legmagasabb termékenyülési ($84 \pm 9\%$) és kelési arányt ($79 \pm 5\%$) az 1. számú tejes egyed esetében figyeltük meg. A kapott eredmények alapján két egyed esetében nem találtunk különbséget a termékenyülés és a kelés százalékos sikere között, míg egy egyed esetében statisztikailag szignifikáns különbséget figyeltünk meg a két érték között (6. táblázat).



5. ÁBRA: A hőmérséklet változása az idő függvényében a pontysperma 1,2 és 5 ml-es műszalmákban végzett mélyhűtésekor. A hűtési sebesség 1,2 ml-es műszalmákban $41 \pm 2^\circ\text{C}/\text{perc}$, 5 ml-es műszalmákban $23 \pm 1^\circ\text{C}/\text{perc}$ volt.

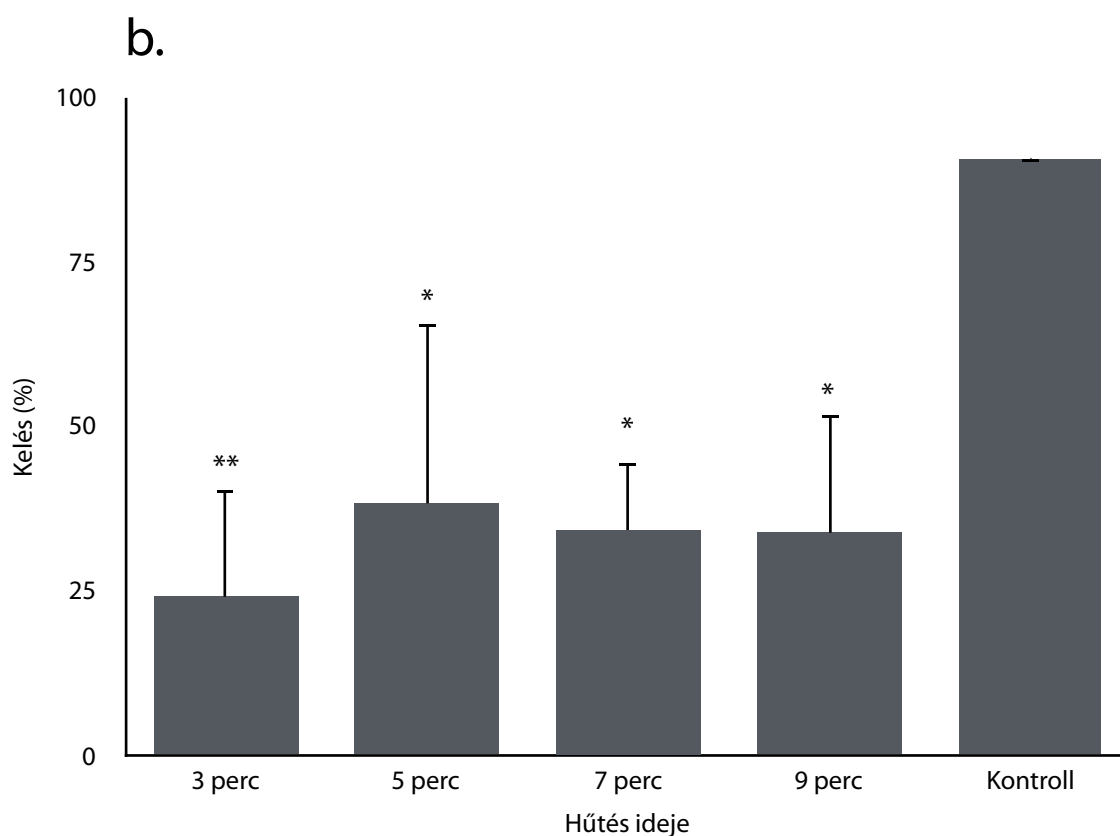
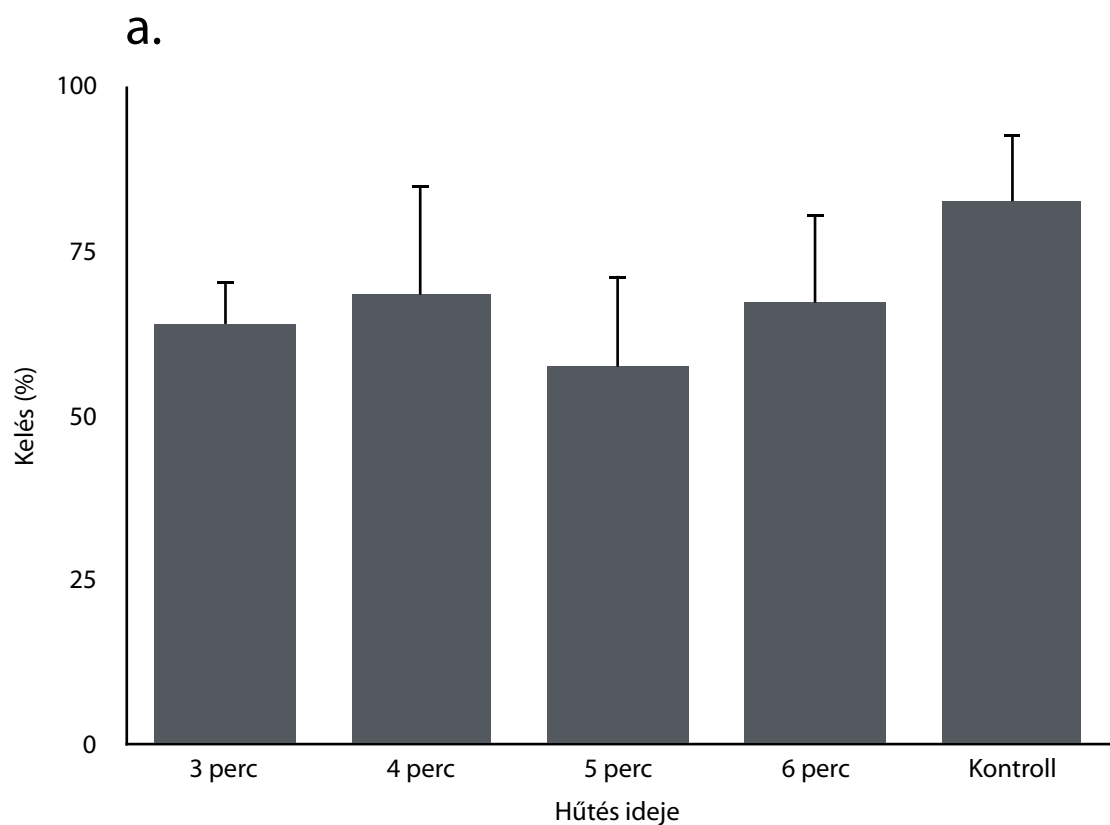
6. TÁBLÁZAT: Három lapátorrú tok hím egyed mélyhűtött spermájával kapott termékenyülés és kelés. A kitevőben azonos betűkkel jelölt értékek között nem volt szignifikáns különbség ($N = 4$, $P > 0,05$). A kontroll (friss spermával termékenyített) csoport termékenyülése $94 \pm 5\%$, kelése $88 \pm 6\%$ volt ($N = 3$ tejes egyed).

	1. hím	2. hím	3. hím
Termékenyülés	84 ± 9^a	84 ± 6^a	52 ± 30^a
Kelés	79 ± 5^a	64 ± 7^b	49 ± 27^a

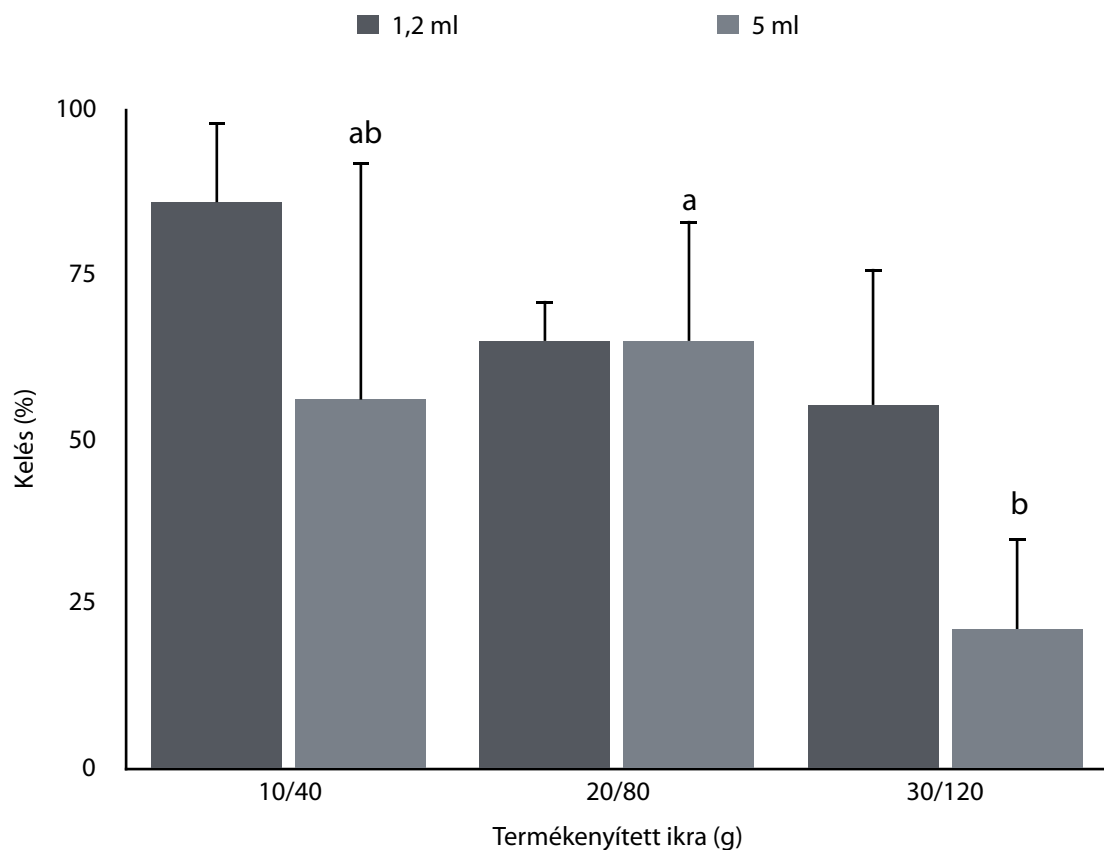
A védőanyag-koncentrációk hatását vizsgáló kísérletben a legmagasabb termékenyülési ($69 \pm 14\%$) és kelési arányt ($33 \pm 13\%$) 5% metanol védőanyag alkalmazása mellett figyeltük meg (7. táblázat). A két védőanyag-koncentráció használatával kapott termékenyülési és kelési eredmények között nem volt szignifikáns különbség, ugyanakkor a kontroll csoport és a 10% metanol használatával mélyhűtött csoport kelési eredményei között igen ($P < 0,01$).

7. TÁBLÁZAT: A lapátorrú tok ikrájának termékenyülése és kelése 5 és 10% metanol védőanyagok jelenlétében mélyhűtött spermával végzett termékenyítést követően. A kitevőben azonos betűkkel jelölt értékek között nem volt szignifikáns különbség ($N = 3$, $P > 0,05$).

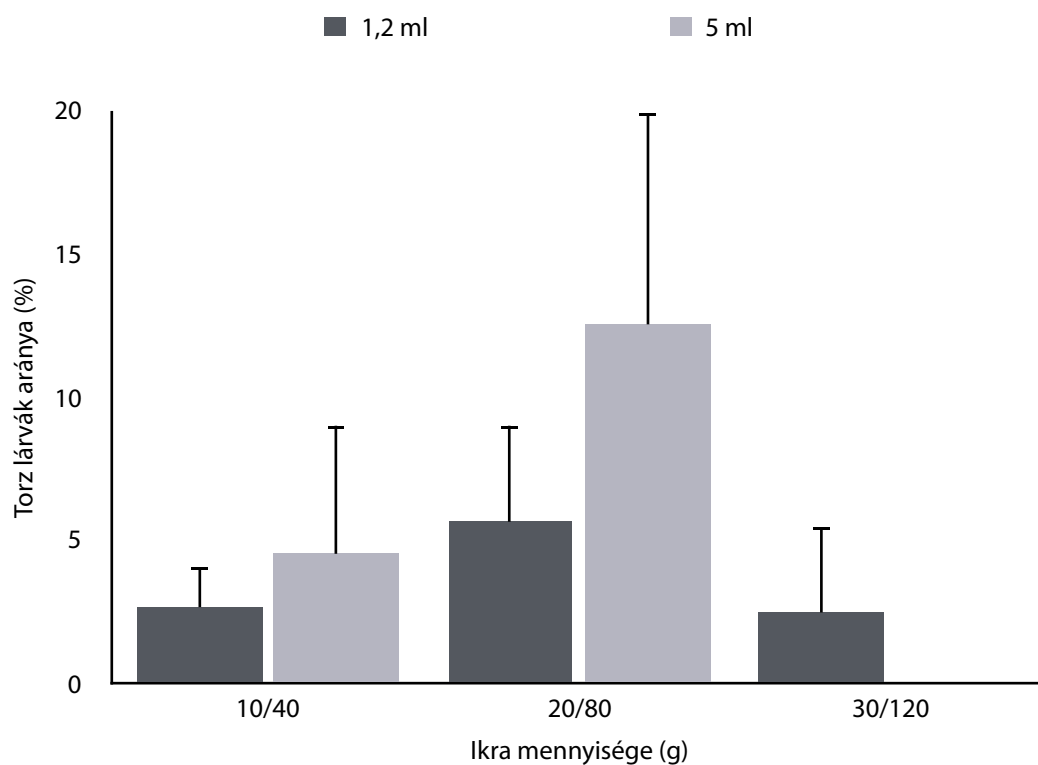
	5% metanol	10% metanol	kontroll
Termékenyülés	69 ± 14^a	52 ± 21^a	68 ± 10^a
Kelés	33 ± 13^{ab}	20 ± 16^a	57 ± 7^b



6. ÁBRA: Az 1,2 ml-es (a.) és 5 ml-es (b.) műszalmákban mélyhűtött pontysperma termékenyítő képessége különböző hűtési időket követően. A kísérlet végpontja a kikelt szabadembriók százalékos aránya. A csillaggal (*) jelölt eredmények szignifikánsan különböznek a kontroll csoport eredményeitől, a csillagok száma a szignifikáns különbség nagyságát jelzi ($N = 4$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).



7. ÁBRA: A sperma-ikra arány hatása az 1,2 és 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött pontyspermával termékenyített ikra kelésére. 10/40: $1,775 \times 10^6 : 1$ sperma-ikra arány; 20/80: $8,875 \times 10^5 : 1$ sperma-ikra arány, 30/120: $5,917 \times 10^5 : 1$ sperma-ikra arány. Az 5 ml-es műszalmák esetében az eltérő betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek ($N = 4, P < 0,05$).



8. ÁBRA: Az 1,2 ml-es és 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött spermával termékenyített pontyikra embrionális kori torzulásainak százalékos aránya különböző ikramennyiségek termékenyítésekor ($N = 4$).

Az 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött lapátorrútok-sperma termékenyítő képességét vizsgáló kísérletben a legmagasabb termékenyülést ($48 \pm 5\%$) és kelést ($47 \pm 11\%$) 5% metanol és 5 perc hűtési idő használatával érték el, azonban ezek az értékek is szignifikánsan különböztek ($P < 0,02$) a friss sperma használatával kapott értékektől (8. táblázat). Általánosságban az 5 perc hűtési idő magasabb termékenyülést eredményezett ($P < 0,03$), mint a 7 perc. Hasonló módon, az alacsonyabb metanol-koncentráció használatával is magasabb termékenyülést értünk el ($P < 0,004$), mint a magasabb koncentrációéval.

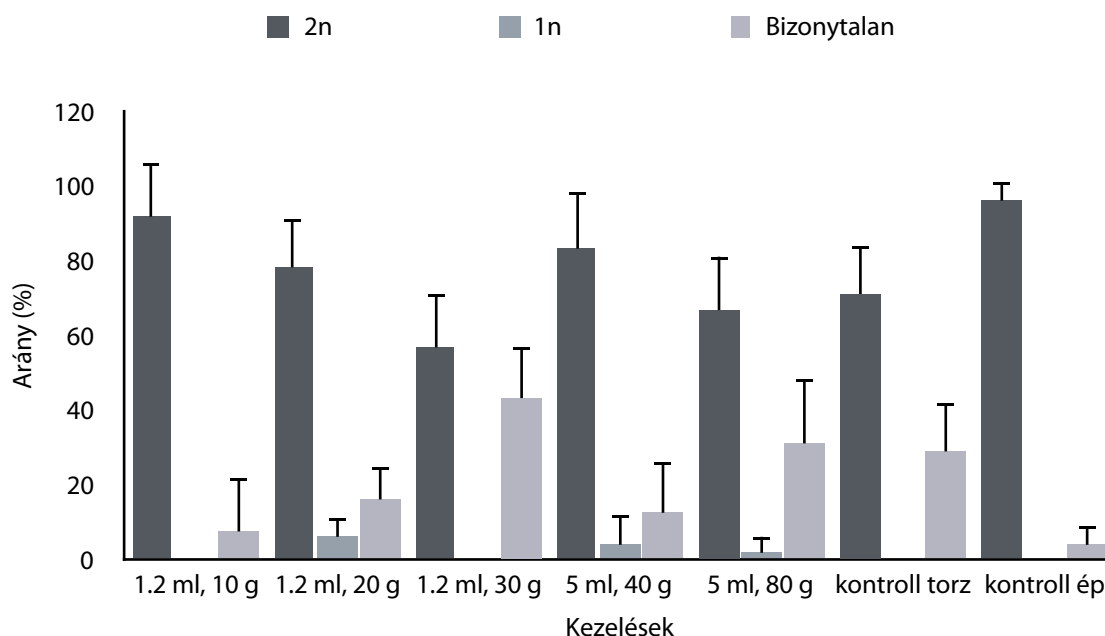
8. TÁBLÁZAT: A lapátorrú tok 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött spermájának használatakor kapott termékenyülési és kelési eredmények. A spermát kétféle metanol-koncentráció (5 és 10%) és kétféle hűtési idő (5 és 7 perc) használata mellett mélyhűtöttük (Kontroll termékenyülés $77 \pm 6\%$, kelés $66 \pm 13\%$).

