



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**A CSUKA (*ESOX LUCIUS*) ÜZEMI SPERMAMÉLYHŰTÉSI
TECHNOLÓGIÁJÁNAK KIDOLGOZÁSA ÉS A
MÉLYHŰTÖTT SPERMÁBÓL SZÁRMAZÓ LÁRVÁK
VIZSGÁLATA**

Doktori értekezés tézisei

Molnár József

Gödöllő
2024

**A doktori iskola
megnevezése:**

Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori
Iskola

tudományága:

Állattenyésztési tudományok

vezetője:

Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, MTA rendes tagja
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Élettani és Takarmányozástani Intézet,
Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezetők:

Dr. Bokor Zoltán
tudományos főmunkatárs
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet,
Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Bernáth Gergely
tudományos főmunkatárs
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet,
Halgazdálkodási Tanszék

.....

.....
A programvezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A munka előzményei

A csuka (*Esox lucius*) jelentős halászati, horgászati és szocio-ökológiai értékkel rendelkezik szerte Euráziában és Amerikában. A túlhalászat és az élőhelyek degradációja folyamatosan csökkenti az életterét és a populációk egyedszámát. A kereslet azonban dinamikusan növekszik a faj iránt, elsősorban sporthorgászati célból. A csuka indukált szaporításának eredményei szaporodási időszakonként nagy variabilitást mutatnak, és nem mindig tudják kielégíteni a telepítőanyag iránti igényeket (SÄISÄ et al. 2008; CRANE et al. 2015; CEJKO et al. 2020a; VIRBICKAS 2021). A tenyésztési eljárás leginkább megszokáson alapuló módszerekből áll. Az elmúlt évtizedekben kevés újítás épült be a csuka tenyésztéstechnológiájába (HORVÁTH & MAGYARY 2007; SZABÓ 2016b; KRISTAN et al. 2020).

A csuka eredményes szaporítása nehézségekbe ütközik. A hímivarú egyedek, vagy másnéven tejesek esetében a klasszikusan alkalmazott fejési technikával csak kis mennyiségű és gyakran alacsony minőségű sperma fejhető. A gyakorlatban a kioperált heréből nyerik ki a hímivarterméket, ami a tejes egyedek leölésével jár (BILLARD 1996; KOWALSKI et al. 2012; BLECHA et al. 2016; KRISTAN et al. 2020), így azokat további szaporításokba már nem lehet bevonni. Esetenként az alacsony számú rendelkezésre álló tejes miatt a tógazdák gyakran kisebb mennyiségű ikra termékenyítésére kényszerülnek (CEJKO et al. 2020b; KRISTAN et al. 2020).

A sperma fagyasztásával a tenyésztésbe vont tejesek számát optimalizálni lehetne, ami csökkenthetné a tartási és termelési költségeket (CEJKO et al. 2020b). A mélyhűtött sperma korlátlan ideig tárolható, valamint könnyen hozzáférhetővé is válhat (CABRITA et al. 2010; URBÁNYI 2011). A halsperma mélyhűtésről már az 1950-es években is készültek publikációk, azonban kevés halfaj esetén sikerült olyan magas színvonalon optimalizált és könnyen ismételhető módszert kidolgozni, amely átültethető a keltetőházi és tenyésztési gyakorlatba (URBÁNYI 2011; ASTURIANO et al. 2017). A csuka spermamélyhűtésével kapcsolatban alacsony számú publikáció készült el napjainkig, amelyekben számos esetben eltérőek a mélyhűtési protokollok, a felolvasztási módszerek, a hígítási arányok, a hígítók és az aktiváló oldatok. Az 1990-es évektől kezdődően a csukasperma fagyasztásához kapcsolódó kísérletekben alkalmazott műszalmák térfogata az adott kutatók kísérletbeállításaitól függően 0,25-1,2 ml között változott. A további kutatások során indokolt a nagyobb űrtartalmú műszalmák mélyhűtési

technológiájának fejlesztése is (LAHNSTEINER et al. 1998; LAHNSTEINER 2000; ZHANG et al. 2011; DIETRICH et al. 2016; BERNÁTH et al. 2017b; CEJKO et al. 2020b). A csukaszaporítás módszertani fejlesztése hozzájárulhat a termelés hatékonyságának növeléséhez (CEJKO et al. 2020b).

A fagyasztott csukasperma keltetőházi technológiába adaptálását tehát a pontosan kidolgozott technológia és a sztenderdizáció hiánya nagymértékben akadályozza. A fent leírtak alapján a csuka termelés mennyiségének növelése érdekében indokolt az üzemi körülmények elvárásaihoz alkalmazkodó fajspecifikus spermamélyhűtési eljárás kidolgozása.

1.2. Célkitűzések

Doktori munkám megkezdése előtt a következő célokat tűztem ki:

- **A hormonális kezelés, különböző spermamintavételi módszerek és hígítók összehasonlítása:**
 - Két különböző spermamintavételi módszer tesztelése.
 - Fajspecifikus hígító oldat kidolgozása a csukasperma mélyhűtéséhez.
- **Nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtésének módszertani fejlesztése és optimalizálása:**
 - A spermamélyhűtési technika átültetése a polisztirol dobozhoz képest kontrolláltabb fagyasztási körülményeket biztosító programozható fagyasztó berendezésbe.
 - Az 5 ml-es műszalma és a 10 ml-es kriocső alkalmazhatóságának vizsgálata a mélyhűtés során.
 - A 10 ml-es kriocső megfelelő felolvasztási sebességének tesztelése.
- **Nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett keltetőházi csukaszaporítás, valamint rövidtávú lárvanevelés vizsgálatai:**
 - A mélyhűtött sperma tesztelése keltetőházi szaporítás során.
 - A mélyhűtött spermából származó lárvák fejlődéstani vizsgálata annak érdekében, hogy bizonyítsam, a sperma fagyasztása nincs negatív hatással a lárvák növekedésére, morfológiai elváltozásaira és túlélő képességére a vizsgált lárvafejlődési szakaszban.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A doktori munkámhoz szükséges anyaállomány a Szegedfish Kft. tógazdaságából származott. A spermavizsgálatokat Gödöllőn, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (illetve jogelődjében: Szent István Egyetem), Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszékén végeztem. A csukaszaporításhoz kapcsolódó kísérleteket a Szegedfish Kft. keltetőházában, Szeged külterületén valósítottam meg.

2.1. A halak hormonális kezelése és az ivartermék gyűjtésének módszere

Az anyaállomány egyedeit 3,5 mg/ttkg hipofízissel kezeltem hormonálisan. Tejeseknél 48, ikrásoknál 96 órával az ivartermék kinyerése előtt adtam be a 3,5 mg/ttkg ponty (*Cyprinus carpio*) hipofízist tartalmazó injekciót. Az ikrásoknál nyújtott hatóanyag leadású vivőanyagot (971P karbopol polimertípus) is tartalmazott a befecskendezett oldat (SZABÓ 2001, 2008, 2011). A tejesek esetében a spermát, kísérleti beállítástól függően fejéssel vagy a here operálásával és annak préselése útján nyertem ki. A kísérleti halak hormonális kezelését és az ivartermék kinyerését megelőzően minden esetben elbódítottam a halakat a megfelelő mértékben (BOBE & LABBÉ 2008; BOKOR et al. 2010).