Metanol-koncentráció (%)	Termékenyülés (%)		Kelés (%)	
	5 perc	7 perc	5 perc	7 perc
5	48 ± 5	34 ± 6	47 ± 11	29 ± 11
10	30 ± 5	20 ± 5	28 ± 11	25 ± 11

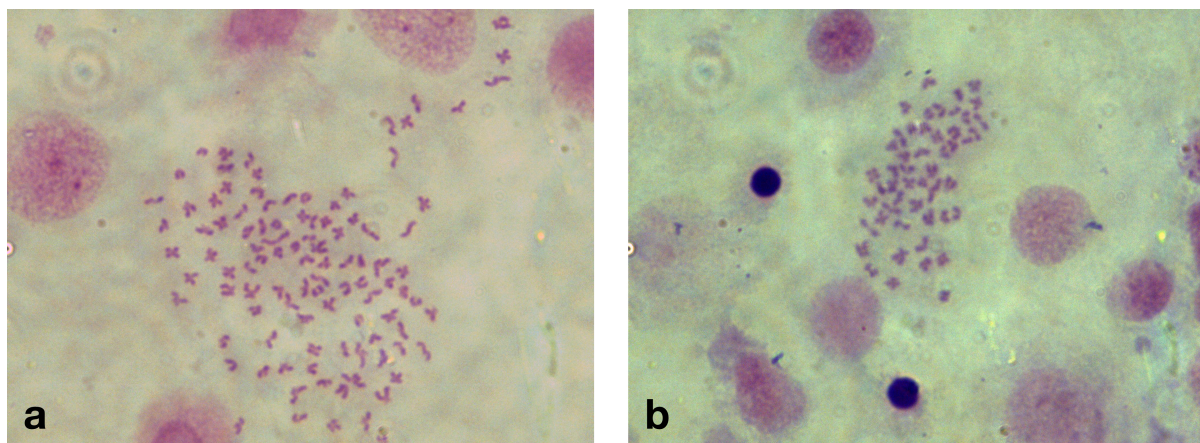
4.2 A ponty fajban végzett kísérletek eredményei

A friss pontysperma motilitása $70 \pm 0\%$ volt az első vizsgálatban és $83 \pm 22\%$ a másodikban. A mért hűtési sebesség $41 \pm 2^\circ\text{C}/\text{perc}$ volt az 1,2 ml-es műszalmák és $23 \pm 1^\circ\text{C}/\text{perc}$ az 5 ml-esek használatakor (5. ábra).

Az 1,2 ml-es műszalmák használatakor a hűtési időnek nem volt szignifikáns hatása a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére. A legmagasabb kelési arányt ($69 \pm 16\%$) 4



10. ÁBRA: Mélyhűtött pontyspermával végzett termékenyítésből származó torz fejlődésű ivadékok ploidiajának szintje (2n: diploid; 1n: haploid, bizonytalan: nem számolható). A kezelések magyarázata: 1,2 ml és 5 ml: 1,2 ml-es, illetve 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött sperma; 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 80 g: a termékenyített ika mennyisége. A kontroll csoportban torz és ép fejlődésű ivadékokat is vizsgáltunk.



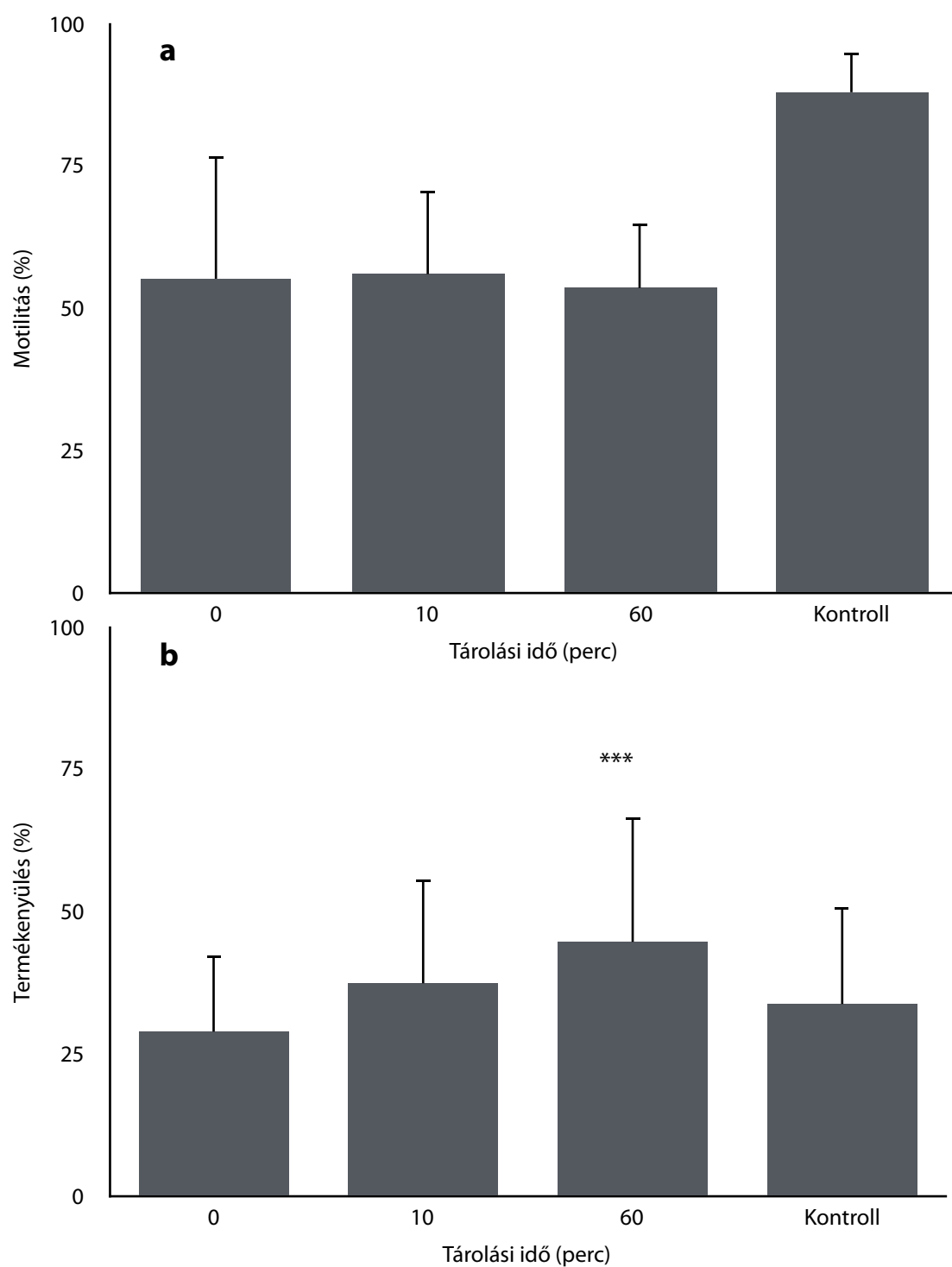
9. ÁBRA: A ponty diploid (a) és haploid (b) metafázisa frissen kelt szabadembriókból preparálva. A diploid egyed kromoszómaszáma $2n = 100$, a haploidé $1n = 50$. Az ábrák 1000 $\times$ nagyításon készültek. Fotó: Horváth Ákos.

perces hűtés után figyeltük meg, azonban statisztikailag igazolható különbséget nem találtunk az egyes kezelt csoportok között, illetve ezek és a kontroll csoport eredményei között sem (6. ábra). Az 5 ml-es műszalmák esetében a hűtési idő szignifikáns hatást gyakorolt a kelési eredményekre ($P = 0,0175$). A legmagasabb kelés ebben ez esetben $39 \pm 27\%$ volt és 5 perces hűtési idő mellett kaptuk. A megfigyelt kelési arány a kezelt csoportok mindegyikében szignifikánsan különbözött a kontroll csoportban kapottól ($91 \pm 0\%$).

A sperma-ikra arány és a különböző méretű műszalmák hatását vizsgáló kísérletben mind a termékenyített ikra mennyiségének ($P = 0,0093$), mind a műszalmák méretének ($P = 0,0186$) szignifikáns hatása volt a kikelt szabadembriók százalékos arányára. Az 1,2 ml-es műszalmák használatakor a legmagasabb kelési arányt ($86 \pm 12\%$) 10 g ikra termékenyítésekor, azaz a legmagasabb, $1,775 \times 10^6 : 1$ sperma-ikra aránnyal érték el, azonban a különböző ikratételek termékenyítésekor kapott kelési eredmények között szignifikáns különbséget nem kaptunk (7. ábra). Az 5 ml-es műszalmákkal a legmagasabb kelési arány $65 \pm 18\%$ volt, amit 80 g ikra termékenyítésekor ($8,875 \times 10^5 : 1$ sperma-ikra arány) figyeltünk meg, azonban statisztikailag szignifikáns különbség csak a 80 g és a 120 g ikra termékenyítésekor kapott eredmények között volt. A kontroll csoport kelése $83 \pm 4\%$ volt.

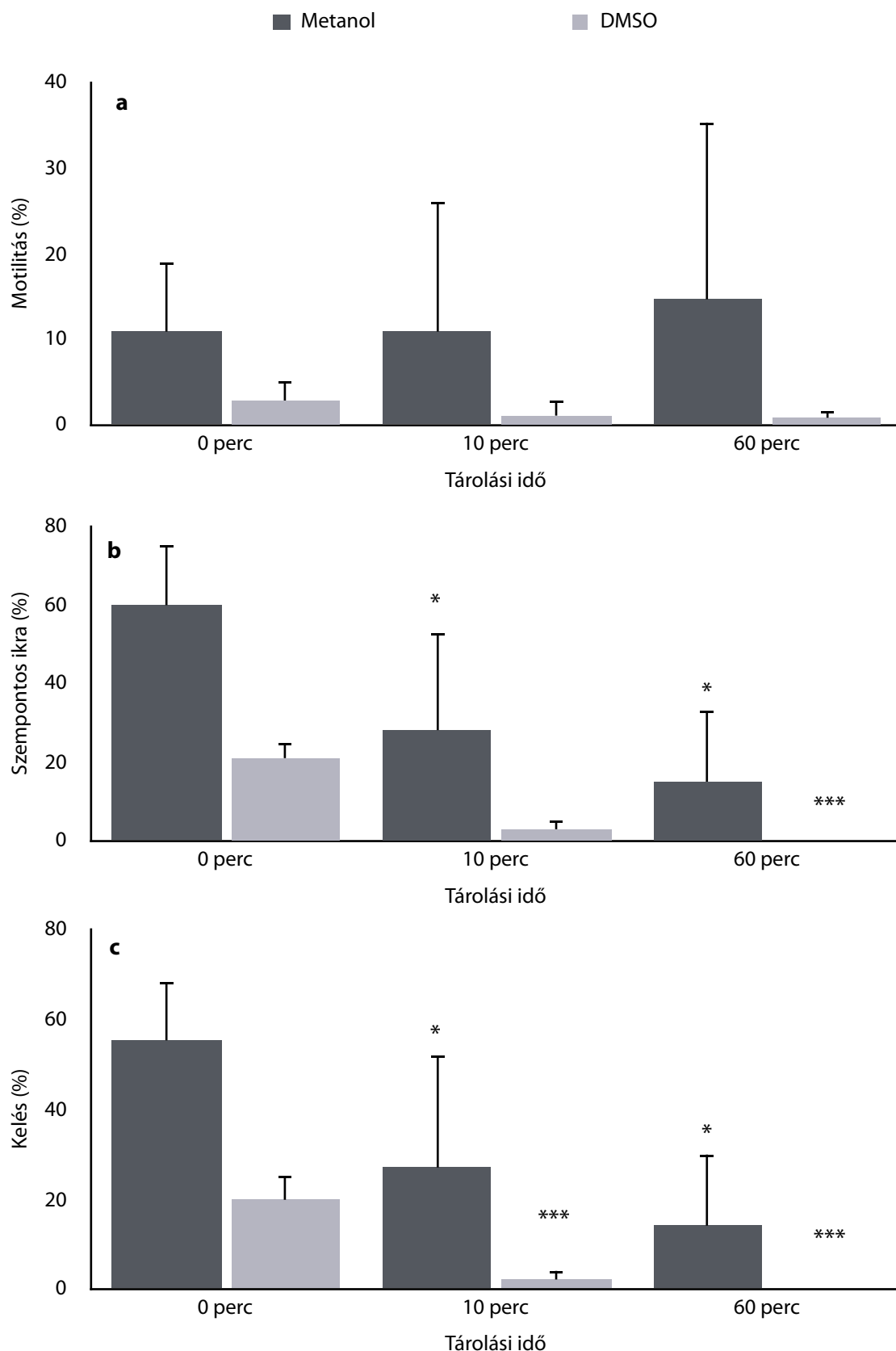
Meglepő módon a legtöbb torz fejlődésű szabadembrió (15 $\pm$ 9%) a kontroll csoportban kaptuk, míg a mélyhűtött spermával termékenyített csoportok közül a legmagasabb embrionális torzulást (13 $\pm$ 7%) 80 g ikra 5 ml-es műszalmában hűtött spermával végzett termékenyítésekor kaptuk (8. ábra). A termékenyített ikra mennyisége szignifikáns hatást gyakorolt a torz fejlődésű szabadembriók arányára ($P = 0,0032$), míg a műszalmák mérete esetében nem találtunk ilyen hatást. Egyáltalán nem találtunk torz szabadembriókat a 120 g-os csoportban, amit 5 ml-es műszalmában hűtött spermával termékenyítettünk, azonban a kelés is ebben a csoportban volt a legalacsonyabb (21 $\pm$ 14%). A embrionális torzulások a következőkben nyilvánultak meg: gerinctorzulások, behajlott vagy hiányzó farok, pigmenthiány, a feji szervek (pl. szemek) vagy az egész fej hiánya.

A kromoszóma vizsgálatokat 268 frissen kelt szabadembrióon végeztük el. A ponty diploid kromoszómaszáma $2n = 100$ (Ráb et al., 1989; Xu et al., 2014). Mivel a preparátumokban az egyes metafázisokban számolt kromoszómák száma nem mindig volt pontosan 100, azokat az egyedeket, amelyeknek a metafázisai 51-104 közötti kromoszómát tartalmaztak, diploidnak tekintettük, még akkor is előfordulhat, hogy mozaikos egyedekről volt szó. Haploidnak kizárólag azokat az egyedeket tekintettük, amelyek 50, vagy annál alacsonyabb kromoszómaszámú metafázisokat tartalmaztak (9. ábra). A legtöbb torz szabadembrió diploid volt mindegyik vizsgálati csoportban (10. ábra). Haploid egyedeket



11. ÁBRA: A sebes pisztráng mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni motilitása (a) és termékenyítő képessége (b) a felolvasztást követően azonnal, illetve 10 vagy 60 perc tárolást követően ($N = 6$). Kontroll: friss spermával végzett termékenyítés.

mindegyik mélyhűtött spermával termékenyített csoportban találtunk, kivéve az 1,2 ml-es műszalmával termékenyített 10 g-os és 40 g-os ikratételeket, illetve az 5 ml-es műszalmával



12. ÁBRA: A márványpisztráng metanol és dimetil-szulfoxid (DMSO) védőanyagok használatával mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni motilitása (a) és termékenyítő képessége (szempontos ikra százalékos aránya: b; kikelt ivadék százalékos aránya: c) a felolvasztást követően azonnal, illetve 10 vagy 60 perc tárolást követően. A csillagok az adott védőanyag használata esetében a 0 perces értékhez képest mért szignifikáns különbséget jelölik ($N = 5$, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$).

termékenyített 120 g-os ikratételt, mivel ez utóbbiban nem is találtuk torz fejlődésű ivadékokat. A haploid egyedek aránya a torz fejlődésű lárvákban belül igen alacsony volt, 2-6% között változott. Szintén nem találtunk 104 kromoszómánál többet tartalmazó metafázist.

4.3 A lazacfélékben végzett vizsgálatok eredményei

4.3.1 A sebes pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

A felolvasztás utáni tárolást vizsgáló kísérletünkben a sebes pisztráng mélyhűtött spermájának a felolvasztás utáni motilitása $55 \pm 21\%$ volt közvetlenül a felolvasztás után, $56 \pm 15\%$ 10 perc és $53 \pm 12\%$ 60 perc tárolás után. A friss sperma motilitása $88 \pm 7\%$ volt. A különböző tárolási időpontokban megfigyelt motilitás értékek között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget.

A sebes pisztrángban kinyert ikra minősége általánosságban igen gyenge volt ($34 \pm 14\%$ termékenyülés). A termékenyülési eredmények tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes kezelések között, illetve a kezelések és a kontroll között. Az értékek $29 \pm 14\%$ (felolvasztás utáni azonnali termékenyítés esetében) és $45 \pm 22\%$ (60 perc felolvasztás utáni tárolást követő termékenyítés esetében) között ingadoztak (11. ábra).

4.3.2 A márványpisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

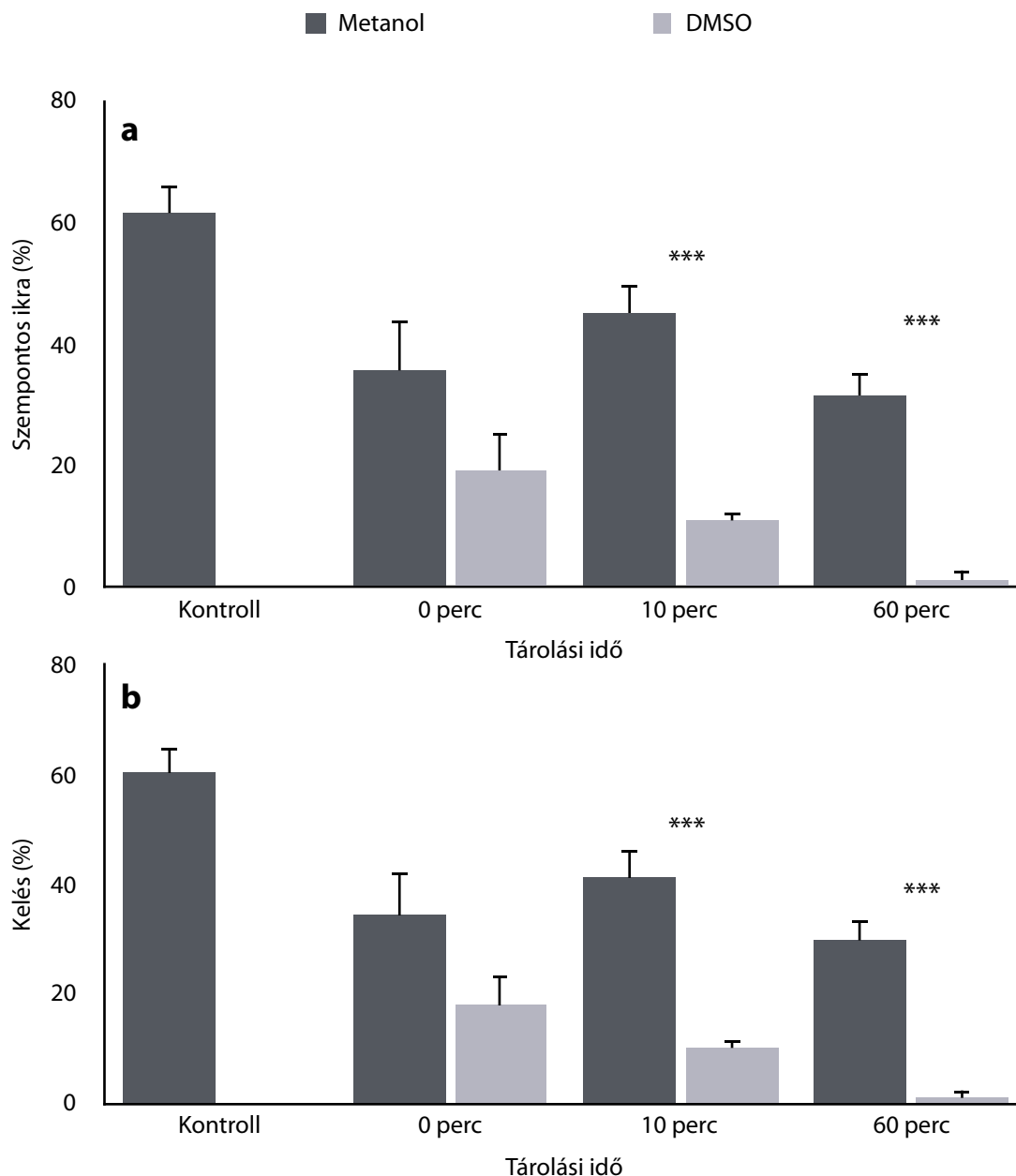
A márványpisztráng esetében a metanol védőanyag minden esetben jobb eredményeket adott, mint a DMSO. A felolvasztás utáni motilitás mindkét védőanyag esetében igen alacsony volt, a legjobb eredmények átlagosan 11-15% körül mozogtak. A védőanyag típusa ugyanakkor szignifikáns hatást gyakorolt a kapott felolvasztás utáni motilitás eredményeire ($P = 0,0156$), valamint a szempontos ikra százalékos arányára és a kelésre ($P < 0,0001$ mindkét esetben).

A felolvasztás utáni tárolás ideje szintén szignifikáns hatást gyakorolt a szempontos, illetve kikelt ikra százalékos arányára ($P < 0,0001$ mindkét esetben). A legmagasabb termékenyülést (szempontos ikra százalékos aránya), illetve kelést ($60 \pm 15\%$, illetve $55 \pm 13\%$) a felolvasztást követő azonnali termékenyítés esetében kaptuk metanol védőanyag használata mellett, azonban nem találtunk szignifikáns különbséget az azonnali és a 10 perc tárolást követő termékenyítéskor kapott eredmények között (12. ábra). A kontroll csoportban a szempontos ikra aránya $81 \pm 2\%$, a kelés $76 \pm 3\%$ volt. A vizsgált öt tejes egyed közül az egyik kimagaslóan magas eredményeket adott: 75% szempontos ikrát és 71% kelést a felolvasztás után azonnal, illetve 73% szempontos ikrát és 71% kelést 10 perc felolvasztás utáni tárolást követően.

4.3.3 A szivárványos pisztrángban végzett vizsgálatok eredményei

A szivárványos pisztráng esetében mind a védőanyag ($P < 0,0001$), mind a tárolási idő szignifikáns hatást gyakorolt a szempontos ikra százalékos arányára ($P = 0,0355$) és a kelésre ($P = 0,0425$). A DMSO védőanyag használata gyenge termékenyülést eredményezett, a szempontos ikra százalékos aránya $17 \pm 10\%$ és $2 \pm 1\%$ között, a kelési arány pedig $16 \pm 9\%$ és $1 \pm 1\%$ között változott. Metanol védőanyag használata mellett jelentősen magasabb termékenyülést értünk el, a szempontos ikra aránya $45 \pm 5\%$ – $32 \pm 4\%$, a kelés pedig $41 \pm 5\%$ – $30 \pm 4\%$ volt. A DMSO védőanyag használata esetében a termékenyülési mutatók a tárolási idő függvényében csökkentek, míg a metanol használatakor nem találtunk szignifikáns

különbséget az egyes tárolási időknél kapott eredmények között. Mindegyik eredmény szignifikáns különbséget mutatott a kontroll csoporthoz képest ($61 \pm 4\%$ szempontos ikra és $60 \pm 4\%$ kelés, 13. ábra).

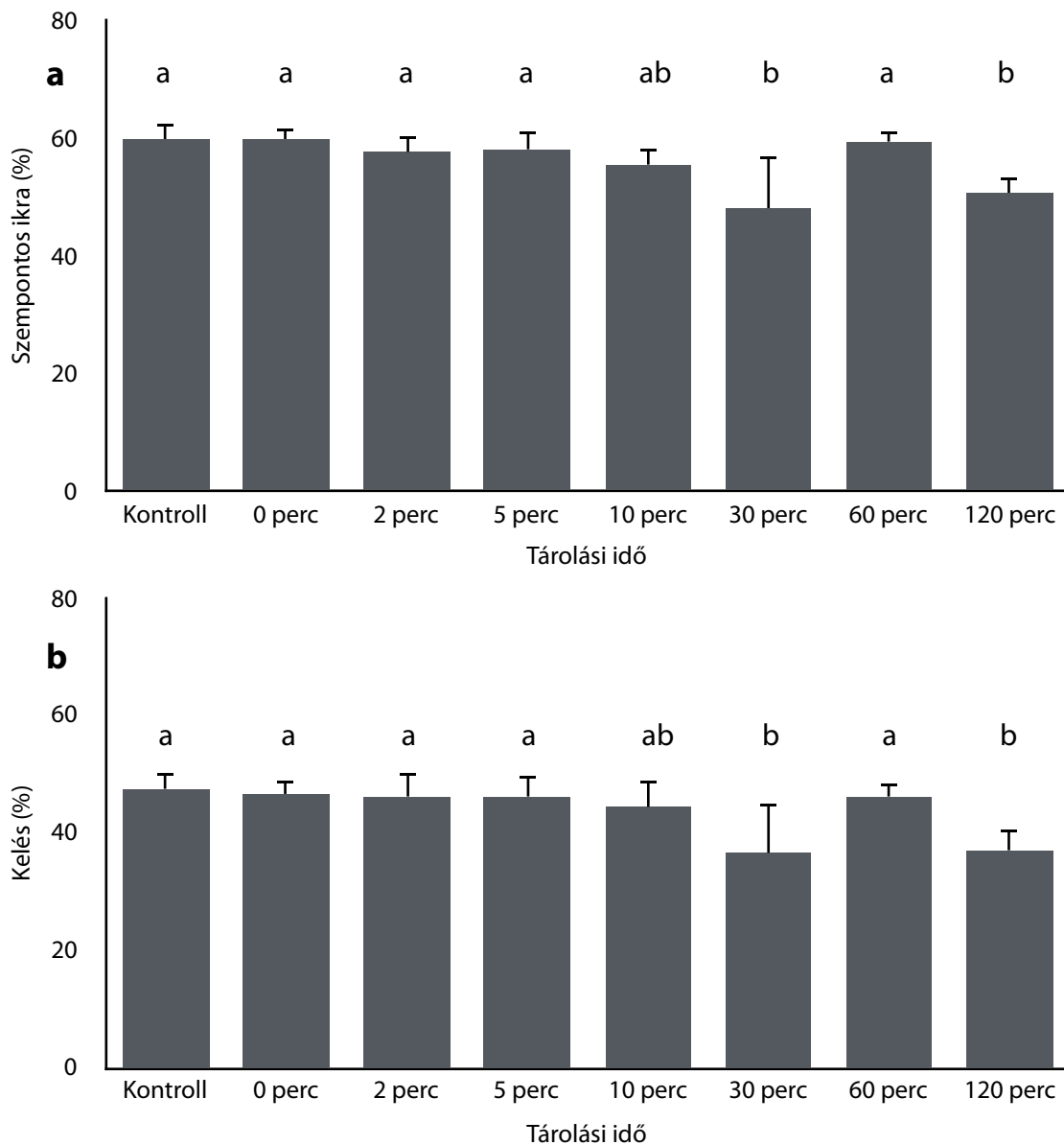


13. ÁBRA: A szívárványos pisztráng metanol és dimetil-szulfoxid (DMSO) védőanyagok használatával mélyhűtött spermájának termékenyítő képessége (szempontos ikra százalékos aránya: a; kikelt ivadékok százalékos aránya: b) a felolvasztást követően azonnal, illetve 10 vagy 60 perc tárolást követően ($N = 6$, kontroll: friss sperma). A csillagok a két védőanyag használatakor kapott eredmények közötti szignifikáns különbséget jelölik az adott tárolási időpontban ($P < 0,0001$).

4.3.4 A pénzes pérben végzett vizsgálatok eredményei

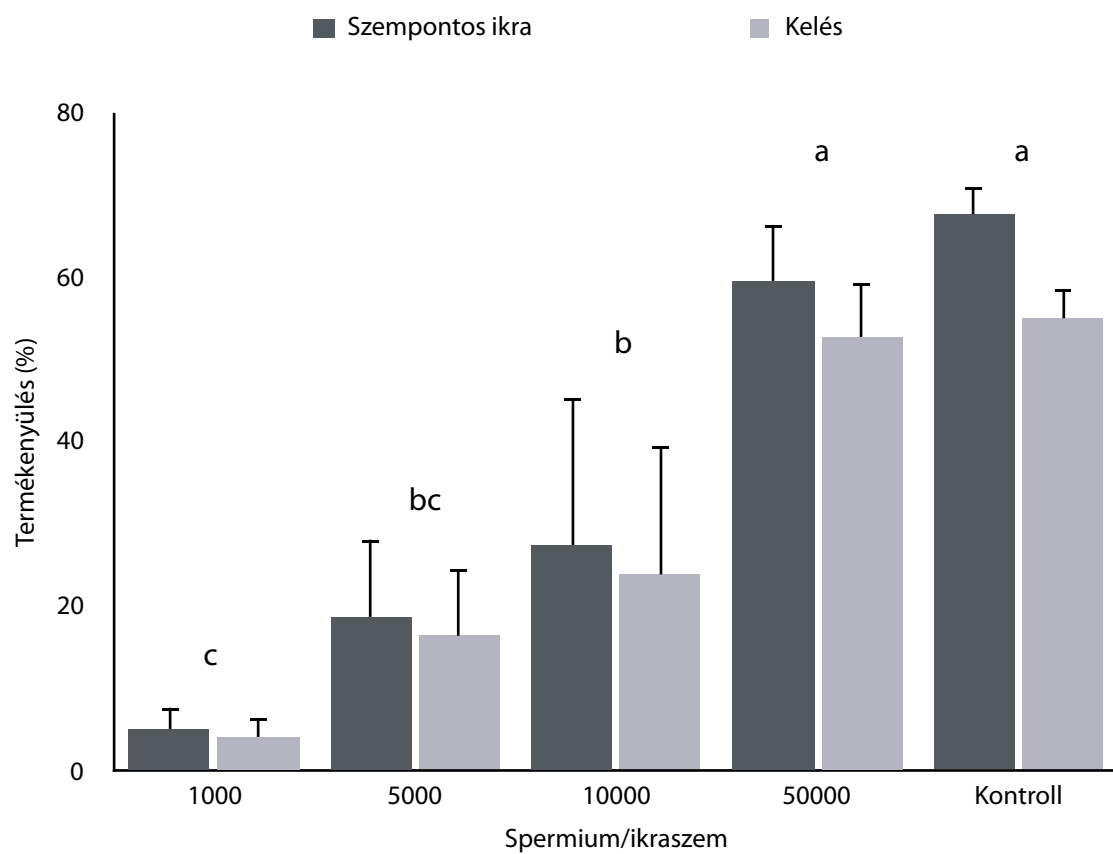
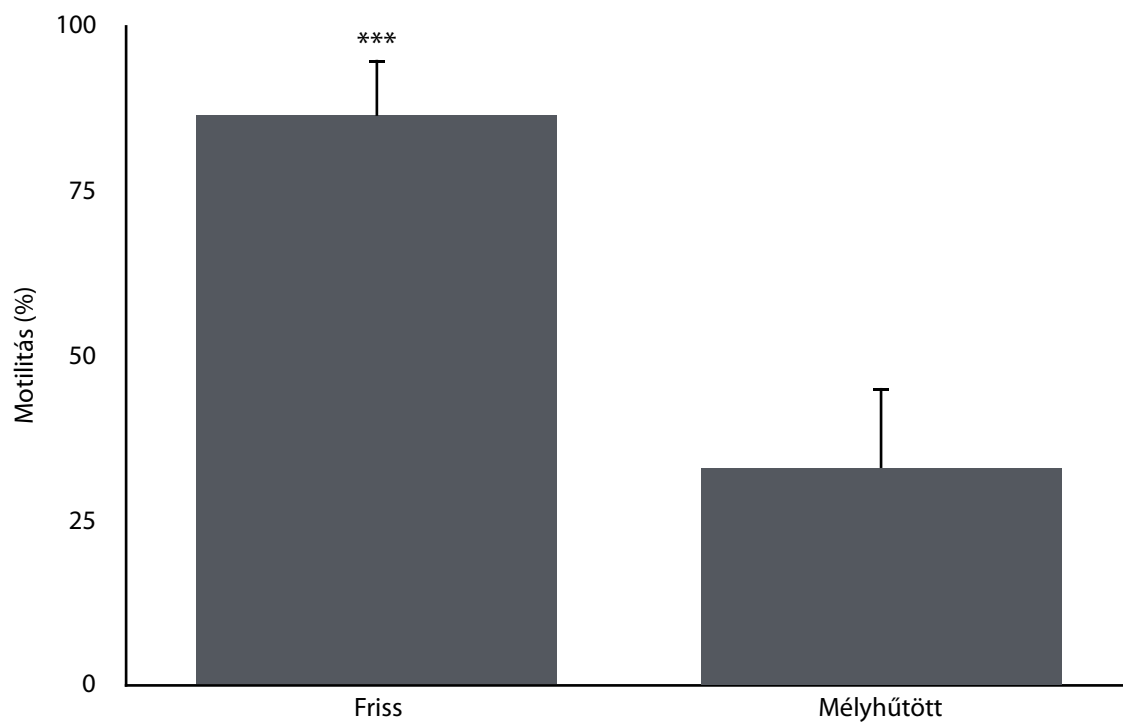
A pénzes pérben végrehajtott kísérletek kontroll csoportjában a szempontos ikra aránya $60 \pm 3\%$, a kelés pedig $48 \pm 3\%$ volt. A felolvasztás utáni tárolás hatását vizsgáló kísérletben a tárolási időnek szignifikáns hatása volt a szempontos ikra százalékos arányára ($P < 0,0001$) és

a kelésre is ($P = 0,0004$). Ettől függetlenül a termékenyülési mutatókban nem jelentkezett szignifikáns különbség egészen a felolvasztás utáni 60. percig. A szempontos ikra aránya $60 \pm 2\%$ volt a felolvasztás utáni azonnali termékenyítéskor és $59 \pm 2\%$ volt 60 perc tárolást követően (14. ábra). A kelés ugyanezekben az időpontokban $47 \pm 3\%$ és $46 \pm 2\%$ volt. Statisztikailag igazolható csökkenést a termékenyülési mutatókban csak a felolvasztás utáni 120. percben tapasztaltunk, illetve a 30. percben is, azonban az utóbbi emberi hibának tudható be (kevesebb spermát használtunk a termékenyítéshez).