2.2. A spermasűrűség meghatározása

A spermasűrűség meghatározásánál a kihígított spermamintákat Bürker-kamrás sejtszámlálón fotóztam le, utána ImageJ szoftveren számoltam meg a sejteket, amely adatokból megállapítottam a milliliterenkénti átlagos sejtszámot (BOKOR 2010).

2.3. A sperma motilitás vizsgálata

A friss, illetve a mélyhűtést követően felolvasztott spermaminták motilitási vizsgálatait egy számítógép által vezérelt spermavizsgáló rendszerrel rögzítettem (CASA, Computer-Assisted Sperm analysis) (BERNÁTH et al. 2017a). Az adatokat Sperm VisionTM v. 3.7.4. (Minitube of America, Venture Court Verona, Egyesült Államok) szoftverrel értékeltem ki. A spermiumok aktiválásához LAHNSTEINER et al. (1998) által kifejlesztett csuka aktiváló oldatot (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH: 8) alkalmaztam. A spermiumok letapadásának elkerülése érdekében az oldathoz 0,5% szarvasmarha szérumból albumint (BSA) adtam. A CASA rendszerrel a sperma mozgására utaló paraméterek közül az alábbiakat vizsgáltam két ismétlésben: progresszív motilitás (pMOT – Progressive motility, %), a hímivar-sejt sebessége a ténylegesen megtett teljes mozgási útvonalára számolva (VCL – Curvilinear velocity, $\mu\text{m/s}$) és

a hímivarsejt átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése (STR - Straightness, %) (RURANGWA et al. 2004; WILSON-LEEDY & INGERMANN 2007).

2.4. A sperma mélyhűtése

A spermamélyhűtési és a felolvasztási kísérletek általános folyamatai

A vizsgálatok követhetősége érdekében elsőként a mélyhűtés általános menetét ismertetem. A kísérleteket egy specifikusan a csukasperma fagyasztására, a doktori munkám során megalkotott hígítóval végeztem, melynek komponenseit a csuka közeli rokona, a muskellunge sperma szemínális plazmájának összetétele alapján (LIN et al. 1996a) állítottam össze: 150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH $8 \pm 0,02$. Intracelluláris védőanyagként 10% végső oldat koncentrációjú metanolt alkalmaztam (LAHNSTEINER 2000; HORVÁTH et al. 2015). Kísérleti beállítástól függően három hígítási arányt (sperma:hígító) alkalmaztam: 1:1, 1:9, valamint 1:19-et (HOAR et al. 1983; BOKOR et al. 2010)

A mélyhűtést szintén kísérleti beállítástól függően polisztirol dobozban és/vagy programozható fagyasztó berendezésben hajtottam végre (controlled-rate freezer, CRF, IceCube 14s, IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria) meghatározott programok szerint (1. táblázat). A folyékony nitrogénben tárolt spermaminták felolvasztása minden esetben 40°C-os vízhőmérsékletű vízfürdőben történt (Thermo Haake P5, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok).

1. táblázat: A kísérletekben alkalmazott mélyhűtési módszerek és programok, valamint felolvasztási idők.

Mélyhűtési programok tárolóegységek szerint	
0,5 ml-es műszalma	
•	polisztirol dobozba töltött folyékony nitrogén felett 3 cm-el, 3 perc (HORVÁTH et al. 2003),
•	CRF, 7,5°C → -160°C, hűtési sebesség: 56°C/perc (BERNÁTH et al. 2015).
5 ml-es műszalma	
•	polisztirol dobozban a folyékony nitrogén felett 3 cm-el, 7 perc (BOKOR et al. 2010),
•	CRF, 4°C → -160°C, hűtési sebesség: 15°C/perc (BOKOR et al. 2019).
10 ml-es kriocső	
•	CRF, 4°C → -160°C, hűtési sebesség: 15°C/perc (BOKOR et al. 2019).
A felolvasztási időtartamok tárolóegységtől függően	
•	0,5 ml-es műszalma: 13 mp (HORVÁTH et al. 2012),
•	5 ml-es műszalma: 35 mp (VÁRKONYI et al. 2019),
•	10 ml-es kriocső: kísérletesen lett meghatározva.

2.4.1. A hormonális kezelés, különböző spermamintavételi módszerek és hígítók összehasonlítása

A hormonális kezelés spermaminőségre gyakorolt hatásának vizsgálata

A mélyhűtéshez kapcsolódó kísérleti tervem első részében vizsgáltam a hormonális indukció hatását a sperma motilitására nézve. A kontroll csoportban halfiziológiás sóoldatot (0,65%-os NaCl-os oldat) fecskendeztem az egyedek hasüregébe 1 ml/testtömeg kg mennyiségben. A kezelt csoportban 3,5 mg/testtömeg kg mennyiségű ponty hipofízist adtam hozzá a sóoldathoz. A sperma kinyerését a hagyományos fejési módszerrel végeztem ($N=5-5$).

Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlítása a mélyhűtés során

Az előző vizsgálat eredményei alapján a továbbiakban a 3,5 mg/ttkg ponty hipofízis hormondózist alkalmaztam. A spermát a here operálásával és préselésével nyertem ki. A kísérleti beállítás szerint az általam fejlesztett csuka hígítóhoz 150 mM glükózt vagy 150 mM trehalózt adtam hozzá, extracelluláris védőanyagként (ALAVI et al. 2009; LIN et al. 1996a). A mélyhűtést 0,5 ml-es műszalmában, polisztirol dobozban végeztem 1:3, 1:9 és 1:19 hígítási arányok alkalmazásával ($N=5$).

Két sperma kinyerési módszer összehasonlításának vizsgálata a mélyhűtés során 0,5 ml-es műszalma alkalmazásával

A sperma kinyerését fejéssel és a here kioperálásával végeztem ($N=5-5$). Korábbi vizsgálatok eredményeit alapul véve alkalmaztam tovább a hormonális indukciót, a mélyhűtéshez pedig a 150 mM glükóz tartalmú csuka hígítót és az 1:9 hígítási arányt. A 0,5 ml-es műszalmát polisztirol dobozban mélyhűtöttem.

2.4.2. Nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának vizsgálatai

A következőkben a korábbi kísérletek eredményeinek értékelése alapján egységesen alkalmaztam a hormonális kezelést, a spermakinyeréshez a here operálását és a mélyhűtéshez a glükózalapú csukahígítót. A vizsgálatoknál 1:9 sperma:hígító arányt használtam, kivéve ott, ahol az egyes hígítási arányokat vetettem össze.

A polisztirol hűtődoboz és a programozható fagyasztó berendezés összehasonlítása 0,5 ml-es műszalma esetén

A mélyhűtés intenzifikálásának és optimalizálásának kísérleteit a polisztirol doboz és a programozható fagyasztó berendezés eszközök összehasonlításával kezdtem meg, amelyekben a 0,5 ml-es műszalmákba töltött spermamintákat fagyasztottam le ($N=7$).

Különböző hígítási arányok összehasonlítása programozható fagyasztó berendezésben 10 ml-es kriocső használatával

A 7 db tejestől kinyert spermát 10 ml-es kriocsőbe töltve mélyhűtöttem CRF-ben. Vizsgálatomban az 1:3, 1:9 és 1:19 hígítási arányokat hasonlítottam össze.

Három különböző felolvasztási időtartam tesztelése 10 ml-es kriocső esetén

A 10 ml-es kriocső mélyhűtési módszerének tesztelése után a felolvasztás időtartamának optimalizálását tűztam ki célul. Kísérletemben három különböző felolvasztási intervallumot hasonlítottam össze: 3 perc, 3,5 perc és 4 perc ($N=9$).

Az 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső összehasonlítása különböző fagyasztási módszerek alkalmazásával

Keltetőházi körülmények között hasonlítottam össze az 5 ml-es műszalmát, polisztirol dobozban és CRF-ben, valamint a 10 ml-es kriocsövet a mélyhűtés eredményessége szempontjából ($N=5$).

2.4.3. Nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett keltetőházi csukaszaporítás, valamint rövidtávú lárvanevelés vizsgálatai

Üzemi körülmények között, a Szegedfish Kft. keltetőházában végeztem el a csukaszaporítást és a lárvanevelést. A munka során a vállalkozás által kidolgozott és alkalmazott protokollt követtem (a keltetőház vezető utasításai szerint).

Az ivartermékek előkészítése a szaporításhoz

Először a spermát nyertem ki a here kioperálásának módszerével. Csoportonként 5 tejes mintájával dolgoztam (friss és 3 mélyhűtött csoport). A spermát előkészítés után fagyasztottam le három különböző spermamélyhűtési eljárással: 5 ml-es műszalma polisztirol dobozban és CRF-ben, valamint 10 ml-es kriocső CRF-ben. Hígításnak az 1:9 arányt választottam. A sperma mélyhűtése után fejtem le az ikrásokat, majd olvasztottam fel a spermamintákat.

Termékenyítés

Az optimális sperma:ikra arány kiválasztásához korábbi vizsgálatokban előzetesen megállapítottam az átlagos sperma sejtsűrűséget: $2,99 \cdot 10^{10}$ spermium/ml ($N=54$), melyek segítségével és irodalmi munkákra alapozva határoztam meg a termékenyítési egységet: 2112 μ l sperma:250 g ikra (LAHNSTEINER 2000). A friss és a három mélyhűtött csoportban 5-5 ismétlést alkalmaztam. Az 5 ml-es műszalma 4

ml, a 10 ml-es kriocsó 8 ml sejtszuszpenziót tartalmazott. A száraz termékenyítés során rendszervíz hozzáadásával 20 másodperc aktivációs időtartamot alkalmaztam, majd duzzasztottam az ikrát 10 percig (WOYNÁROVICH & WOYNÁROVICH 1980), majd kezelésként 9 literes Zuger-üvegekbe helyeztem az ikratételeket.

Az ikra inkubációja

Az 5 napig tartó ikra inkubáció során a víz hőmérséklet $15,5 \pm 0,85^{\circ}\text{C}$, az oldott oxigén szint pedig $8,85 \pm 0,2$ mg/l volt. A penészesedés megelőzése érdekében naponta egyszer DETOX (4,5% perecetsav és 20% hidrogén-peroxid oldat) kezelést végeztem (NÉMETH et al. 2012). A penészes, illetve elpusztult ikraszemeket nem távolítottam el az inkubáció alatt annak érdekében, hogy a kelési arányt meg tudjam határozni.

A kelési arány meghatározása és az ikra keltetése

A kelési arányt közvetlenül a kelés pillanatában határoztam meg. A 20 db Zuger-üvegből legalább 100-100 db ikraszemet tartalmazó mintákat vettem. A mintákról fényképet készítettem és ImageJ szoftverrel számoltam meg az életképes- és élettelen ikraszemeket. A keltetést az általánosan alkalmazott módszerrel végeztem, a halgazdaság gyakorlata szerint (SZABÓ 2000).

Lárvanevelési vizsgálat

Kelést követően a kialakított négy csoport egyedeit két ismétlésben 1100 db lárva/ketrec mennyiségben helyeztem ki az átfolyóvízes rendszerbe. A vizsgálat során a víz hőmérséklet $15,22 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$, az oldott oxigén szint $9,67 \pm 0,46$ mg/l volt. A nevelési időszak 10 napig tartott, ahol három különböző lárvafejlődési stádiumban vizsgáltam az egyedek növekedési paramétereit és a morfológiai elváltozásait:

- közvetlen kelés után,
- a nem-táplálkozó lárvaszakasz végén (kelést követő 5. nap végén),
- 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban (a kísérlet 10. napján).

A táplálkozás megkezdését követően a halakat 15 percenként takarmányoztam (Skretting NUTRA Pro ivadéknevelő táppal) *ad libitum*, folytatólagosan 24 óra időtartamban. Napi két alkalommal tisztítottam a ketrecek és jegyeztem fel az elhullást.

A három mintavételi napon az ivadékot Gödöllőre szállítottam a Halgazdálkodási Tanszékre, majd meghatároztam a nyolc lárwanevelési egységből ketrecenként 50-50 egyed nedves testtömegét és teljes testhosszát, valamint 50-50 egyed morfológiai elváltozásait. A teljes testhosszt mm-ben megadva vonalzóval, a nedves testtömeget analitikai

mérlegen mérve (AB204-S, Mettler-Toledo Kft., Budapest, Magyarország) 0,1 mg pontossággal jegyeztem fel. A lárvák fejlődési rendellenességeinek vizsgálatához az egyedeket sztereomikroszkóp alatt fényképeztem le (Leica M205 FA sztereomikroszkóp Biomarker Kft., Gödöllő, Magyarország; Leica DFC 425C kamera, Bright Field 15*-30* Biomarker Kft., Gödöllő, Magyarország). A torzult lárvák feljegyzését az alábbi főbb kategóriák alapján végeztem: test görbülése, szem deformitás (alak, lencse), kraniofaciális deformitás, ödéma (szik és szív), eltérés a szik alakjában, szomita eltérés (alak, szám), hematóma és faroktorzulás (hiány, rövidülés) (MAZURIAS et al. 2009; PANZICA-KELLY et al. 2012). A 10 napos kísérlet végén megállapítottam a megmaradást, amely értékeléséből kizártam a mintavételezések során kivett egyedeket.