14. ÁBRA: A pénzes pér mélyhűtött spermájának termékenyítő képessége (a: szempontos ikra százalékos aránya; b: kelési arány) a felolvasztás utáni tárolás függvényében. Az azonos betűkkel jelölt eredmények nem különböznek szignifikánsan ($N = 5$, $P < 0,05$).

A sperma-ikra arányt vizsgáló kísérletünkben a mélyhűtésre kiválasztott friss spermaminták motilitása $86 \pm 8\%$ ($N = 5$) volt, ami szignifikánsan különbözött ($P < 0,0001$) a



16. ÁBRA: A pénzes pér mélyhűtött spermájának termékenyítő képessége különböző sperma-ikra arányok használata mellett. Az azonos betűkkel jelölt eredmények szignifikánsan nem különböznek ($N = 5$, $P < 0,05$).

felolvasztott sperma motilitásától ($33 \pm 11\%$; 15. ábra). A sperma koncentrációja $2,18 \times 10^9$ és $7,20 \times 10^9$ spermium/ml között változott (átlagosan $5,12 \pm 2,21$ spermium/ml).

A sperma-ikra arány szignifikáns hatást gyakorolt mind a szempontos ikra százalékos arányára, mind a kelési arányra ($P < 0,0001$ mindkét paraméter esetében). A legmagasabb arányú szempontos ikrát ($60 \pm 8\%$), illetve kelést ($53 \pm 7\%$) a legmagasabb, 5×10^4 spermium/ikraszem sperma-ikra arány esetében kaptuk (16. ábra). Ez az eredmény nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoportban elért eredményektől ($68 \pm 3\%$ szempontos ikra és $55 \pm 3\%$ kelés). Sikeres ikrakelést tapasztaltunk azonban még a legalacsonyabb sperma-ikra arány mellett termékenyített ikratételekben is (10^3 spermium/ikraszem, $5 \pm 3\%$ szempontos ikra és $4 \pm 2\%$ kelés).

4.4 A kidolgozott módszerek gyakorlati alkalmazásának eredményei

4.4.1 A ponty fajban kidolgozott módszerek alkalmazása

A 2005-ben végzett munka során tervezett 180 egyeddel szemben 187 egyed spermáját hűtöttük le. A tervezett fajtákból 8 hazai és 2 külföldi fajta esetében sikerült lehűteni a megállapodásban rögzített 10 egyed spermáját, sőt az amuri fajta esetében 4 egyeddel túl is teljesítettük azt. Hét hazai és egy külföldi fajta esetében nem sikerült lehűteni a tervezett 10 egyed spermáját, sőt a dinnyési fajta esetében mindössze egy egyedről kaptunk spermát. Ezekon kívül azonban, lehűtöttük a megállapodásban nem szereplő 2 hazai és 5 külföldi fajta különböző egyedeinek spermáját, amelyek közül a poljanai fajta esetében eltároltuk az előírt 10 egyed mintáit (9. táblázat).

A minták visszaellenőrzése során a felolvasztott 50 mintából 46 műszalmában találtunk mozgó spermiumokat. Az egyes minták motilitása 10 és 80 % között mozgott, az átlagos motilitás 47 ± 20 % volt a fent említett 46 mintában. A maradék 4 mintából egy esetben 0 % volt a motilitás, azaz nem találtunk mozgó spermiumokat, 3 mintában pedig értékelhetetlen volt a motilitás, mivel ezekben egyáltalán nem találtunk sejteket. Ennek oka, hogy mélyhűtéskor vagy felolvasztáskor az adott hígító használata mellett megfigyelhető a sejtek agglutinációja, ami egy kocsonyás állapot kialakulásához vezet.

A 2007-ben végzett munka során a Szarvason gyűjtött minták kiindulási motilitása egyöntetűen 90% volt. A kajászói minták esetében a kiindulási motilitás 50 és 80% között ingadozott egyedről függően, aminek az oka feltehetően az elmaradt hormonkezelés volt. Ettől függetlenül, mindegyik mintát mélyhűtésre alkalmasnak találtuk. A munka során mind a 25 tervezett egyedről hűtöttünk le spermamintákat. Az egyik egyedről nem sikerült (19. számú, Dunai vadponty fajta) 40 db műszalmányi spermát lehűteni, ebben az esetben csak 38 szalmát tudtunk eltenni.

4.4.2 A lazacfélékban kidolgozott módszerek alkalmazása

A genetikai vizsgálatok eredményei alapján 2009-ben 15-ből 3, 2010-ben 19-ből 4, 2011-ben pedig 25-ből 5 egyedet választottak ki a Tolmini Horgászegyesület munkatársai felhasználásra. Ezeket 2009-ben egy, 2010-ben kettő és 2011-ben négy keltetőházi szaporításban használták fel. A termékenyülési eredmények szempontos stádiumban 27,4% és 91,3% között, míg a kelési eredmények 25,4% és 82,3% között váltakoztak (10. táblázat). Az egymást követő három évben összesen 21 467 ivadékot állítottak elő mélyhűtött spermából az egyesület munkatársai.

9. TÁBLÁZAT: A NAIK Halászati Kutatóintézetének 2005-ben létrehozott mélyhűtött génbankjában eltárolt minták származása és száma.

Hazai fajták és tájfajták		Külföldi fajták és tájfajták	
megnevezés	használt egyedek száma	megnevezés	használt egyedek száma
Bikali tükrös	9	Amuri pikkelyes	14
Dinnyési tükrös	1	Ropsa pikkelyes	8
Dunai vadponty	10	Vietnami pikkelyes	10
Felsősomogyi tükrös	10	Fresinet	7
Hortobágyi tükrös	3	Lengyel	3
Nagyatádi tükrös	5	Lengyel tükrös	1
Palkonyai tükrös	7	Nasici	4
Sumonyi tükrös	10	Poljanai	10
Szarvasi P22	10		
Szarvasi P3	10		
Szarvasi pirospony	6		
Tatai pikkelyes	10		
Tiszai vadponty	10		
Szegedi tükrös	10		
Varáslói tükrös	6		
Szarvasi 15	7		
Szarvasi 215	6		

A márványpisztráng esetében a Huda Grapa-patakban élő állomány hímjeinek spermáját gyűjtjük be minden év novemberében és mélyhűtjük a kidolgozott módszertannal. A mélyhűtött spermát a Tolmini Horgászegyesület munkatársai használják fel a szaporítási időszakban a tenyészállományukban található és a Huda Grapa-patakból származó (azaz populáció-azonos) ikrások ivartermékének megtermékenyítésére. A szempontos stádiumú ikrát mesterséges fészkekbe helyezik ki előre kiválasztott patakokban (pl. a Bača folyó forráshoz közeli izolált szakaszain), ahol a kikelő ivadékok új populációkat hoznak létre.

10. TÁBLÁZAT: A pénzes pér mélyhűtött spermájával kapott termékenyülési eredmények, amelyeket a szlovéniai Tolmini Horgászegyesület halgazdaságában a spermamélyhűtés gyakorlati alkalmazásakor kaptunk. Csillaggal (*) jelöltük a friss spermával végzett kontroll csoportok termékenyülési eredményeit.

Fejés dátuma	Lefejt ikra (db)	Szem pontos ikra (db)	Szem pontos ikra (%)	Kikelt ivadék (db)	Kelés (%)
2009.05.20	4 975	2 543	51,1	2 494	50,1
2010.04.22	31 710	23 163	70,3*	-	-
2010.04.22	5 081	4 072	80,1	3 807	74,9
2010.04.30	44 855	16 835	37,5*	-	-
2010.04.30	3 845	1 054	27,4	975	25,4
2011.04.18	5 167	4 147	80,3	3 878	75,1
2011.04.22	5 101	3 662	71,8	3 408	66,8
2011.04.29	5 447	4 975	91,3	4 485	82,3
2011.05.06	3 639	2 843	78,1	2 420	66,5

5. Eredmények értékelése

5.1 A tokalakúakban kapott eredmények értékelése

A tokalakúakban kapott eredmények azt mutatták, hogy a metanol védőanyag használata magasabb felolvasztás utáni termékenyítő képességet eredményezett, mint a DMSO védőanyag. A felolvasztás utáni motilitás eredményei között ugyanakkor nem volt megfigyelhető hasonló kiugró különbség, különösen alacsony (5%) védőanyag-koncentráció mellett. Ezek az eredmények megegyeznek a korábban lénai tok (*Acipenser baerii*) fajban kapottakkal, amelyek szerint a felolvasztás utáni motilitás és a termékenyítő képesség nem feltétlenül áll összefüggésben egymással (Glogowski et al., 2002). Korábbi, tokfélékben (Tsvetkova et al., 1996; Glogowski et al., 2002; Urbányi et al., 2004), illetve lapátorrú tokban (Mims et al., 2011) végzett kísérletek során a DMSO és a metanol egyaránt hatékony védőanyagnak bizonyult, azonban a DMSO védőanyag használata mellett kapott termékenyülési és kelési eredmények erősen ingadoztak. A rövidorrú tokban végzett kísérleteink előtt a két védőanyag hatékonyságát nem hasonlították össze tokalakúakban.

A metanol védőanyag hatékonyságát már a vizsgálataink előtt több tanulmány bizonyította. Sikeresen alkalmazták lazacfélék (Lanhsteiner et al., 1997), pontyfélék (Harvey et al., 1982), harcsaalakúak (Steyn, 1993; Steyn & Van Vuren, 1987; Tiersch et al., 1994) és tilápia (Harvey, 1983) spermájának mélyhűtésére. A metanol védőanyagként viszonylag alacsony toxicitású és több sejttípus esetében (pl. emlős sejtvonalakban is, Harvey et al., 1982) hatékonyabbnak bizonyult, mint a glicerín vagy a DMSO. A DMSO védőanyag esetében tapasztalt viszonylag magas felolvasztás utáni motilitás azt jelzi, hogy a sejtek túlélnek a mélyhűtést és felolvasztást, azonban a termékenyítő képességüket elveszítik.

A védőanyagok hatékonysága függött a koncentrációjuktól is. Mindhárom vizsgált halfajban az alacsonyabb koncentrációjú védőanyagok általában magasabb felolvasztás utáni motilitást és termékenyülést eredményeztek. A magasabb koncentrációk (10 és 15%) esetében tapasztalt alacsonyabb termékenyülési eredmények azt jelzik, hogy ezek még metanol védőanyag esetében is toxikusak a sejtekre nézve. Ez alól csak a lapátorrú tokban végzett első kísérlet eredményei képeznek kivételt, azonban a későbbi kísérleteink ebben a fajban is igazolták a fenti hipotézist.

Az eredmények alapján a különböző hígítók is hatást gyakorolnak a mélyhűtött toksperma termékenyítő képességére. A rövidorrú tok esetében az oT hígító használata szignifikánsan alacsonyabb termékenyülést eredményezett, mint az mT, illetve mHBSS hígítók használata. A sápadt tok és a lapátorrú tok esetében szintén az mT hígító bizonyult hatásosabbnak, mint az alternatívaként használt mHBSS hígító.

A rövidorrú tok fajban kapott eredmények késztettek arra, hogy megmérjem az egyes hígítók ozmolalitását különböző védőanyagok és védőanyag-koncentrációk jelenlétében. Az eredmények azt mutatták, hogy azok a kombinációk, amelyek esetében a tokfélék szeminális plazmájának fiziológiás ozmolalitásánál magasabb értéket mutattak, gyengébb termékenyülést és kelést eredményeztek. A DMSO védőanyag használata jelentős mértékben növelte a hűtőmedium ozmolalitását, függetlenül a használt hígítótól, míg a metanol védőanyag

használata nem gyakorolt rá szignifikáns hatást. Ezek az eredmények megegyeznek a korábban Tiersch et al. (1994) és Ogier de Baulny et al. (1997) által megfigyelttel, akik a felsorolt védőanyagok hasonló hatásáról számoltak be. Hasonló módon viselkedtek a különböző hígítók is: az oT hígító ozmolalitása szignifikánsan magasabb volt az mT hígítóénál. Az mHBSS hígító esetében ezt a hatást nem vizsgáltam, mivel azt eleve úgy kevertem ki a törzsoldatból, hogy az ozmolalitása 100 mOsm/kg legyen. Logikus tehát a következtetés, hogy a hűtőmedium ozmolalitása összefüggésben áll a mélyhűtött tok sperma termékenyítő képességével.

A védőanyagként használt DMSO és metanol ozmolalitásra gyakorolt hatása nem egyértelmű és nehezen megmagyarázható. A metanol moláris tömege 32,04 g, míg a DMSO-é 78,13 g, így azonos térfogatszázalék mellett a hűtőmedium több metanolt tartalmazott, mint DMSO-t. Ennek következtében az ozmolalitás klasszikus definíciója alapján a metanolt tartalmazó oldat ozmolalitásának is magasabbnak kell lennie. Ezt támasztja alá egy másik (itt nem tárgyalt) megfigyelésünk, hogy a fagyáspont ozmométerrel (tehát nem a vizsgálatunkhoz használt páramérés ozmométerrel) mért ozmolalitás esetében a metanol valóban magasabb értékeket mutat, mint az azonos térfogatszázalékú DMSO. Nyilvánvaló tehát, hogy a metanolnak a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére gyakorolt pozitív hatása mögött más mechanizmusok állnak, mint az ozmolalitás. A páramérés ozmométerrel mért értékek ugyanakkor egybeesnek a termékenyítő képességben tapasztalt különbségekkel, nem csak a védőanyagok, hanem a hígítók esetében is.

A metanol és DMSO védőanyagoknak a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére gyakorolt hatása mögött állhat továbbá az idő előtti spontán akroszóma-reakció kiváltása is. A halak közül egyedülálló módon a tokalakúak spermiumai rendelkeznek akroszómával. A sikeres termékenyülés egyik feltétele ezekben a fajokban, hogy az akroszóma-reakcióra csak a termékenyülés pillanatában, a mikropyle nyílásában rögzült spermiumban kerüljön sor. A spermamélyhűtés több tokfélében indukálta a spontán akroszóma-reakciót, amit az akroszómával összefüggésben lévő fehérjék koncentrációjának növekedésével igazoltunk a felolvasztott spermát körülvevő hűtőmediumban (Piros et al., 2002). Később az akroszóma fluoreszcens festésével bizonyították, hogy a DMSO jóval magasabb arányban indukált spontán idő előtti akroszóma-reakciót, mint a metanol védőanyag használata (Pšenička et al., 2008).

A spermiumok életképessége fajonként eltérő volt és általánosságban megegyezett azzal a trenddel, amely szerint a rövidorrú tok spermája gyengébb minőségű volt, mint a másik két vizsgált fajú. Az egyes vizsgálati tényezők (motilitás, termékenyítő képesség) közötti finomabb összefüggések kimutatására ugyanakkor nem bizonyult alkalmasnak, sőt, több esetben nyilvánvalóan hibás értékeket eredményezett, pl. azokban az esetekben, amikor a sperma felolvasztás utáni motilitása látszólag magasabb volt, mint az ép sejtmembránnal rendelkező sejtek aránya. Ennek okai elsősorban módszertani hibák lehettek, amik a kísérletek körülmintebb végrehajtásával kiküszöbölhetők.

A lapátorrú tokban kapott további eredményeink megalapozzák egy üzemi méretű mélyhűtési módszertan kialakítását. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a lapátorrú tok spermája mind 0,5 ml-es, mind 5 ml-es műszalmákban mélyhűtve alkalmas nagyobb mennyiségű ikra sikeres megtermékenyítésére. A 0,5 ml-es műszalmákban kapott eredmények azt mutatják, hogy a termékenyülés sikere elsősorban a vizsgálatokhoz használt hím egyed spermájának minőségétől függ. Az 5 ml-es műszalmák használatakor ugyanakkor a mélyhűtött sperma termékenyítő képessége elmarad a friss spermától. Hasonló eredményeket kapott Lahnsteiner et al. (1997), illetve Cabrita et al. (2001) is szivárványos pisztráng spermájának mélyhűtésekor. Az eredményeink ugyanakkor azt is mutatják, hogy a nagyobb műszalmák használatakor a termékenyítés sikere jelentős mértékben függ a védőanyag-koncentrációtól és a hűtési időtől. Ennek megfelelően a hűtés körülményeinek további

optimalizálásával csökkenthetők a mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek és a kontroll csoport termékenyülési értékei közti különbségek. Mivel a tokalakúak igen nagy mennyiségű spermát termelnek (saját tapasztalataim szerint egyes fajok nagyobb hím egyedeitől egy alkalommal akár 1000 ml sperma is fejhető), az 5 ml-es műszalmák használatának komoly gyakorlati jelentősége lehet.

5.2 A ponty fajban kapott eredmények értékelése

A lapátorrú tokhoz hasonlóan, a ponty mélyhűtött spermájával kapott eredményeink azt mutatják, hogy mindkét műszalma-típus (1,2 ml és 5 ml) alkalmas a pontysperma mélyhűtésre és az azzal végzett termékenyítésre. Az említett műszalma-típusok kevésbé elterjedtek, mint a 0,25 és 0,5 ml-esek, azonban a halak esetében használatuknak van létjogosultsága, mivel a legtöbb halfaj nagy mennyiségű spermát termel és azzal nagy mennyiségű ikrát is kell megtermékenyíteni. Az 1,2 ml-es műszalmák már viszonylag régóta kaphatók kereskedelmi forgalomban, azonban a bikasperma mélyhűtése során a tenyésztők fokozatosan átszoktak a kisebb térfogatú műszalmák használatára, mivel azokkal jobb termékenyülési eredményeket értek el (Pickett & Berndtson, 1974). Lahnsteiner et al. a fent említett 1997-ben megjelent tanulmányában az 1,2 ml-es műszalmák hasonlóan hatékonyak bizonyultak a szivárványos pisztráng spermájának mélyhűtésekor, mint a 0,5 ml-esek.

Az 5 ml-es műszalmák használatának megítélése ugyanakkor ellentmondásosabb, mint az 1,2 ml-eseké. Az első vizsgálatokat ezzel a műszalma-típussal Wheeler & Thorgaard (1991) végezte, akik a kontroll csoport 49,3%-ának megfelelő termékenyülést kaptak 4,5 ml-es műszalmák használatakor. A lazacfélékben végzett vizsgálatokban az 5 ml-es műszalmákban hűtött spermával kapott termékenyülés minden esetben elmaradt vagy a kisebb térfogatúakkal kapottól, vagy a kontrolltól (Lahnsteiner et al., 1997; Cabrita et al., 2001). Az aranydurbincs (*Sparus aurata*) spermájának 5 ml-es műszalmákban végzett mélyhűtésekor a sperma egyes minőségi mutatói (motilitás, mitokondriális membránpotenciál, ATP-tartalom) csökkentek ugyan a felolvasztást követően, de a termékenyítő képesség nem (Cabrita et al., 2005b). A Brazíliában őshonos *Brycon amazonicus* spermájának mélyhűtésekor a 4 ml-es műszalmákban mélyhűtött sperma termékenyítő képessége elmaradt ugyan a friss spermáétól, de a hagyományos 0,5 ml-es műszalmákban hűtött spermáétól nem (Velasco-Santamaría et al., 2006). A tengeri fűrészes sügér (*Epinephelus marginatus*) spermája esetében a szerzők többféle tárolóeszközt vizsgáltak (kriocsöveket, valamint 0,5 és 5 ml-es műszalmákat) és véleményük szerint a kapott lipidperoxidációs mutatók alapján az 5 ml-es műszalmák voltak a legkevésbé alkalmasak a faj spermájának mélyhűtésére, ugyanakkor, ezzel a típussal kapták a legmagasabb felolvasztás utáni motilitás eredményeket (Riesco et al., 2017). Saját vizsgálataink során az 5 ml-es műszalmák kiválóan alkalmasnak bizonyultak a harcsa (*Silurus glanis*) spermájának mélyhűtésére (Bokor et al., 2010), amit később a mélyhűtött spermával végzett termékenyítésből származó ivadékok növekedése is igazolt (Bokor et al., 2015).

A pontyban, illetve lapátorrú tokban kapott eredményeink azt mutatják, hogy az 5 ml-es műszalma-típusnak lenne létjogosultsága a haltenyésztésben. Ezt bizonyítja az is, hogy a jelenleg egyetlen halsperma-mélyhűtéssel foglalkozó vállalkozás, a norvég Cryogenetics AS sem a hagyományos 0,5 ml-es műszalmákat használja, hanem a saját fejlesztésű 12,5 ml-es egységeit (<http://www.cryogenetics.com/products-and-services/cryopreservation/>). Ezen kívül az 5 ml-es műszalmákat gyártó és forgalmazó cég folyamatosan a katalógusában tartja ezt a terméket, holott nincs tudomásom róla, hogy azt gazdasági emlőállatokban használnák.

Vizsgálataink alapján a pontyban az ivadékkori torzulást nem lehet a mélyhűtött sperma alkalmazásának a számlájára írni, mivel torz ivadékokat a legmagasabb arányban a kontroll

csoportban figyeltünk meg. Eredményeink megegyeznek a Linhart et al. (2000) által megfigyelttel, aki szerint sem a friss, sem a mélyhűtött sperma használata nem gyakorolt hatást az ivadékkori torzulásra. Ezzel ellentétesek voltak a saját megfigyeléseink afrikai harcsában (*Clarias gariepinus*), ahol a mélyhűtött spermával végzett termékenyítésből származó ivadékok között szignifikánsan magasabb volt a torz egyedek aránya, mint a kontroll csoportban (Horváth & Urbányi, 2000). A ponty esetében az ivadékkori torzulás valószínűsíthetően elsősorban az ikrá kiindulási minőségétől (a kísérleteket az ívási időszak végén, június hónapban végeztük) és a keltetés során fellépő oxigénhiánytól eredeztethető, és a mélyhűtés esetleges hatását a fent említett tényezők nem tették kimutathatóvá.

Az ivadékkori torzulások arányától függetlenül, haploid egyedeket csak a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kikelt csoportokban találtunk. A kontroll csoportban nem találtunk haploid ivadékokat függetlenül attól, hogy a torz fejlődésű vagy ép szabadembriókat vizsgáltuk. Ezek az eredmények megegyeznek a korábban afrikai harcsában tett megfigyeléseinkkel, ahol az ivadékkori torzulások szintén haploid egyedek kialakulásához vezettek (Miskolczi et al., 2005). Az afrikai harcsában ugyanakkor triploid és tetraploid egyedeket is találtunk, míg a pontyban nem.

Haploid egyedek halakban általában genommanipulációs kísérletek során jönnek létre. Ilyenkor vagy besugárzással inaktivált nukleáris DNS-sel rendelkező ikrát termékenyítenek ép spermával (androgenézis), vagy inaktivált DNS-sel rendelkező spermával termékenyítenek ép ikrát (ginogenezis). A genommanipulációs eljárások során az embriók diploid (vagy inkább di-haploid) állapotát a második meiotikus (meiotikus ginogenezis) vagy az első mitotikus osztódás (anrogenézis és mitotikus ginogenezis) blokkolásával állítják helyre (Thorgaard, 1983). A haploid egyedek általában különböző torzulásokat mutatnak. A pataki szajblingban (*Salvelinus fontinalis*) a torz fejlődés a gerincoszlop rendellenességeiben, illetve a lekerékített szikzacskó formájában jelentkezik (May et al., 1988), míg a tengeri nagy rombuszhalban (*Scophthalmus maximus*) a hiányzó farki részben (Piferrer et al., 2004). A haploid egyedek a fent említett tanulmányok szerint – és a törzsfejlődés magasabb fokán álló gerincesekkel ellentétben – képesek eljutni a kelésig, azonban legkésőbb az önálló táplálkozás megkezdésekor elpusztulnak.

Az, hogy a kísérletünkben nem találtunk haploid egyedeket a kontroll csoportban, arra utal, hogy a haploidia a mélyhűtött spermával végzett termékenyítés eredménye. A mélyhűtés és a jégkristályok képződése során többféle károsodás érheti a sejteket. Ezek a károsodások elsősorban a sejtmembránt és a különböző sejtszervecskéket érintik. A sejtmembrán sérüléseit több tanulmány leírta halakban, pl. szivárványos pisztrángban a felolvasztást követően a spermiumok kevesebb, mint 20%-a őrizte meg a sejtmembránja épségét és ez az arány tovább csökkent az aktivációt követően (Cabrita et al., 1998). A sebes pisztráng spermiumaiban a sejtmembrán térszerkezetének átrendeződését figyelték meg a felolvasztás után (Drokin et al., 1998). Az emlősökben megfigyelt minták alapján a megváltozott szerkezetű spermiumokban a felolvasztást követően igen gyors ütemben képződnek reaktív szabadgyökök (Alvarez & Storey, 1992). Ezek a peroxidációs termékek igen károsak az örökítőanyagra nézve, a DNS kettős szálának törését vagy nukleotid bázisok kicserélődését okozhatják (Lopes et al., 1998). Ennek drámai következményei lehetnek, mivel halakban is bebizonyították, hogy a genotoxikus tényezőknek kitett sperma az utódok genomjában is változásokat indukál (Kubota et al., 1995). Feltételezésünk szerint a ponty spermiumaiban a mélyhűtés (fagyasztás és felolvasztás) reaktív szabadgyökök képződését indukálta, ami több sejtben az örökítőanyagot teljes mértékben inaktiválta. Az ilyen spermiumok képesek voltak ugyan megtermékenyíteni az ikraszemeket, azonban a fejlődő embrióhoz genommal nem járultak hozzá. Eredményeink ugyanakkor azt is bizonyítják, hogy a pontyban – még akkor is, ha lehetséges – az ilyen jellegű haploidia előfordulásának az esélye jelentéktelen és az ivadékkori torzulás nem írható a mélyhűtés számlájára.

5.3 A lazacfélékben kapott eredmények értékelése

A lazacfélékben végzett kísérleteink elsősorban a gyakorlati alkalmazás lehetőségeinek javítását célozták. A kísérleteket a dolgozatomban ugyan fajok szerint csoportosítottam, azonban alapvetően három különböző területet öleltek fel: a DMSO és metanol védőanyagok hatékonyságának összehasonlítását (márványpisztrángban és szivárványos pisztrángban), a sperma felolvasztás utáni eltarthatóságának vizsgálatát (az összes fajban), illetve a sikeres termékenyítéshez szükséges sperma-ikra arány meghatározását (a pénzes pérben).

Vizsgálataink során a metanol egyértelműen hatékonyabb védőanyagnak bizonyult a DMSO-nál, amit a kapott motilitási, termékenyülési és kelési eredmények is bizonyítanak. A metanol védőanyag hatékonyságát már a tokalakúakban végzett kísérletek tárgyalásakor részletesen ismertettem, ezért itt nem térek rá ki külön. Fontos ugyanakkor a két védőanyag kölcsönhatásának tárgyalása a sperma felolvasztás utáni tárolásának függvényében.

Eredményeink azt mutatták, hogy a lazacfélék spermája a felolvasztást követően legalább 10 percig (a szivárványos és márványpisztrángban), de akár egy óráig is (a sebes pisztrángban és a pénzes pérben) megőrzi a termékenyítő képességét. Eredményeinkből az is kiderül, hogy ez a tárolhatóság nem csak a fajtól, hanem a használt védőanyagtól is függ, azaz a fent leírt tárolhatóság csak metanol védőanyag használata mellett valósult meg. A korábbi szakirodalmi források lazacfélékben a felolvasztott sperma azonnali felhasználása mellett érveltek (Stoss & Holtz, 1981), sőt a közölt eredmények azt mutatták, hogy már 30 másodperces tárolás is szignifikánsan csökkentette a sperma termékenyítő képességét (Lahnsteiner et al., 1996b). Mindkét fent említett esetben ugyanakkor a szerzők DMSO védőanyagot használtak a sperma mélyhűtésére. Egyértelmű, hogy nagy mennyiségű ikra termékenyítésekor az ilyen rövid tárolási idők nem teszik lehetővé a mélyhűtött sperma hatékony felhasználását az indukált szaporításban. Ez különösen azért fontos, mert a mélyhűtött halsperma pont a lazacfélék – helyesebben az atlanti lazac (*Salmo salar*) – tenyésztésében áll a legközelebb a tömeges gyakorlati alkalmazáshoz. Saját vizsgálatainkkal párhuzamosan egy lengyel csoport az eredményeinkkel megegyező megfigyeléseket tett a pataki szajbling spermájának mélyhűtése során és arra a következtetésre jutott, hogy a sperma felolvasztás után még 60 percig megőrzi a termékenyítő képességét (Nynca et al., 2014). Ennek alapján kijelenthető, hogy a lazacfélék spermája a felolvasztás után biztonságosan tárolható legalább 10 percig (illetve egyes fajokban 60 percig) és felhasználható termékenyítésre.

A pénzes pér spermamélyhűtése során az tapasztaltuk, hogy akár ikraszemenként 5×10^4 spermium is elegendő a sikeres termékenyítéshez a különböző termékenységi mutatók csökkenése nélkül. Ez a szám lényegesen alacsonyabb a fajban korábban leírtaknál (Stein & Bayrle, 1978; Lahnsteiner et al., 1996a), és 20-szoros csökkenést jelent az említett forrásokban használt 10^6 spermiumhoz képest. A korábban javasolt arányhoz képest drasztikus csökkenést szintén a metanol védőanyag használatával lehet magyarázni, hiszen a fent említett irodalmi források mindegyikében DMSO védőanyag jelenlétében hűtötték a spermát. A fent már említett, velünk párhuzamosan dolgozó lengyel kutatócsoport szintén metanolt használt a pénzes pér spermájának mélyhűtésekör és az optimális sperma-ikra arányt $1,5 \times 10^5 : 1$ -ben határozták meg (Nynca et al., 2015).

Itt érdemes megemlíteni, hogy az általunk tanulmányozott lazacfélék közül a pénzes pér spermája bizonyult a legellenállóbbnak a mélyhűtés káros hatásaival szemben. Ez nem csak abban mutatkozott meg, hogy azonos mélyhűtési módszertan mellett ebben a fajban tapasztaltuk a legmagasabb termékenyülési arányokat, hanem abban is, hogy az extrém alacsony sperma-ikra arány ($10^3 : 1$) használata mellett is találtunk termékenyült ikrát,

amelyekből egészséges ivadék kelt ki. Hasonló megfigyeléseket tett pontyspermában Kašpar et al. (2008) aki 5×10^3 spermiumot használt egy ikraszem megtermékenyítésére.

A pénzes pérben termékenyítéshez használt mélyhűtött sperma abszolút térfogata is igen alacsony volt. Így például az $5 \times 10^4 : 1$ sperma-ikra arány esetében a termékenyítéshez felhasznált sperma tényleges mennyisége $22 \pm 12 \mu\text{l}$ volt. Ez azt jelenti, hogy egy műszalma tartalma ($500 \mu\text{l}$) 1100 g ikra megtermékenyítéséhez elegendő a termékenyülés hatékonyságának megőrzése mellett. Figyelembe véve az ebben a fajban ikrásonként átlagosan lefejezhető ikra mennyiségét ($100\text{--}150 \text{ g}$), a kereskedelmi forgalomban kapható $0,5 \text{ ml}$ -es műszalmák jól használhatók az üzemi szintű mélyhűtésre és nincs szükség ennél nagyobb térfogatú eszközök alkalmazására.

5.4 A kidolgozott módszerek gyakorlati alkalmazásának értékelése

A NAIK Halászati Kutatóintézetében (HAKI) létrehozott és a mai napig fenntartott mélyhűtött pontysperma-génbank Magyarországon egyedülálló. Nemzetközi viszonylatban természetesen több génbankról is van tudomásunk Oroszországban, Franciaországban, Csehországban, Németországban és az Amerikai Egyesült Államokban, ahogy azt a Szakirodalmi áttekintés fejezetben már ismertettem. Azt is fontos kiemelni, hogy a HAKI génbankjában eltárolt minták egyrészt az élő génbank kiegészítéseként működnek, másrészt lehetővé teszik, hogy egyes fajtákat visszakeresztezzünk önmagukkal, hogy elkerüljük a beltenyésztéses leromlást.

A felolvasztott spermaminták nagy részében találtunk mozgó sejteket, ennek megfelelően a génbankban eltárolt minták lehetővé teszik a sikeres termékenyítést. Ennek próbájára 2013-ban került sor, amikor a Szarvasi P22 fajta szaporításakor használtak fel a mélyhűtött spermamintákból és a kikelt ivadékot tenyészállomány-jelöltként nevelték fel.