2.5. Az adatok elemzése és értékelése

Az adatok rögzítéséhez és kiértékeléséhez Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok) szoftvert alkalmaztam. Az adatokat GraphPad Prism 5.0 for windows (GraphPad Software, La Jolla, California, Egyesült Államok) és SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Egyesült Államok) statisztikai programokkal elemeztem. A friss és mélyhűtést követően felolvasztott spermiumok progresszív motilitására utaló paramétereket (pMOT, VCL, STR) egy- és kétszemponos ANOVA, valamint Tukey, Dunnett T3, Bonferroni post-hoc teszttel, valamint független kétmintás T-próbával hasonlítottam össze. Minden statisztikai elemzés esetében $p < 0,05$ szignifikancia szintet alkalmaztam. A lárvanevelési vizsgálatok során a nedves testtömeg és a teljes testhossz elemzése és összehasonlítása kétszemponos varianciaanalízissel (two-way ANOVA) és páronkénti összehasonlítás Bonferroni „post hoc” teszttel történt. A megmaradás kiértékelését a csoportok esélyhányadosának („Odds ratio”) összehasonlításával hajtottam végre. A lárvatorzulási adatokat Kruskal-Wallis nem paraméteres próba (páronkénti összehasonlítás Dunn „post hoc” teszt), valamint egyszemponos varianciaanalízis (one-way ANOVA, páronkénti összehasonlítás Tukey „post hoc” teszt) módszerével értékeltem ki (REICZIGEL et al. 2007).

3. EREDMÉNYEK

3.1. A hormonális kezelés, különböző spermamintavételi módszerek és hígítók összehasonlításának eredményei

A hormonális kezelés spermaminőségre gyakorolt hatásának eredményei

Szignifikánsan magasabb pMOT ($43 \pm 20\%$) és VCL ($98 \pm 16 \mu\text{m/s}$) értéket rögzítettem a hormonálisan kezelt csoportban, a kontrollhoz viszonyítva (pMOT: $18 \pm 15\%$; VCL: $69 \pm 14 \mu\text{m/s}$). Az STR esetében nem találtam szignifikáns különbséget a kontroll ($83 \pm 3\%$) és a hormonálisan kezelt ($79 \pm 2\%$) csoport között.

Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlításának eredményei a mélyhűtés során

Statisztikailag igazolhatóan magasabb pMOT értéket rögzítettem a glükóz alapú hígító alkalmazásával minden hígítási arány tekintetében (1:3: $18 \pm 16\%$, 1:9: $20 \pm 13\%$, 1:19: $16 \pm 12\%$) összehasonlítva a trehalóz alapú hígítóval (1:3: $0,3 \pm 1\%$, 1:9: $1 \pm 1\%$, 1:19: $4 \pm 2\%$). A glükóz egyes hígítási arányai között nem tapasztaltam számottevő különbséget, így irodalmi adatokra hivatkozva az 1:9 hígítási arányt (HOAR et al. 1983; BOKOR et al. 2010) alkalmaztam tovább a vizsgálatokban. Az STR paraméternél az 1:3 hígítási arány szignifikánsan magasabb értéket mutatott a glükóz ($86 \pm 4\%$) esetén a trehalóz ($38 \pm 48\%$) tartalmú hígítóval szemben.

Két sperma kinyerési módszer összehasonlításának eredményei a mélyhűtés során 0,5 ml-es műszalma alkalmazásával

A fejés és a here kioperálásával végzett spermakinyerési módszer csoportjainak pMOT értékei között nem találtam statisztikailag igazolható eltérést mélyhűtés előtt és után sem. A here operálás, mint spermakinyerési módszerrel gyűjtött spermaminták felolvasztása után ($29 \pm 17\%$) azonban szignifikánsan alacsonyabb eredményt mértem a friss sperma progresszív motilitásához képest ($85 \pm 10\%$). A fejt sperma esetén nem különült el igazolhatóan a friss ($65 \pm 12\%$) és mélyhűtött csoport ($37 \pm 27\%$) progresszív motilitása. A mélyhűtés hatására nem találtam szignifikáns eltérést a VCL és STR értékekben (kontroll, fejés: $129 \pm 10 \mu\text{m/s}$ és $81 \pm 5\%$; kontroll, kioperált here: $128 \pm 23 \mu\text{m/s}$ és $77 \pm 6\%$; mélyhűtött, fejés: $95 \pm 23 \mu\text{m/s}$ és $90 \pm 4\%$; mélyhűtött, kioperált here: $87 \pm 27 \mu\text{m/s}$ és $87 \pm 3\%$).

3.2. Nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának eredményei

A polisztirol hűtődoboz és a programozható fagyasztó berendezés összehasonlításának eredményei 0,5 ml-es műszalma esetén

A polisztirol doboz és a CRF mélyhűtési módszer esetén is hasonlóan magas progresszív motilitási értéket rögzítettem (polisztirol doboz: $45\pm 11\%$, CRF: $42\pm 17\%$). Felolvasztást követően a pMOT mindkét csoportban szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest ($69\pm 4\%$). Az STR statisztikailag igazolhatóan magasabb volt a kontroll csoportban ($75\pm 3\%$), mint a polisztirol doboz ($85\pm 3\%$) és CRF (86 ± 3) esetén. A VCL értékek nem mutattak szignifikáns eltérést a különböző csoportok között (kontroll: $137\pm 7 \mu\text{m/s}$; polisztirol doboz 0,5 ml-es műszalma: $136\pm 13 \mu\text{m/s}$; CRF 0,5 ml-es műszalma: $122\pm 23 \mu\text{m/s}$).

Különböző hígítási arányok összehasonlításának eredményei programozható fagyasztó berendezésben 10 ml-es kriocső használatával

A felolvasztást követően nem találtam statisztikailag igazolható eltérést a három különböző hígítási arány motilitási paraméterei között (pMOT: 1:3 - $20\pm 10\%$, 1:9 - $30\pm 9\%$, 1:19 - $31\pm 7\%$; VCL: 1:3 - $87\pm 24 \mu\text{m/s}$, 1:9 - $99\pm 14 \mu\text{m/s}$, 1:19 - $95\pm 7 \mu\text{m/s}$). A friss csoporthoz (pMOT: $72\pm 7\%$, VCL: $140\pm 6 \mu\text{m/s}$) képest azonban szignifikánsan csökkent a mélyhűtött csoportok pMOT és VCL értéke. A következő vizsgálatokban a 10 ml-es kriocső esetében az 1:9 hígítási arányát alkalmaztam tovább.