A lazacfélékben kidolgozott módszer gyakorlati alkalmazása a mélyhűtött halsperma alternatív felhasználási területét jelenti. Ezekben a fajokban a génbanki munka a fajmegőrzési célú haltenyésztést egészíti ki. A Tolmini Horgászegyesület élen jár két helyi jelentőségű NATURA 2000-es faj (illetve változat) megőrzésében. Mindkét populáció esetében súlyos következményekkel járt a XX. század során végrehajtott haltelepítés. A Soča (Isonzo) folyó és vízrendszere az Adriai-tenger vízgyűjtőjéhez tartozik és halfaunája jelentősen különbözik a dunai (végső soron fekete-tengeri) vízgyűjtőjétől. A folyó vízrendszerében több alkalommal telepítettek „fajbővítés” címmel nem őshonos, a dunai vízgyűjtőből származó fajokat. Ezek közül a sebes pisztráng a márványpisztránggal képezett hibrideket, a pénzes pér pedig az adriai pénzes pérrel, ami ugyan fajazonos, azonban genetikailag és fenotípusosan is jelentősen elkülönült populációt alkotott. A két faj sorsa eltérően alakult: a márványpisztrágnak a magashegyi patakok izolált szakaszain fennmaradt 8 fajtiszta populációja (Crivelli et al., 2000; Fumagalli et al., 2002). Ezek a fizikai izoláció miatt nem hibridizáltak a sebes pisztránggal, ugyanakkor a populációikat több tényező is veszélyezteti. Az alacsony létszám miatt a génsodródás veszélye igen magas, a legtöbb vizsgált genetikai markeren az allélszám nagyon alacsony, sőt a populációk egymástól is rendkívüli módon különböznek. Ennek megfelelően minden populáció önmagában is egy genetikai szempontból értékes állományt jelent. A populációkat a földrajzi környezet és az időjárási események is veszélyeztetik, így pl. a 8 populációból az egyik (a Predelica-pataokban található) egy árvíz miatt mára kipusztult. A pénzes pér esetében a probléma még súlyosabb: mivel a faj nem vándorol fel a patakok felső folyására, hanem a hegyi folyók nyíltabb, tágasabb szakaszait kedveli, izolált populációk sem alakultak ki. Az őshonos populációk akadálytalanul keveredhettek a betelepítettekkel, így mára a helyi állományok kizárólag hibrid egyedekből állnak, amelyek kisebb-nagyobb arányban hordozzák az őshonos adriai populáció genotípusát.

A Tolmini Horgászegyesület felismerve ezt a problémát, akciótervet dolgozott ki a két faj genetikai tartalékainak megőrzésére. A márványpisztráng esetében tenyészállományokat hoztak létre a 7 megmaradt fajtisza populációból a halgazdaságukban. E mellett a populációk „másolatait” hozták létre ún. menedékpatakokban, ahova a fajtisza populációk szempontos ikráját helyezik ki mesterséges fészkekbe. Így új populációkat hoznak létre, amelyek később magukban rejtik az önálló genetikai fejlődés és a faj diverzifikációjának lehetőségét. A pénzes pér esetében a céljuk az, hogy molekuláris markerek segítségével felmérjék a populáció genetikai helyzetét és az őshonos adriai genotípus arányát. Ez után irányított szelekcióval – a magasabb arányban adriai genotípust hordozó egyedek felhasználásával – egy új tenyészállományt hoznak létre, amelynek utódait telepíthetik a helyi folyókba. Ebbe a munkába tudtunk mi bekapcsolódni az említett fajok spermájának mélyhűtésével.

A Sočában és vízrendszerében élő lazacfélék esetében a mélyhűtés egy viszonylag rövid időszak (1-2 hónap) áthidalására szolgál. A pénzes pér esetében a genetikai vizsgálatok hossza határozza meg azt az időszakot, amit a spermának mélyhűtött állapotban kell töltenie. A szaporodási időszakban vadon befogott egyedektől kinyert sperma folyamatosan, évente biztosítja a gének bevándorlását a tenyészállományba, ugyanakkor a markerekre alapozott szelekció növeli az eredeti adriai genotípus hányadát az állományban. Mivel ezt a munkát 2009 óta folyamatosan végezzük, mára elmondható, hogy az egyesület teljes pénzes pér tenyészállománya vadon élő egyedek mélyhűtött spermájából származik.

A márványpisztráng esetében az egyik legkisebb létszámú, ezért legsérülékenyebb fajtisza állomány, a Huda Grapa-pataokban található populáció hím egyedeivel dolgozunk. Itt a spermamélyhűtés az ivási időszak előtti egy-két hónap áthidalására szolgál. Mivel az egyedeket elektromos halászgéppel kell befogni a pataokban, az ivási időszakban ez tönkretethetné magát az ivást: a párokat elüldöznék a fészkektől és a taposás a fészkeket is megsemmisíthetné. Ezért a hímektől még novemberben vesszük le a spermát, amikor már termelnek elegendő ivarterméket, de az ivást még nem kezdték meg. A később (december-januárban) felhasznált mélyhűtött sperma egy újabb generáció létrehozásában segít, amiből egy menedékpatak populációját alakítják ki a szlovén kollégák.

5.5 Jövőkép

A kidolgozott és a gyakorlati alkalmazásba átkerült módszerek egy hosszú és elmélyült kutatómunka eredményei. Az, hogy sor került valamilyen szintű gyakorlati alkalmazásukra, bizonyítja, hogy van létjogosultságuk és van igény a fejlesztésükre. Azt is látnunk kell azonban, hogy a halak spermamélyhűtésének megvannak a saját korlátai. Nem várható, hogy a haltenyésztésben a sperma mélyhűtése ugyanolyan sikeres üzletággá válik, mint a szarvasmarha-tenyésztésben. A szarvasmarha-tenyésztésben a spermamélyhűtés pontosan akkor érkezett a tenyésztők segítségére, amikor arra a legnagyobb szükség volt. Az 1950-es években már akkora szelekciós nyomás volt – elsősorban a tejelőmarha-ágazatban – a bikákon, ami jelentősen felértékelte az egyedeket és lehetővé tette az örökítőanyagukkal végzett kereskedelmet. Az egyes nagy tenyészértékű bikák spermájának is önálló értéke lett, a mélyhűtés pedig lehetővé tette, hogy akár kontinensek között is kereskedhessenek vele. A tenyésztett halfajokban a hím tenyészegyekre nem nehezedik ilyen szelekciós nyomás, az egyes egyedeknek nincs önálló tenyészértékük. Ezen kívül a halszaporításban a sperma ritkán korlátozó tényező – a legtöbb esetben szaporításkor az ikra kinyerése okoz gondot, nem a spermáé. Ez alól természetesen léteznek kivételek, azonban ezek ritkák és nem a legfontosabb tenyésztett halfajokban fordulnak elő.

A haltenyésztésben a spermamélyhűtés üzemi alkalmazása a lazacfélék szaporításában terjedt el leginkább. Több lazactenyésztéssel foglalkozó norvég és izlandi cég állt át a

mélyhűtött sperma használatára a keltetőházi gyakorlatban, mivel csak így biztosítható a termékenyítés biztonsága (I. Babiak, Nord Egyetem, Norvégia; R. Estevez, Stofnfiskur, Izland, szóbeli közlés). A mesterséges szaporítást és inszeminálást kiszolgáló nemzetközi cégek között már van olyan, amelyik a pisztráng- és lazacsperma mélyhűtésére is kínál szabványosított hígítókat és komplett hűtőmédiúkat. Így megállapítható, hogy a sperma mélyhűtése fokozatosan teret nyer az olyan halgazdasági ágazatokban, ahol a piac folyamatos kiszolgálása nélkülözhetetlenné teszi az iparszerű tenyésztési rendszereket – és a lazactenyésztés kétségkívül ilyen ágazat.

A haltenyésztés többi ágában azonban a spermamélyhűtés elterjedése nem várható a közeljövőben, kivéve az olyan eseteket, amelyeket a dolgozatomban is ismertettem. Ezek a határterületek azonban egyedi alapon jelentkeznek és nem jelentenek üzleti jellegű alkalmazást. A dolgozatban említett példák (különösen a szlovén együttműködésben végzett munka) a génbanki munkának pontosan azokat a hiányosságait küszöbölik ki, amelyeket a 2.3 szakaszban ismertettem.

A halak esetében azonban nem csak a sperma mélyhűtése teszi lehetővé a genetikai tartalékok megőrzését. Az elmúlt évtized kutatási eredményei bizonyították, hogy a halak esetében az ősvarsejtek izolálhatók, majd átültethetők recipiens egyedekbe, amelyek mintegy dajkaként a donor ivarsejtjeit fogják termelni (Okutsu et al., 2007, Yoshizaki et al., 2011). Ez a technológia valóban új lehetőségeket biztosít a génbanki munkában. A donor egyedekből nem csak a primordiális ivarsejtek, hanem a spermatogóniumok, illetve oogóniumok is átültethetők a recipiens ivarmirigyébe, ahol azok sikeresen megtapadnak és proliferálódnak. Ennek megfelelően mind frissen kelt ivadékok, mind felnőtt egyedek használhatók donorként. A recipiens egyedek saját ivarsejt-termelése különböző módszerekkel gátolható, pl. triploidizációval vagy antiszensz oligonukleotidok (morpholinók) használatával. A képződő ivarsejtek típusát (spermium vagy ikra) a recipiens ivara határozza meg. Recipiensként használhatók fajazonos egyedek, illetve közeli rokon fajok egyedei is. A donor ivarsejtjei, illetve ivarmirigyei mélyhűthetők, ahogy azt saját kísérleteink is bizonyítják (Lujic et al., 2017). Az androgenezissel szemben, az ivarsejtekben található mitokondriumok kizárólag a donortól származnak, így nem fordulhat elő, hogy a mitokondriális DNS-t tekintve az utódok hibridek lesznek.

Génbanki használat szempontjából a technológia új lehetőségeket nyújt. Az izolált ivarsejtek vagy ivari szövetek mélyhűtésével lehetővé válik a génbankokban a mélyhűtött sperma kiváltása. Mivel az ősvarsejtek diploidok és mindkét végső ivarsejt-típussá differenciálódhatnak a recipiens ivaratól függően, nincs szükség sem a sperma, sem az ikra vagy embriók – mindmáig megoldatlan – mélyhűtésére. Elviekben ez a technológia valóban lehetővé teszi egy faj helyreállítását egyetlen hím egyed spermatogóniumainak felhasználásával. Korábban erre csak a genommanipulációs eljárások, nevezetesen az androgenezis nyújtottak lehetőséget, azonban ennek hátrányait (alacsony hatékonyság, mitokondriális hibridizáció) már korábban tárgyaltam. A recipiensbe beültetett ősvarsejtek saját mitokondriumokkal rendelkeznek és azokat adják tovább a belőlük kifejlődő ivarsejteknek, így a hibridizáció nem történik meg. Tény, hogy a beültetés jóval bonyolultabb eljárás, mint a sperma mélyhűtése és felhasználása egy rutin keltetőházi szaporítás során, azonban a génbanki munka alapvetően tudományos és nem rutinszerű tevékenység. Reményeim szerint tehát az ivari szövetek mélyhűtésének, az ivarsejtek izolációjának és átültetésének komoly szerepe lehet a jövő génbankjaiban.

6. Új tudományos eredmények

1. Kísérletesen bizonyítottam, hogy a tokalakúak és lazacfélék spermájának mélyhűtésekor a metanol védőanyag használata általánosságban kedvezőbb felolvasztás utáni motilitást, termékenyülést és kelést eredményez, mint a dimetil-szulfoxid védőanyag alkalmazása. Bizonyítottam továbbá, hogy a tokalakúak esetében ez a különbség a hűtőmedium párányomás-ozmométerrel mért ozmolalitásával áll összefüggésben.

2. A lapátorru tok és a ponty spermájának mélyhűtésére sikerrel alkalmaztam az 5 ml-es műszalmákat, amivel lehetővé válik az adott fajok szaporításakor a spermamélyhűtés üzemi méretű alkalmazása.

3. A pontysperma mélyhűtésekor bizonyítottam, hogy az embrionális és ivadékkori torzulások százalékos aránya általánosságban nem emelkedik a mélyhűtött sperma használatakor, ugyanakkor a torz ivadékok között haploid egyedek is előfordultak.

4. A lazacfélék spermájának mélyhűtésekor kísérletesen bizonyítottam, hogy a felolvasztott sperma legalább 10 percig – sebes pisztráng és pénzes pér esetében 60 percig – tárolható a termékenyülési és kelési eredmények csökkenése nélkül.

5. A pénzes pér mélyhűtött spermájával végzett termékenyítéskor meghatároztam, hogy a termékenyülési és kelési eredmények csökkenése nélkül biztonságosan használható sperma-ikra arány $5 \times 10^4 : 1$.

6. A kialakított módszertant sikerrel alkalmaztam Magyarországon a ponty, Szlovéniában pedig a márványpisztráng és az adriai pénzes pér fajokban végzett génbanki munkában.

7. Irodalomjegyzék

Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K., Rodina, M., 2008. Fish Spermatology: Implications for Aquaculture Management. in: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafee, G. (Eds.), Fish Spermatology. Alpha Science, Oxford, UK, pp. 379–460.

Alavi, S.M.H., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2012a. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (I) testicular development, sperm maturation and seminal plasma characteristics. Rev. Fish Biol. Fish.

Alavi, S.M.H., Hatef, A., Pšenička, M., Kašpar, V., Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Cosson, J., Bondarenko, V., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2012b. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. Rev. Fish Biol. Fish. 22, 861–886.

Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1992. Evidence for Increased Lipid Peroxidative Damage and Loss of Superoxide Dismutase Activity as a Mode of Sublethal Cryodamage to Human Sperm During Cryopreservation. J. Androl. 13, 232–241.

Amann, R.P., Hammerstedt, R.H., 1980. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. Biol. Reprod. 23, 647–656.

Amann, R.P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology 81, 5–17.

Asturiano, J.F., Pérez, L., Marco-Jiménez, F., Olivares, L., Vicente, J.S., Jover, M., 2003. Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. Fish Physiol. Biochem. 28, 501–502.

Asturiano, J.F., Marco-Jiménez, F., Pérez, L., Balasch, S., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P., Jover, M., 2006. Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. Theriogenology 66, 1012–1020.

Asturiano, J.F., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D.S., Garzón, D.L., Pérez, L., Vicente, J.S., Jover, M., 2007. Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. Reprod. Domest. Anim. 42, 162–166.

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.

Babiak, I., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H., Brzuzan, P., Ciesielski, S., 2002. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. Theriogenology 57, 1229–1249.

Baccetti, B., Burrini, A.G., Gibertini, G., Mazzini, M., Zerunian, S., 1984. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven Cyprinid species. Gamete Res. 10, 373–396.

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

- Bercsényi, M., Magyary, I., Urbányi, B., Orbán, L., Horváth, L., 1998. Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. *Genome* 41, 573–579.
- Billard, R., 1977. Utilisation d'un système tris-glycocolle pour tamponner le dilueur d'insémination pour truite. *Bull. Français Piscic.* 264, 102–112.
- Billard, R., 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture* 14, 187–198.
- Billard, R., 1983. Ultrastructure of trout spermatozoa: Changes after dilution and deep-freezing. *Cell Tissue Res.* 228, 205–218.
- Billard, R., Cosson, M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.* 261, 122–131.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquat. Living Resour.* 6, 67–75.
- Blaxter, J.H.S., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172, 1189–1190.
- Blom, E., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.* 1, 176–177.
- Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, L., Horváth, Á., 2010. Commercial-scale cryopreservation of wels catfish (*Silurus glanis*) semen. *Aquac. Res.* 41, 1549–1551.
- Bokor, Z., Ittész, I., Mosonyi, G., Kotrik, L., Müller, T., Urbányi, B., Horváth, Á., 2015. Survival and growth rates of wels catfish (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758) larvae originating from fertilization with cryopreserved or fresh sperm. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 164–168.
- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Stejskal, V., Linhart, O., 2009. Dynamics of ATP and movement of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) sperm in conditions of decreasing osmolality. *Theriogenology* 72, 851–859.
- Boryshpolets, S., Sochorová, D., Rodina, M., Linhart, O., Dzyuba, B., 2017. Cryopreservation of Carp (*Cyprinus carpio* L.) Sperm: Impact of Seeding and Freezing Rates on Post-Thaw Outputs. *Biopreserv. Biobank.* 15, 234–240.
- Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K.J., Herráez, M.P., 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 37, 245–253.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., Herráez, M.P., 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 201, 301–314.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Herráez, M.P., 2005a. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50, 144–153.
- Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J.C., Sarasquete, C., Herráez, M.P., 2005b. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* 50, 273–284.
- Cabrita, E., Ma, S., Diogo, P., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 2011. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 189–195.
- Carnevale, E.M., 2006. Vitrification of Equine Embryos. *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* 11, 608–614.
- Cassou, R., Cassou, M., Cassou, B., 1993. Tube known as straw, for cryogenically preserving biological samples. US Patent Number 5,190,880.
- Chao, N.-H., Chao, W.-C., Liu, K.-C., Liao, I.-C., 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.* 30, 107–118.

Christ, S.A., Toth, G.P., McCarthy, H.W., Torsella, J.A., Smith, M.K., 1996. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Fish Biol.* 48, 1210–1222.

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

Ciereszko, A., Dabrowski, K., 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109, 367–373.

Ciereszko, A., Dabrowski, K., Froschauer, J., Wolfe, T.D., 2006. Cryopreservation of Semen from Lake Sturgeon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 135, 232–240.

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

Cloud, J.G., Miller, W.H., Levanduski, M.J., 1990. Cryopreservation of Sperm as a Means to Store Salmonid Germ Plasm and to Transfer Genes from Wild Fish to Hatchery Populations. *Progress. Fish-Culturist* 52, 51–53.

Conget, P., Fernández, M., Herrera, G., Minguell, J.J., 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture* 143, 319–329.