Három különböző felolvasztási időtartam tesztelésének eredményei 10 ml-es kriocső esetén

A pMOT és VCL értékeknél nem találtam szignifikáns eltérést a mélyhűtött 10 ml-es kriocső három különböző felolvasztási ideje között (pMOT 3 perc: $30\pm 6\%$, 3,5 perc: $29\pm 6\%$, 4 perc: $28\pm 8\%$; VCL: 3 perc: $93\pm 9 \mu\text{m/s}$, 3,5 perc: $93\pm 10 \mu\text{m/s}$, 4 perc $95\pm 9 \mu\text{m/s}$). A kontroll csoporthoz képest (pMOT: $62\pm 11\%$ és VCL $148\pm 11 \mu\text{m/s}$) szignifikánsan alacsonyabb volt mindhárom kezelt csoport pMOT és VCL értéke. Az STR értékek nem mutattak szignifikáns eltérést a minták felolvasztását követően (1:3: $85\pm 3\%$; 1:9: $87\pm 3\%$; 1:19: $87\pm 2\%$). A további vizsgálatokban a 10 ml-es kriocsőben tárolt mintákat 3 perc időtartamban olvasztottam fel.

Az 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső összehasonlításának eredményei különböző fagyasztási módszerek alkalmazásával

A fagyasztott minták felolvasztása után a pMOT és a VCL tekintetében nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($50\pm 9\%$ és $79\pm 8 \mu\text{m/s}$), a CRF 5 ml-es műszalma

($57\pm 10\%$ és $86\pm 14\ \mu\text{m/s}$) és a CRF 10 ml-es kriocső ($41\pm 10\%$ és $74\pm 11\ \mu\text{m/s}$) csoportok motilitási értékei között. A fagyasztás után felolvasztott mintákkal összevetve a kontroll sperma esetén statisztikailag igazolhatóan magasabb pMOT ($74\pm 7\%$) és VCL ($136\pm 7\ \mu\text{m/s}$) értékeket rögzítettem. Az STR esetében nem rögzítettem statisztikailag igazolható eltérést a kontroll ($87\pm 2\%$), polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($90\pm 1\%$); CRF 5 ml-es műszalma ($89\pm 2\%$) és CRF 10 ml-es kriocső ($89\pm 2\%$) csoportok között.

3.3. Nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett keltetőházi csukaszaporítás, valamint rövidtávú lárvanevelés vizsgálatainak eredményei

A kísérlet kezdetén mért sperma szignifikánsan magasabb pMOT értéket mutatott ($74\pm 7\%$), mint 5 órával később, azaz a kísérlet végén ($31\pm 13\%$) és mint a három mélyhűtött csoport (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $32\pm 3\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $53\pm 6\%$, CRF 10 ml-es kriocső: $15\pm 4\%$). A kísérlet végén mért sperma és a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma csoport szignifikánsan magasabb progresszív motilitást mutatott, mint a 10 ml-es kriocső csoportja. A CRF 5 ml-es műszalma csoport esetén statisztikailag igazolhatóan magasabb eredményt rögzítettem összehasonlítva a kísérlet végén mért sperma, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma és CRF 10 ml-es kriocső csoportokkal.

Szignifikánsan magasabb VCL eredményt rögzítettem a friss sperma esetén ($135\pm 11\ \mu\text{m/s}$), mint a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($84\pm 6\ \mu\text{m/s}$), CRF 5 ml-es műszalma ($103\pm 5\ \mu\text{m/s}$) és CRF 10 ml-es kriocső ($58\pm 8\ \mu\text{m/s}$) értékeinél. A CRF 5 ml-es műszalma szignifikánsan magasabb értéket mutatott, mint a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma és CRF 10 ml-es kriocső csoportja. A CRF 10 ml-es kriocső csoportja esetén statisztikailag igazolhatóan alacsonyabb értéket írtam le, mint az eltérő friss és mélyhűtött csoportokban. A kísérlet végén mért spermaminta VCL értéke ($84\pm 25\ \mu\text{m/s}$) nem különbözött el szignifikánsan a friss, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma és CRF 5 ml-es műszalma csoportoktól.

A polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($82\pm 1\%$) és CRF 10 ml-es kriocső ($84\pm 3\%$) csoportokban statisztikailag igazolhatóan magasabb STR értékeket rögzítettem, mint a kísérlet kezdetén mért kontroll spermaminta ($76\pm 4\%$), 5 óra múlva mért kontroll minta ($69\pm 3\%$) és CRF 5 ml-es műszalma ($76\pm 2\%$) csoportok esetén. A kísérlet elején mért kontroll és a CRF 5 ml-es műszalma csoportokban szignifikánsan magasabb eredményt írtam le, mint a vizsgálat végén mért kontroll csoportban.

A kelési arány meghatározásakor nem rögzítettem statisztikailag igazolható eltérést a friss csoport értékeiben ($7\pm 4\%$), a mélyhűtött polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($16\pm 8\%$), a CRF 5 ml-es műszalma ($21\pm 16\%$) és a CRF 10 ml-es kriocső ($11\pm 2\%$) csoportokhoz képest.

A testtömeg adatok alapján, közvetlen kelés után statisztikailag igazolhatóan magasabb értéket tapasztaltam a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($8,45 \pm 0,89$ mg) és a CRF 10 ml-es kriocső ($8,39 \pm 1,49$ mg) csoportokban, mint a kontroll ($8,11 \pm 1,26$ mg) és a CRF 5 ml-es műszalma ($7,87 \pm 0,85$ mg) esetén. A nem-táplálkozó lárvastádium végén nem találtam szignifikáns eltérést a négy különböző csoport testtömeg adatai között. Az 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban szignifikánsan magasabb értéket rögzítettem a mélyhűtött csoportokban (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $17,38 \pm 2,25$ mg; CRF 5 ml-es műszalma: $17,58 \pm 2,18$ mg; CRF 10 ml-es kriocső: $17,28 \pm 1,95$ mg) a kontroll csoporttal ($16,48 \pm 2,04$ mg) összevetve.

A testhossz adatok értékelésénél közvetlen kelés után a mélyhűtött csoportokban szignifikánsan magasabb értéket rögzítettem (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $8,37 \pm 0,68$ mm, CRF 5ml-es műszalma: $8,49 \pm 0,67$ mm és CRF 10 ml-es kriocső: $8,54 \pm 0,66$ mm), mint a kontroll csoportban ($8,22 \pm 0,86$ mm). A CRF 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső csoportjai továbbá szignifikánsan magasabbak voltak, mint a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma csoportja. A nem-táplálkozó lárvaszakasz végén nem találtam statisztikailag igazolható eltérést a kontroll ($12,89 \pm 0,65$ mm) és a mélyhűtött csoportok között (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $12,91 \pm 0,70$ mm, CRF 5 ml-es műszalma: $12,98 \pm 0,64$ mm és CRF 10 ml-es kriocső: $12,77 \pm 0,67$ mm). Az 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban szignifikánsan magasabb testhosszt rögzítettem a mélyhűtött csoportokban (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $14,83 \pm 0,86$ mm, CRF 5 ml-es műszalma: $14,71 \pm 0,67$ mm és CRF 10 ml-es kriocső: $14,86 \pm 0,94$ mm), mint a kontroll esetén ($12,89 \pm 0,65$ mm).