Cosson, J., Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., Rodina, M., 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J. Fish Biol.* 56, 1348–1367.

Crivelli, A., Poizat, G., Berrebi, P., Jesensek, D., Rubin, J.-F., others, 2000. Conservation biology applied to fish: the example of a project for rehabilitating the marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Cybio* 24, 211–230.

Cuevas-Urbe, R., Leibo, S.P., Daly, J., Tiersch, T.R., 2011a. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology* 63, 186–197.

Cuevas-Urbe, R., Yang, H., Daly, J., Savage, M.G., Walter, R.B., Tiersch, T.R., 2011b. Production of F₁ offspring with vitrified sperm from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus hellerii*. *Zebrafish* 8, 167–79.

Cuevas-Urbe, R., Chesney, E.J., Daly, J., Tiersch, T.R., 2015. Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquac. Res.* 46, 1770–1784.

Denniston, R.S., Michelet, S., Bondioli, K.R., Godke, R.A., 2011. Principles of Embryo Cryopreservation, in: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 274–290.

Drokin, S., Stein, H., Bartscherer, H., 1998. Effect of Cryopreservation on the Fine Structure of Spermatozoa of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*). *Cryobiology* 37, 263–270.

Dunham, R.A., 2004. Gynogenesis, androgenesis, cloned populations and nuclear transplantation. *Aquac. Fish. Biotechnol. Genet. approaches*. pp. 54–64.

Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T., 1984. Vitrification as an Approach to Cryopreservation. *Cryobiology* 21, 126–407.

Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., 1999. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *J. Fish Biol.* 54, 356–369.

Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J., 2010. Evaluation of fish sperm quality. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 636–643.

Figuerola, E., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Merino, O., Isachenko, V., Valdebenito, I., 2013. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 372–375, 119–126.

Figuerola, E., Merino, O., Risopatrón, J., Isachenko, V., Sánchez, R., Effer, B., Isachenko, E., Farias, J.G., Valdebenito, I., 2015. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83, 238–245.

Flajšhans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biol. Int.* 28, 955–959.

Fraser, D.J., 2008. How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. *Evol. Appl.* 1, 535–586.

Fumagalli, L., Snoj, a., Jesenšek, 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. *Mol. Ecol.* 11, 2711–2716.

Gallis, J.L., Fedrigo, E., Jatteau, P., Bonpunt, E., Billard, R., 1991. Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility, in: Williot, P. (Ed.), *Acipenser*. Cemagref, Bordeaux, pp. 143–151.

Ginsburg, A.S., 1963. Sperm-egg Association and its Relationship to the Activation of the Egg in Salmonid Fishes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11, 13–33.

Glenn III, D.W., Lang, R.P., Tiersch, T.R., 2011. Evaluation of Extenders for Refrigerated Storage of Koi Carp and Goldfish Sperm, in: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 107–124.

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

Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V., Tsvetkova, L.I., Barmintsev, V.A., 2006. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. *Int. J. Refrig.* 29, 379–386.

Gwo, J.-C., 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (Teleost, Perciformes, Sparidae). *Theriogenology* 41, 989–1004.

Gwo, J.-C., Lin, X.-W., Gwo, H.-H., Wu, H.-C., Lin, P.-W., 1996. The ultrastructure of Formosan landlocked salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, spermatozoon (Teleostei, Salmoniformes, Salmonidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 28, 33–40.

Harvey, B., 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture* 32, 313–320.

Harvey, B., Kelley, R.N., Ashwood-Smith, M.J., 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *Can. J. Zool.* 60, 1867–1870.

Havelka, M., Šachlová, H., Shaliutina-Kolešová, A., Rodina, M., 2016. Fertilization success of sterlet *Acipenser ruthenus* and Siberian sturgeon *Acipenser baerii* gametes under conditions of heterospecific mating. *Anim. Reprod. Sci.* 174, 107–113.

Hirsh, A.G., Williams, R.J., Meryman, H.T., 1985. A Novel Method of Natural Cryoprotection. *Plant Physiol.* 79, 41–56.

Horokhovatskyi, Y., Rodina, M., Asyabar, H.D., Boryshpolets, S., 2017. Consequences of uncontrolled cooling during sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm cryopreservation on post-thaw motility and fertilizing ability. *Theriogenology* 95, 89–95.

Horváth, Á., Urbányi, B., 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquac. Res.* 31, 317–324.

Horváth, Á., Miskolczi, E., Urbányi, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat. Living Resour.* 16, 457–460.

- Horváth, Á., Wayman, W.R., Urbányi, B., Ware, K.M., Dean, J.C., Tiersch, T.R., 2005. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture* 247, 243–251.
- Horváth, L., Orbán, L., 1995. Genome and gene manipulation in the common carp. *Aquaculture* 129, 157–181.
- Ingermann, R.L., 2008. Energy Metabolism and Respiration in Fish Spermatozoa, in: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.), *Fish Spermatology*. Alpha Science, Oxford, UK, pp. 241–279.
- Jähnichen, H., Warnecke, D., Trölsch, E., Kohlmann, K., Bergler, H., Pluta, H.J., 1999. Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 204–206.
- Jin, B., Kleinhans, F.W., Mazur, P., 2014. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology* 68, 419–430.
- Kása, E., Bernáth, G., Kollár, T., Zarski, D., Lujić, J., Marinović, Z., Bokor, Z., Hegyi, Á., Urbányi, B., Vélchez, M.C., Morini, M., Peñaranda, D.S., Pérez Igualada, L., Asturiano Nemesio, J.F., Horváth, Á., 2017. Development of sperm vitrification protocols for freshwater fish (Eurasian perch, *Perca fluviatilis*) and marine fish (European eel, *Anguilla anguilla*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 245, 102–107.
- Kášpar, V., Hulak, M., Kohlmann, K., Vandeputte, M., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2008. In vitro study on sperm competition in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cybium* 32, 303–306.
- Komen, H., Thorgaard, G.H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* 269, 150–173.
- Krasznai, Z., Márián, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Trón, L., Morisawa, M., 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *PNAS* 97, 2052–2057.
- Krause, W., Schönhärl, G., Brake, A., 1993. The variability of measuring sperm concentration and motility as determined by computer assisted image analysis and visual estimation. *Andrologia* 25, 181–187.
- Kubota, Y., Shimada, A., Shima, A., 1995. DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 330–334.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37, 267–273.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., Kato, O., 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod. Biomed. Online* 11, 608–614.
- Lahnsteiner, F., 2011a. Cryopreservation Protocols for Sperm of Salmonid Fishes, in: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 409–420.
- Lahnsteiner, F., 2011b. Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions. *Aquaculture* 314, 221–224.
- Lahnsteiner, F., Kletzl, M., 2012. The effect of Water Temperature on Gamete Maturation and Gamete Quality in the European Grayling (*Thymallus thymallus*) Based on Experimental Data and on Data from Wild Populations. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 455–467.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R.A., Weismann, T., 1991. Fine structure of spermatozoa of the grayling (*Thymallus thymallus*, Pisces, Teleostei). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23, 373–377.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R., 1996a. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 144, 265–274.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R., 1996b. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *J. Appl. Ichthyol.* 12, 99–106.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquac. Res.* 28, 471–479.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., Weismann, T., 2005. Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquat. Toxicol.* 75, 213–224.

Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., Yoshizaki, G., 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1640–1645.

Legendre, M., Billard, R., 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod. Nutr. Dev.* 20, 1859–1868.

Legendre, M., Linhart, O., Billard, R., 1996. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquat. Living Resour.* 9, 59–80.

Leibo, S.P., McGrath, J.J., Cravalho, E.G., 1978. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* 15, 257–271.

Linhart, O., Rodina, M., Cosson, J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41, 241–250.

Liu, J., Shi, C., Wen, J., Pyne, D., Liu, H., Ru, C., Sun, Y., 2015. Automated robotic vitrification of embryos. *Robot. Autom. (ICRA)*, 2015 IEEE Int. Conf. 2685–2690.

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G., Casper, R.F., 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13, 896–900.

Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F., Feigin, P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks – strategies in research and application. *Aquaculture* 155, 13–30.

Lujić, J., Marinović, Z., Sušnik Bajec, S., Djurdjević, I., Kása, E., Urbányi, B., Horváth, Á., 2017. First successful vitrification of salmonid ovarian tissue. *Cryobiology* 76, 154–157.

Magyary, I., Urbányi, B., Horváth, L., 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm I. The importance of oxygen supply. *J. Appl. Ichthyol.* 12, 113–115.

Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F., Oliveira, A. V., 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260, 298–306.

Martínez-Páramo, S., Pérez-Cerezales, S., Gómez-Romano, F., Blanco, G., Sánchez, J.A., Herráez, M.P., 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 71, 594–604.

Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R., Cabrita, E., 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture* 472, 156–177.

Mattei, X., 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Can. J. Zool.* 69, 3038–3055.

May, B., Henley, K.J., Krueger, C.C., Gloss, S.P., 1988. Androgenesis as a mechanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 75, 57–70.

- Mazur, P., 1963. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J. Gen. Physiol.* 47, 347–369.
- Mazur, P., 1970. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. *Science*. 168, 939–949.
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, C125–C142.
- Mazur, P., 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.* 17, 53–92.
- Mazur, P., Seki, S., 2011. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed at 610° to $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology* 62, 1–7.
- McNiven, M.A., Gallant, R.K., Richardson, G.F., 1993. Dimethyl-acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. *Theriogenology* 40, 943–948.
- Mims, S.D., Tsvetkova, L.I., Wayman, W.R., Horváth, Á., Urbányi, B., Gomelsky, B., 2011. Cryopreservation of Sturgeon and Paddlefish Sperm, in: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 366–380.
- Miskolczi, E., Mihálffy, S., Várkonyi, E.P., Urbányi, B., Horváth, Á., 2005. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 247, 119–125.
- Morisawa, M., 2008. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 362–370.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Morisawa, S., 1983a. Effects of Potassium and Osmolality on Spermatozoan Motility of Salmonid Fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 105–113.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983b. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 95–103.
- Morris, J.P., Berghmans, S., Zahrieh, D., Neuberger, D.S., Kanki, J.P., Look, A.T., 2003. Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide. *Biotechniques* 35, 956–968.
- Mounib, M.S., 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 53, 13–18.
- Mounib, M.S., Hwang, P.C., Idler, D.R., 1968. Cryogenic Preservation of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Sperm. *J. Fish. Res. Board Canada* 25, 2623–2632.
- Muhlfeld, C.C., Kalinowski, S.T., McMahon, T.E., Taper, M.L., Painter, S., Leary, R.F., Allendorf, F.W., 2009. Hybridization rapidly reduces fitness of a native trout in the wild. *Biol. Lett.* 5, 328–331.
- Nynca, J., Dietrich, G.J., Dobosz, S., Zalewski, T., Ciereszko, a, 2014. Effect of postthaw storage time and sperm-to-egg ratio on fertility of cryopreserved brook trout sperm. *Theriogenology* 83, 253–256.
- Nynca, J., Dietrich, G.J., Grudniewska, J., Dobosz, S., Liszewska, E., Krzyś, M., Różyński, R., Ciereszko, A., 2015. Efficient method for cryopreservation of European huchen (*Hucho hucho* L.) and grayling (*Thymallus thymallus* L.) semen. *Aquaculture* 435, 146–151.
- Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Maisse, G., 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 34, 141–149.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2007. Production of Trout Offspring from Triploid Salmon Parents. *Science* 317, 1517.
- O'Reilly, P., Doyle, R., 2007. Live Gene Banking of Endangered Populations of Atlantic Salmon, in: *The Atlantic Salmon*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 425–469.

- Orfão, L.H., Nascimento, A.F., Corrêa, F.M., Cosson, J., Viveiros, A.T.M., 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture* 311, 241–247.
- Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F., Billard, R., 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *J. Cell Sci.* 108, 747–753.
- Pickett, B.W., Berndtson, W.E., 1974. Preservation of Bovine Spermatozoa by Freezing in Straws: A Review. *J. Dairy Sci.* 57, 1287–1301.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Castro, J., Martínez, P., 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture* 238, 403–419.
- Piros, B., Glogowski, J., Kolman, R., Rzemieniecki, A., Domagała, J., Horváth, Á., Urbanyi, B., Ciereszko, A., 2002. Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and sterlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 289–295. doi:10.1023/A:10262802
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
- Pšenička, M., Rodina, M., Nebesarova, J., Linhart, O., 2006. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. *Theriogenology* 66, 1355–1363.
- Pšenička, M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Nynca, J., Rodina, M., Linhart, O., Cosson, J., Ciereszko, A., 2008. Acrosome staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO. *Cryobiology* 56, 251–253.
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 147–154.
- Ráb, P., Pokorný, J., Roth, P., 1989. Chromosome studies of the common carp, *Cyprinus carpio*. I. Karyotype of Amurian carp, *C. carpio haematopterus*. *Caryologia* 42, 27–36.
- Riesco, M.F., Raposo, C., Engrola, S., Martínez-Páramo, S., Mira, S., Cunha, M.E., Cabrita, E., 2017. Improvement of the cryopreservation protocols for the dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture* 470, 207–213.
- Sarvi, K., Niksirat, H., Amiri, B.M., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G., Bakhtiyari, M., 2006. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture* 256, 564–569.
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., Allendorf, F.W., 1991. Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. *J. Exp. Zool.* 260, 382–390.
- Schuster, T.G., Keller, L.M., Dunn, R.L., Ohl, D.A., Smith, G.D., 2003. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Hum. Reprod.* 18, 788–795.
- Scott, A.P., Baynes, S.M., 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17, 707–739.
- Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C., Tiersch, T.R., 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology* 53, 1489–1499.
- Seki, S., Jin, B., Mazur, P., 2014. Extreme rapid warming yields high functional survivals of vitrified 8-cell mouse embryos even when suspended in a half-strength vitrification solution and cooled at moderate rates to -196°C. *Cryobiology* 68, 71–78.
- Stein, H., Bayle, H., 1978. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 1073–1076.
- Stewart, D.L., 1951. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet. Rec.* 63, 65–66.

- Steyn, G.J., 1993. The Effect of Freezing Rate on the Survival of Cryopreserved African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) Spermatozoa. *Cryobiology* 30, 581–590.
- Steyn, G.J., Van Vuren, J.H.J., 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture* 63, 187–193.
- Stoss, J., Holtz, W., 1981. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture* 22, 97–104.
- Stoss, J., Holtz, W., 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture* 32, 321–330.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac. Res.* 31, 231–243.
- Sušnik, S., Snoj, A., Dovč, P., 1999. Microsatellites in grayling (*Thymallus thymallus*): comparison of two geographically remote populations from the Danubian and Adriatic river basin in Slovenia. *Mol. Ecol.* 8, 1756–1758.
- 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.
- Thorgaard, G.H., 1983. 8 Chromosome Set Manipulation and Sex Control in Fish, in: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M.B.T.-F.P. (Eds.), *Reproduction*. Academic Press, pp. 405–434.
- Tiersch, T.R., Goudie, C.A., Carmichael, G.J., 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123, 580–586.
- Tiersch, T.R., Figiel Jr., C.R., Wayman, W.R., Williamson, J.H., Gorman, O.T., Carmichael, G.J., 2004. Cryopreservation of Sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow. *N. Am. J. Aquac.* 66, 8–14.
- Toth, G.P., Christ, S.A., McCarthy, H.W., Torsella, J.A., Smith, M.K., 1995. Computer-assisted motion analysis of sperm from the common carp. *J. Fish Biol.* 47, 986–1003.
- Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O., Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. *J. Appl. Ichthyol.* 12, 107–112.
- Urbányi, B., Horváth, A., Kovács, B., 2004. Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm. *Aquac. Int.* 12, 47–56.
- Van Der Walt, L.D., Van Der Bank, F.H., Steyn, G.J., 1993. The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for the conservation of genetic diversity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* 106, 313–318.
- Velasco-Santamaría, Y.M., Medina-Robles, V.M., Cruz-Casallas, P.E., 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture* 256, 264–271.
- Vincenzi, S., Crivelli, A.J., Jesenšek, D., De Leo, G.A., 2010. The management of small, isolated salmonid populations: do we have to fix it if it ain't broken? *Anim. Conserv.* 13, 21–23.
- Viveiros, A.T.M., Godinho, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 137–150.

Viveiros, A.T.M., Nascimento, A.F., Orfão, L.H., Isaú, Z.A., 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* 74, 551–556.

Viveiros, A.T.M., Isaú, Z.A., Caneppele, D., Leal, M.C., 2012. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology* 78, 803–810.

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

Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture* 93, 95–100.

Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P., 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 178, 411–414.

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

Wojtczak, M., Dietrich, G.J., Słowińska, M., Dobosz, S., Kuźmiński, H., Ciereszko, A., 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture* 270, 259–264.

Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., Wang, G., Zhang, Y., Huo, L., Zhao, Z., Cao, D., Lu, C., Li, C., Zhou, Y., Liu, Z., Fan, Z., Shan, G., Li, X., Wu, S., Song, L., Hou, G., Jiang, Y., Jeney, Z., Yu, D., Wang, L., Shao, C., Song, L., Sun, J., Ji, P., Wang, J., Li, Q., Xu, L., Sun, F., Feng, J., Wang, C., Wang, S., Wang, B., Li, Y., Zhu, Y., Xue, W., Zhao, L., Wang, J., Gu, Y., Lv, W., Wu, K., Xiao, J., Wu, J., Zhang, Z., Yu, J., Sun, X., 2014. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nat. Genet.* 46, 1212–1219.

Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., Takeuchi, Y., 2011. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 6, 55–61.

Young, W.P., Frenyea, K., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 2009. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 289, 13–18.

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S., 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47, 227–235.

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S., 2004. Adenosine Triphosphate Concentration and β -d-Glucuronidase Activity as Indicators of Sea Bass Semen Quality. *Biol. Reprod.* 70, 1679–1684.

Zohar, Y., 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquac.* 2, 43–48.

8. A dolgozat elkészítéséhez felhasznált saját közlemények jegyzéke

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

Horváth, Á., Urbányi, B., Mims, S.D., Bean, W.B., Gomelsky, B., Tiersch, T.R., 2006. Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. World Aquac. Soc.* 37, 356–362.

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

Horváth, Á., Wayman, W.R., Dean, J.C., Urbányi, B., Tiersch, T.R., Mims, S.D., Johnson, D., Jenkins, J.A., 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: A retrospective study. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 443–449.

Horváth, A., Urbányi, B., Wang, C., Onders, R.J., Mims, S.D., 2010. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 715–719.

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

Horváth, Á., Bokor, Z., Bernáth, G., Csenki, Z., Gorjan, A., Herráez, M.P., Urbányi, B., Jesenšek, D., 2015. Very low sperm–egg ratios result in successful fertilization using cryopreserved sperm in the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 435, 75–77.

Horváth, Á., Labbé, C., Jesenšek, D., Hoitsy, G., Bernáth, G., Kaczkó, D., Bokor, Z., Urbányi, B., 2015. Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 119–124.

9. Összefoglalás

A dolgozatomban génbanki célú spermamélyhűtési módszertan kialakítását mutatom be tokalakúakban, pontyban és lazacfélékben, illetve kitérek a kidolgozott módszerek gyakorlati alkalmazására is. Az értekezésben a 2003–2014 közötti időszak kutatómunkáját mutatom be.

A tokalakúak közül a rövidorrú tokban (*Acipenser brevirostrum*), sápadt tokban (*Scaphirhynchus albus*) és lapátorrú tokban (*Polyodon spathula*) vizsgáltam különböző hígítók és védőanyagok (illetve ezek koncentrációi) hatását a mélyhűtött sperma felolvasztás utáni motilitására, termékenyítő képességére és életképességére. A rövidorrú tok spermája igen érzékeny volt a mélyhűtésre, a kapott felolvasztás utáni motilitás értékek nem haladták meg a $26 \pm 13\%$ -ot, míg a termékenyülési eredmények a $40 \pm 15\%$ -ot (4–8 sejtes állapotban), illetve a $31 \pm 15\%$ -ot (keléskor). A másik két faj spermája nem mutatott ilyen érzékenységet. Általánosságban elmondható, hogy mindhárom fajban a módosított Tsvetkova-féle hígító és metanol védőanyag kombinációja (5 vagy 10%-os koncentrációban) eredményezte a legmagasabb termékenyülést, még akkor is ha a felolvasztás utáni motilitás egyes esetekben magasabb volt a dimetil-szulfoxid (DMSO) védőanyag használatakor. A felolvasztott rövidorrútok-sperma termékenyítő képességében megfigyelt különbségek összefüggésben álltak a hígítóból és védőanyagból álló hűtőmedium párányomás-ozmométerrel mért ozmolalitásával: a hiperozmotikus körülmények jelentősen csökkentették a termékenyítés sikerét. Megállapítottam, hogy a sperma életképessége csak korlátozottan használható a sperma termékenyítő képességének becslésére. Végül lapátorrú tokban sikeresen vizsgáltam az 5 ml-es műszalmák alkalmazhatóságát a sperma mélyhűtésére.

A ponty fajban (*Cyprinus carpio*) szintén a hagyományos 0,5 ml-es műszalmáknál nagyobb térfogatú 1,2 ml-es és 5 ml-es műszalmák alkalmazhatóságát vizsgáltam különböző hűtési idők mellett. A kísérletek során megállapítottam, hogy mindkét műszalma-típussal a kontrollhoz képest szignifikánsan gyengébb termékenyülést lehet elérni. A legmagasabb termékenyülést mélyhűtött spermával 1,2 ml-es műszalma és 4 perc hűtési idő használatával értem el ($69 \pm 16\%$), míg az 5 ml-es műszalma esetében az 5 perc hűtési idővel ($39 \pm 27\%$). A különböző műszalma-típusok és sperma-ikra arányok hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy az 1,2 ml-es műszalmák esetében az alkalmazott sperma-ikra arálynak nem volt szignifikáns hatása a kapott eredményekre, míg a 4 ml-es műszalmák esetében az $1,775 \times 10^6 : 1$ és a $8,875 \times 10^5 : 1$ arányok eredményezték a legmagasabb termékenyülést. Torz fejlődésű ivadékok az 5 ml-es műszalmával termékenyített $5,917 \times 10^5 : 1$ sperma-ikra arányú csoport kivételével minden kísérleti csoportban találtunk, azonban a legtöbbet a kontroll csoportban. A torz ivadék citogenetikai vizsgálata során megállapítottuk, hogy a mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek többségében kis százalékban haploid egyedek jelentek meg. A haploid egyedek kialakulásához valószínűleg az vezetett, hogy a termékenyítő spermium genomja a fagyasztás vagy felolvasztás során sérülhetett, így a termékenyítés során csak mechanikai szerepet játszott – azaz elindította a zigóta osztódását –, azonban annak genomjához nem járult hozzá. A megfigyeléstől függetlenül a haploid embriók olyan alacsony arányban jelentek meg, ami nem veszélyezteti a mélyhűtött sperma gyakorlati használatát.

A lazacfélék közül a sebes pisztrángban (*Salmo trutta m. fario*), márványpisztrángban (*Salmo marmoratus*), szivárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss*) és a pénzes pérben

(*Thymallus thymallus*) vizsgáltam a felolvasztás utáni tárolás idejének hatását a mélyhűtött sperma motilitására és termékenyítő képességére. A kapott eredmények alapján sikerült megcáfolni azt a korábban általánosan elfogadott nézetet, hogy a mélyhűtött spermát a felolvasztás után azonnal fel kell használni, ellenkező esetben már akár 30 másodperc tárolást követően is romlik a termékenyítő képessége. A márványpisztrángban és szivárványos pisztrángban 10 perc, míg a sebes pisztrángban és a pénzes pérben 60 perc felolvasztás utáni tárolás sem eredményezte a termékenyülés (és kelés) jelentős csökkenését. Pénzes pérben vizsgáltam a sperma-ikra arány hatását a mélyhűtött sperma termékenyítő képességére. Megállapítottam, hogy már 50 000 : 1 sperma-ikra arány elegendő a friss spermával megegyező termékenyüléshez, de még 1000 : 1 sperma-ikra arány is $5 \pm 3\%$ termékenyülést, illetve $4 \pm 2\%$ kelést eredményezett.

A kidolgozott módszereket a gyakorlati halgazdálkodásban is alkalmaztam. A 2005-2007 közti időszakban részt vettem a NAIK Halászati Kutatóintézete (HAKI) mélyhűtött ponty génbankjának kialakításában. A munka során 17 hazai fajta 130 egyedétől, illetve 8 külföldi fajta 57 egyedétől hűtöttünk mintákat, amelyekből 2013 során a HAKI munkatársai fel is használtak az egyik fajta tenyészállományának fejlesztésére. A lazafélékben kifejlesztett módszertant a szlovéniai Tolmini Horgászegyesület munkatársaival közösen használtuk fel a márványpisztráng és a pénzes pér helyi állományainak fejlesztésére. Az egyesület a márványpisztráng esetében az egyik veszélyeztetett fajtiszta populáció megőrzésére használja a mélyhűtést, míg a pénzes pér esetében pedig a genetikailag ellenőrzött tenyészállomány létrehozására.

10. Summary

This dissertation presents the development of sperm cryopreservation methodologies in Acipenseriform fish, the common carp and in salmonids with the purpose of application in gene banking. The research work covered in the dissertation has been carried out between 2003 and 2014.

Concerning Acipenseriform fish, the effects of various extenders and cryoprotectants on the post-thaw motility, fertilizing capacity and viability of cryopreserved sperm was investigated in the shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*), the pallid sturgeon (*Scaphirhynchus albus*) and in the American paddlefish (*Polyodon spathula*). Sperm of shortnose sturgeon was found to be very sensitive to cryopreservation, the resulting post-thaw motility values did not exceed $26 \pm 13\%$ while fertilization results were as low as $40 \pm 15\%$ (at 4-8-blastomere stage) or $31 \pm 15\%$ (hatch). The sperm of the other two species was less sensitive. Generally, highest fertilization results were observed in all three species with the combination of modified Tsvetkova's extender and the cryoprotectant methanol (at a concentration of 5 or 10%) although post-thaw motility was in some cases higher when the cryoprotectant dimethyl-sulfoxide (DMSO) was used. Differences observed in the fertilizing capacity of thawed shortnose sturgeon sperm were related to the osmolality (measured with a vapor pressure osmometer) of the cryomedium composed of the extender and the cryoprotectant: hyperosmotic conditions drastically reduced fertilization success. Viability of sperm can only be used to estimate the fertilizing capacity of sperm to a limited extent. Finally, the applicability of 5-ml straws to the cryopreservation of paddlefish sperm was successfully tested.

In the common carp (*Cyprinus carpio*) the applicability of the larger 1.2-ml and 5-ml straws (rather than the traditional 0.5-ml straws) was investigated at various cooling times. The use of both straw types resulted in significantly lower fertilization than the control. The highest fertilization percentage with 1.2-ml straws was observed at 4 minutes cooling time ($69 \pm 16\%$) while with 5-ml straws at 5 minutes ($39 \pm 27\%$). Investigation of various straw volumes and sperm-egg ratios revealed that sperm-egg ratios did not have a significant effect on fertilization in case of 1.2-ml straws while for 5-ml straws sperm-egg ratios of $1.775 \times 10^6 : 1$ and $8.875 \times 10^5 : 1$ yielded the highest fertilization results. Larval deformities were found in all experimental groups except for that fertilized with the contents of one 5-ml straw at a sperm-egg ratio of $5.917 \times 10^5 : 1$. On the other hand, the highest percentage of deformed larvae was observed in the control fertilized with fresh sperm. Cytogenetic analysis of deformed larvae revealed that haploid larvae have been found in the majority of groups fertilized with cryopreserved sperm, albeit at a very low rate. A probable explanation for the occurrence of haploids is that the genome of the fertilizing spermatozoon was damaged during the process of freezing and thawing, thus it only played a mechanical role – it was able to initiate the fertilization process, however, did not contribute a genome to the developing embryo. Regardless of the observation, haploid embryos occurred only at a very low ratio which does not compromise the use of sperm cryopreservation in aquaculture practice.

The effect of post-thaw storage on the post-thaw motility and fertilizing capacity of cryopreserved sperm was investigated in salmonids including the brown trout (*Salmo trutta m.*

fario), the marble trout (*Salmo marmoratus*), the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as well as the grayling (*Thymallus thymallus*). Based on the results, we were able to rebut the previously accepted view that cryopreserved sperm has to be used for fertilization immediately following thawing, otherwise it will lose its fertilizing capacity within 30 seconds. No significant reduction of fertilization and hatch results was observed after 10 minutes of post-thaw storage in the marble trout and the rainbow trout and after 60 minutes in the brown trout and the grayling. The effect of sperm-egg ratios on the fertilizing capacity of cryopreserved sperm was investigated in the grayling. We have found that a sperm-egg ratio of 50,000 : 1 was sufficient to attain fertilization percentages similar to the control and even sperm-egg ratios as low as 1000 : 1 resulted in $5 \pm 3\%$ eyed eggs and $4 \pm 2\%$ hatched larvae.

The developed methods were applied to aquaculture practice. I have participated in the development of the cryopreserved common carp gene bank of the Research Institute for Fisheries and Aquaculture (HAKI) of the NARIC in the period between 2005-2007. Sperm samples from 130 individuals of 17 Hungarian carp varieties and 57 individuals of 8 foreign varieties were cryopreserved. Samples in this gene bank were used in 2013 for the development of the broodstock of one of these varieties. The methodology developed in salmonids was used in collaboration with the Angling club of Tolmin, in Slovenia for the conservation of local populations of the marble trout and the grayling. The Angling club used cryopreservation for the conservation of an endangered pure population of the marble trout while in case of the grayling the objective is to develop a genetically controlled broodstock of the species.

11. Köszönetnyilvánítás

Egy tudományos karrier soha nem egy ember kizárólag saját teljesítménye. A jelen dolgozat sem kivétel ez alól, az abban foglalt kísérletes munka végzése során számtalan kollégának, barátoknak és támogató szervezetnek tartozok köszönettel.

A munkámat támogató szervezetek közül köszönettel tartozom az Európai Uniónak a COST Action FA1205 AQUAGAMETE pályázatért, a Magyar-Amerikai Oktatási Csereprogram Bizottságnak a Fulbright Ösztöndíjért, az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramoknak (OTKA), illetve utódszervezetének a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak (NKFIH) az F35170, D38498, F 038389, K109847 és SNN116912 projektekért, illetve a SI-03/2007, TÉT_10-1-2011-0630 és TÉT_10-1-2011-0727 számú Tudomány és Technológia (TÉT) pályázatokért, az Oktatási Minisztériumnak az FKFP0033/2001 pályázatért, a Magyar Tudományos Akadémiának a számomra megítélt Bolyai János Ösztöndíjért, végül a Szent István Egyetem számára megítélt TÁMOP-4.2.2.B-10/1-2010-0011, TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003, GOP-1.1.1-09/1-2010-0141, KMOP-1.1.1-09/1-2009-0049, 8526-5/2014/TUDPOL, 9878-3/2016/FEKUT és EFOP 3.6.3.-VEKOP 16-2017-00008 pályázatokért.

Hálámat szeretném kifejezni Dr. Mézes Miklós professzor úrnak, az MTA tagjának, aki biztatott a jelen dolgozat megírására és folyamatos támogatásáról biztosított. Hálával tartozom Dr. Horváth László professzor úrnak, aki elindított tudományos pályámon és megtanított a halászat-halgazdálkodás szeretetére. Köszönettel tartozom a dolgozatban leírt kísérletekben nyújtott segítségért számos külföldi kollégának: Dr. Terrence R. Tiersch és Dr. Jill A. Jenkins (Louisiana State University, Amerikai Egyesült Államok), Dr. William R. Wayman és Dr. Jan C. Dean (U.S. Fish and Wildlife Service, Amerikai Egyesült Államok), Dr. Steven D. Mims (Kentucky State University, Amerikai Egyesült Államok), Dr. Catherine Labbé (INRA, Franciaország), Dr. María Paz Herráez és Dr. Sonia Martínez-Páramo (Universidad de León, Spanyolország), Dr. Juan F. Asturiano (Universitat Politècnica de València, Spanyolország) és végül annak a kollégának, aki a legnagyobb hatással volt munkámra és gondolkodásomra külföldi ismerőseim közül, Dušan Jesenšek úrnak a Tolmini Horgászegyesülettől, Szlovéniából. Külön köszönet illeti azokat a hazai halgazdasági vállalkozásokat, illetve ezek vezetőit, akik segítettek munkámat, elsősorban Szabó Krisztiánt a Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdaság vezetőjét és Hoitsy György urat, a Lillafüredi Pisztrángtelep vezetőjét, aki megtanított a pisztrángok szeretetére.

Köszönettel tartozom a SZIE Halgazdálkodási Tanszéke minden munkatársának, aki az elmúlt évek során segítette a kutatómunkámat. Külön kiemelném egykori tanítványaimat, Dr. Miskolczi Editet, Mihálffy Szilviát, Ősz Katalint, Vranovics Károlyt, Dr. Bokor Zoltánt, Dr. Bernáth Gergelyt, Ősz Ágneszt, illetve a kutatócsoportunk jelenlegi tagjait: Dr. Jelena Lujić-ot, Dr. Kása Esztert, Kollár Tímeát, Zoran Marinović-ot, Pataki Bernadettet és Ilija Šćekić-et. A Tanszék munkatársai közül mégis a legtöbb köszönet munkahelyi vezetőmet és barátomat, Dr. Urbányi Béla egyetemi tanárt illeti meg, akivel 1993 óta ismerjük egymást és dolgozunk együtt és aki mindig meghatározó szerepet töltött be tudományos karrieremben és szakmai

előmenetelemben. Béla mellett, hogy kitartó és gondoskodó barát, igazi közösségszervező, aki folyamatosan a munkatársai érdekeit tartja szeme előtt.

Végül köszönetet szeretnék mondani családomnak a hosszú évek során nyújtott támogatásért és szeretetért. Köszönet illeti meg szüleimet, akik felneveltek és megtanítottak a valódi értékek tiszteletére, illetve elindítottak az agrártudományi pályán. Szavakkal nehezen kifejezhető az a hála, amit feleségem, Horváth-Karip Krisztina, Ádám fiam és Borbála lányom iránt érzek, aki szerettek, segítettek és időnként el kellett viseljék, hogy a munkám miatt nem vagyok velük annyit, amennyit kellett volna.