A rövidtávú lárvanevelés során nem jegyeztem fel szignifikáns eltérést a friss (69%) és a három mélyhűtési módszerrel fagyasztott spermából származó (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: 80%, CRF 5 ml-es műszalma: 74%, CRF 10 ml-es kriocső: 74%) lárvá megmaradás értékei között.

A kezelési csoportokat értékelve a friss és mélyhűtött spermából származó lárvák torzulási arányai között nem találtam szignifikáns eltérést (friss: 11,71%, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: 8,97%, CRF 5 ml-es műszalma: 7,66%, CRF 10 ml-es kriocső 9,96%). A lárvamorfológiai vizsgálatok kiértékelése során szignifikánsan több torzult lárvát jegyeztem fel közvetlenül a kelést követően (17,2%), a nem-táplálkozó lárvá (4,75%) és az 5 napos táplálkozó lárvá stádiumhoz (6,28%) képest, ahol gyakran megfigyelhető volt több szervi elváltozás is egy egyeden. Közvetlen kelés után nem találtam statisztikailag igazolható különbséget a lárvadeformitási arányok között. A nem-táplálkozó lárvaszakasz végén mindegyik

csoportban alacsony számban tapasztaltam lárvatorzulást, valószínűleg az idő múlásával kisselektálódtak a torzult egyedek.

Az 5 napos táplálkozó lárvá morfológiai vizsgálata során a nem-táplálkozó lárvaszakaszhoz hasonlóan alacsony számban tapasztaltam deformált egyedeket, valamint megjelent egy új típusú, akár fizikai sérülés hatására is kialakuló fejlődési rendellenesség, a hematóma, amely minden csoportban megfigyelhető volt.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. Következtetések

4.1.1. A különböző spermamintavételi módszerek és hígítók tesztelésére irányuló vizsgálatok eredményeiből levonható következtetések

A hormonális indukció segítségével szignifikánsan magasabb motilitási eredmények érhetők el, amit megerősítenek a korábbi tanulmányok leírásai (HULAK et al. 2008a; CEJKO et al. 2018) is. Mélyhűtés előtt nem találtam szignifikáns eltérést a progresszív motilitásban a fejés és a kioperált here módszere között, azonban felolvasztást követően szignifikánsan csökkent a kioperált here csoport pMOT értéke. A két spermakinyerési módszer közül mégis indokolt lehet a here kioperálása, mivel így a fejéshez képest akár tízszeres nagyságrenddel több sperma nyerhető ki. A keltetőházakban bevett gyakorlat a tejcs egyedeinek feláldozása. Egyelőre nem áll rendelkezésre olyan, a halak számára kíméletes módszer, amely megoldást nyújt a fejési nehézségek hatékony kiküszöbölésére (DE MONTALEMBERT et al. 1978; BILLARD & MARCEL 1980; LAHNSTEINER et al. 1998; ROSSEN & ABADJIEVA 2015; KRISTIANSEN et al. 2020).

A keltetőházi körülmények igényeihez alkalmazkodó és optimalizált csukasperma mélyhűtési technológiát egy új, fajspecifikus hígító kifejlesztésével alapoztam meg, amely üzemi szinten is bizonyította hatékonyságát. A munkám során kidolgozott 386 mOsmol/kg ozmolalitású hígító (150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH $8 \pm 0,02$) a csuka szemínális folyadékához hasonló környezetet teremtett, és megakadályozta a spermiumok aktiválódását (LIN et al. 1996a). Vizsgálataimban szignifikánsan magasabb progresszív motilitási értéket állapítottam meg a glükóz hozzáadásával készített hígítóval mindhárom hígítási arány mellett, összevetve a trehalózt tartalmazóval. Korábbi vizsgálatokat értékelve (BABIÁK et al. 1997; ALAVI et al. 2009; DIETRICH et al. 2016; CEJKO et al. 2020b) a hígítók cukortartalma jelentős tényező a csukasperma mélyhűtésében. A spermamélyhűtés során munkámban a glükóz jobb extracelluláris védőanyagnak bizonyult.

4.1.2. A nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának eredményeiből levonható következtetések

Sikeresen mélyhűtöttem csukaspermát 0,5 ml-es műszalmában polisztirol dobozban és CRF-ben egyaránt. Az összehasonlító vizsgálat során a spermaminták felolvasztása után nem találtam szignifikáns eltérést a mért mozgási paraméterek (pMOT, VCL STR) értékei között. Programozható fagyasztó berendezésben tudomásom szerint még nem mélyhűtöttek csuka hímvivarterméket. Eredményeimből következtethető, hogy BERNÁTH et al. (2016a, 2016b) által sügérre (*Perca fluviatilis*) és pontyra kifejlesztett CRF-ben végzett mélyhűtési protokollja sikeresen alkalmazható csukasperma esetében is. A CRF pedig lehetőséget nyújt sztenderd és optimalizált körülményeket biztosítani és növelni a mélyhűtési protokollok ismételhetőségét, szemben a polisztirol dobozzal, amelynél az eredményeket befolyásolhatják a külső környezeti tényezők (pl. doboz méret, külső hőmérséklet, levegőmozgás)

A 10 ml-es kriocső felolvasztása után az 1:3, 1:9 és 1:19 hígítási arány között nem találtam szignifikáns eltérést a motilitási paraméterekben. Az általam használt 10 ml-es kriocső magasabb hígítási arány mellett (1:9) is megfelelő mennyiségű spermát tartalmazott, azonban az üzemi felhasználás szempontjából megfontolandó az 1:3 sperma:hígító arány jövőbeli tesztelése és adaptálása a keltetőházi gyakorlatba.

Az általam választott három felolvasztási periódus (3 perc, 3,5 perc és 4 perc) nem befolyásolta a vizsgált motilitási paramétereket. A keltetőházi halszaporítások termékenyítései során kulcsfontosságú az ivartermékek felhasználásának gyorsasága, mivel azok minősége fejest követően folyamatosan, nagy sebességgel csökken (LEGENDRE et al. 1996; KRISTAN et al. 2018). A fagyasztott sperma felolvasztásánál tehát a lehető legrövidebb időtartamot kell kiválasztani. A 10 ml-es kriocsőben mélyhűtött csukasperma a tesztek alapján jól tolerálja a gyors hőmérséklet-emelkedést, ami elősegítheti üzemi szintű alkalmazhatóságát.

A tudományos irodalomban tudomásom szerint eddig LAHNSTEINER et al. (1998) mélyhűtöttek a legnagyobb volumenben csukaspermát (1,2 ml-es műszalmában). Kísérleteimet így más halfajokon végzett, vizsgálatommal közel megegyező protokollal fagyasztott ponty (VÁRKONYI et al 2019) és harcsa (*Silurus glanis*) (BOKOR et al. 2019) eredményeivel vettem össze, és hasonlóan magas motilitási eredményeket értem el. A korábbi kutatások és a saját munkám eredménye igazolja, hogy a 10 ml-es kriocső integrálható gazdaságilag értékes halfajok, így a csuka üzemi körülmények között végzett spermamélyhűtéséhez is. A 10 ml-es kriocső programozható fagyasztó berendezésben végzett mélyhűtése mellett azonban mindenképpen fel kell

hívni a figyelmet az 5 ml-es műszalma CRF-ben és polisztirol dobozban való mélyhűtésére. A kutatásomban ugyanis nem találtam szignifikáns eltérést a három különböző módszerből származó sperma motilitási és kelési eredményei között. A bemutatott eredményeimből következik, hogy a vizsgált három mélyhűtési módszer hatékony lehet a csuka üzemi szaporításában is. A csukaszaporítás egyik limitáló tényezője a megfelelő mennyiségű hímivarú szülőállat, valamint a kinyerhető sperma mennyisége és minősége (SZABÓ 2016b). A mélyhűtött sperma tárolása és keltetőházi felhasználása alternatív megoldás lehet akkor, ha nem áll rendelkezésre a megfelelő számú tejes az adott időszakokban. A halsperma mélyhűtés folyamatosan és dinamikusan fejlődik, ennek ellenére néhány kivételtől eltekintve nem sikerült átültetni a gyakorlatba (TIERSCH 2008; URBÁNYI 2011). A leginkább meghatározó tényező a mélyhűtés költsége. Szükségszerű kiemelni, hogy a programozható fagyasztó berendezéshez hasonló eredmények érhetőek el az 5 ml-es műszalmával polisztirolban mélyhűtve, amely lényegesen költséghatékonyabb is, ugyanis nem szükséges megvásárolni a rendkívül költséges berendezést. Terepi körülmények között hatékonyabban alkalmazható (pl. egyszerűbb szállítás, nem igényel áramforrást). A polisztirol doboz hátránya azonban, hogy kevésbé standardizálható.

4.1.3. A nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett keltetőházi csukaszaporítás, valamint rövidtávú lárvanevelési vizsgálat eredményeiből levonható következtetések

Üzemi körülmények között teszteltem a csukasperma mélyhűtéséhez adaptált három különböző fagyasztási technika alkalmazhatóságát. A szakirodalom eddig csak laboratóriumi, alacsony ikra és/vagy kis volumenű mélyhűtött csukasperma felhasználását és vizsgálatait mutatta be (BABIÁK et al. 1995, 1997, 1999; GLOGOWSKI et al. 1997; LAHNSTEINER et al. 1998.; LAHNSTEINER & MANSOUR 2008; DZYUBA et al. 2010; ZHANG et al. 2011; DIETRICH et al. 2016; CEJKO et al. 2016, 2020b; KRISTAN et al. 2020). A mélyhűtött sperma gyakorlati alkalmazásának sikeressége a termékenyülési és kelési eredményekben mutatkozik meg. Az egzakt kelési arány megállapítása érdekében nem távolítottam el a Zuger-üvegekből a penészes és elpusztult ikraszemeket, valamint a keltetési vízhőmérséklet külső tényezők miatt szintén nem volt ideális (BONDARENKO et al. 2015b; POSPISILOVA et al. 2019) amely tényezők hatására SZABÓ (2016b) publikációjához hasonlóan nagymértékű ikrapusztulást jegyeztem fel. A kelési eredményekben nem tapasztaltam szignifikáns különbség a kontroll és kezelt csoportok értékei között. Az alacsony termékenyülési és kelési eredményekre feltételezhetően magyarázatot adhat továbbá: az ikra alacsonyabb

minősége, az ivartermékek kinyerése és felhasználása között eltelt ideje (KRISTAN et al. 2020), vagy esetlegesen friss spermához képest a mélyhűtött spermából nagyobb mennyiséget kell felhasználni a termékenyítés során (HOAR et al. 1983).

Ismereteim szerint nem állnak rendelkezésre nagy mennyiségben mélyhűtött csukaspermából származó lárvák fejlődéstani vizsgálati eredményeit bemutató publikációk. . A lárvanevelési kísérletem során, feltételezhetően a kelést követően a deformált egyedek elpusztulhattak és emiatt rögzítettem szignifikánsan kevesebb fejlődési rendellenességet mutató egyedet a nem-táplálkozó lárvaszakasz végén és az 5 napos táplálkozó lárvakorban. Az egyes mintavételek során nem tapasztaltam statisztikailag igazolható különbséget friss és mélyhűtött csoportok fejlődési rendellenességeinek arányai között. Eredményeim bizonyítják, az általam alkalmazott mélyhűtési módszerek nincsenek negatív hatással a lárvák morfológiai elváltozásaira sem. A 10 napos nevelési kísérlet során a vizsgált fejlődési periódusban (közvetlen kelés után, nem-táplálkozó lárvaszakasz vége (kísérlet 5. napja), 5 napos táplálkozó lárvá) nem tapasztaltam a spermamélyhűtésre visszavezethető negatív hatást sem a lárvák növekedési értékeiben, sem a megmaradásban. A mélyhűtött csoportok nemhogy elmaradnak, egyes esetekben felülmúlják a kontroll csoport eredményeit is. Hasonló eredményről számoltak be mélyhűtött spermával termékenyített lárvák rövidtávú nevelése során BOKOR et al. (2015) harcsával és LIU et al. (2015) atlanti laposhallal (*Hippoglossus hippoglossus*) végzett kísérleteikben

4.2. Javaslatok

Javaslat a csukaszaporításra vonatkozóan:

- A sperma kinyeréséhez javaslom a hormonális indukciót és a here kioperálását.

Javaslatok a csukasperma mélyhűtésére vonatkozóan:

- A spermamélyhűtéshez javaslom a munkám során kidolgozott glükózalapú hígító (150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH $8 \pm 0,02$) és 10% metanol védőanyag alkalmazását.
- Javaslom az 5 ml-es műszalma mélyhűtését polisztirol dobozban és programozható fagyasztó berendezésben egyaránt, valamint a 10 ml-es kriocső mélyhűtését programozható fagyasztó berendezésben, amennyiben ennek technikai feltételei rendelkezésre állnak (pl. áramforrás).
- A magasabb spermium sejtsűrűség és mélyhűtési volumen elérésének érdekében javaslom a 10 ml-es kriocső 1:3 (sperma:hígító) hígítási arányának tesztelését programozható fagyasztó berendezésben, csukaszaporítási kísérlet során.
- Javaslom a 10 ml-es kriocső 3 perces felolvasztási időtartamának alkalmazását 40 °C-os vízhőmérséklet mellett.
- Javaslom egy olyan egységesített technológia kidolgozását (műszaki fejlesztést), amellyel egyszerre több nagyméretű műszalma, vagy kriocső is felolvasztható.
- Javaslom a tenyésztési célra is elérhető, nagy úrtartalmú eszközben mélyhűtött csukasperma génbanki tárolásának megalapozását.
- Javaslom a mélyhűtött spermából származó csukalárvák hosszabb távú fejlődéstani vizsgálatát (például: teljes ivadéknevelési- és éves tavi nevelési periódus).

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam egy specifikusan a csukasperma mélyhűtéséhez alkalmas hígító oldatot, melynek összetétele a következő: 150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH $8 \pm 0,02$).

2. Sikeresen alkalmaztam a csukasperma fagyasztására az 5 ml-es műszalmában történő mélyhűtés módszerét polisztirol dobozban és programozható fagyasztó berendezésben egyaránt.

3. Sikeresen kifejlesztettem a 10 ml-es kriocső használatának technológiáját a programozható fagyasztó berendezéshez. Optimalizáltam a csukasperma fagyasztását 1:9 hígítási arány alkalmazásával, valamint a 10 ml-es kriocső felolvasztását 3 perc időtartamban, 40°C vízhőmérsékleten.

4. Sikeresen szaporítottam csukát keltetőházi körülmények között nagy mennyiségben mélyhűtött spermával 5 ml-es műszalma alkalmazásával polisztirol dobozban és programozható fagyasztó berendezésben, valamint 10 ml-es kriocsővel programozható fagyasztó berendezésben, ami lehetőséget ad az üzemi méretű, keltetőházi alkalmazásra.

5. Csukánál elsőként vizsgáltam a friss és három különböző nagy mennyiségű mélyhűtési módszerrel fagyasztott spermából (5 ml-es műszalma polisztirol dobozban és programozható fagyasztó berendezésben, 10 ml-es kriocső programozható fagyasztó berendezésben) származó lárvák növekedési paramétereit, fejlődési rendellenességeinek előfordulását a megmaradást. Kísérleteim alapján kijelenthető, hogy az általam kidolgozott spermamélyhűtési módszer nincs negatív hatással a lárvák növekedésére, morfológiai rendellenességeinek előfordulásaira, valamint a megmaradásra a vizsgált lárvafejlődési szakaszokban, azaz a kelést követő első 10 napban.

6. A SZERZŐNEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓI

6.1. Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Gergely Bernáth, Zsolt Csenki, Zoltán Bokor, Levente Várkonyi, **József Molnár**, Tamás Szabó, Ádám Staszny, Árpád Ferincz, Krisztián Szabó, Béla Urbányi, Lilianna Olimpia Pap, Balázs Csorbai (2018): The effects of different preservation methods on ide (*Leuciscus idus*) sperm and the longevity of sperm movement. *Cryobiology* 81, p. 125–131.

Zoltán Bokor, Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, **József Molnár**, Zete Levente Láng, Zsófia Tarnai-Király, Enikő Solymosi, Béla Urbányi (2019): The Applicability Of Large-Scale Sperm Cryopreservation In Wels Catfish (*Silurus Glanis*) Optimized For Hatchery Practice. *Aquaculture* 506, p. 337-340.

Levente Várkonyi, Zoltán Bokor, **József Molnár**, Ferenc Fodor, Zsolt Szári, Árpád Ferincz, Ádám Staszny, Levente Zete Láng, Balázs Csorbai, Béla Urbányi, Gergely Bernáth (2019): The comparison of two different extenders for the improvement of large-scale sperm cryopreservation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Reproduction In Domestic Animals* 54(3) p. 639-645.

József Molnár, Zoltán Bokor, Levente Várkonyi, Tibor Izsák, Enikő Füzes-Solymosi, Levente Zete Láng, Balázs Csorbai, Zsófia Tarnai-Király, Béla Urbányi, Gergely Bernáth (2020): The systematic development and optimization of large-scale sperm cryopreservation in northern pike (*Esox lucius*), *Cryobiology* 94, 26-31.

Bernadett Pataki, Ákos Horváth, Gergely Mészáros, Nevena Kitanovic, András Ács, Árpád Hegyi, **József Molnár**, Balázs Csorbai, Béla Urbányi (2022): Adjustment of common carp sperm concentration prior to cryopreservation: Does it matter? *Aquaculture Reports*, 24, 101109.

Gergely Bernáth, Balázs Csorbai, Borbála Nagy, Endre Csókás, **József Molnár**, Tamás Bartucz, Zete Levente Láng, Márk Gyurcsák, Árpád Hegyi, Júlia Kobolák, Jeffrey Daniel Griffiths, Árpád Ferincz, Béla Urbányi, Zoltán Bokor (2023): The investigation of post-thaw chilled storage and the applicability of large-scale cryopreservation in chub (*Squalius cephalus*) sperm. *Cryobiology* 113, paper: 104588, 1-9 p.

Zoltán Bokor, Zete Levente Láng, Levente Várkonyi, Ferenc Fodor, Borbála Nagy, Endre Csókás, **József Molnár**, Balázs Csorbai, Zsolt Csenki-Bakos, Bence Ivánovics, Jeffrey Daniel Griffiths, Béla Urbányi, Gergely Bernáth (2023): The growth performance of pond-reared common carp (*Cyprinus carpio*) larvae propagated using cryopreserved sperm. Fish Physiology and Biochemistry, paper: 3440158, 11-12. p.

Borbála Nagy, Balázs Csorbai, Levente Várkonyi, Ádám Staszny, **József Molnár**, Zete Levente Láng, Tamás Bartucz, István Ittész, Béla Urbányi, Zoltán Bokor, Gergely Bernáth (2024): Comparative study on the gamete quality, artificial propagation and larval development of common goldfish, shubunkin, black moor, and oranda variants of goldfish (*Carassius auratus*). Aquaculture 582, paper 740502, 1-10. p.

Zoltán Bokor, Ferenc Fodor, Levente Várkonyi, Borbála Nagy, Zete Levente Láng, Árpád Ferincz, Ádám Staszny, **József Molnár**, Kinga Katalin Lefler, Balázs Csorbai, Zoltán Vancsura, Zsolt Szári, Béla Urbányi, Gergely Bernáth (2024): Biological Parameters and Spermatogenesis in Razorfish (*Pelecus cultratus*) Population Inhabiting the Largest Shallow Lake of Central Europe (Lake Balaton): Studies for In Vitro Conservation Purposes. Aquaculture, paper: 6695280, 1-8 p.

6.2. Hazai folyóiratban megjelent közlemények

Levente Várkonyi, Zoltán Bokor, Árpád Ferincz, Ádám Staszny, Ferenc Fodor, Zsolt Szári, Béla Urbányi, **József Molnár**, Gergely Bernáth (2019): The applicability of 10 ml cryotubes for sperm cryopreservation in a Hungarian carp landrace (*Cyprinus carpio carpio morpha acuminiatus*). Agrártudományi Közlemények/Acta Agraria Debreceniensis, 75. p. 5., 93-97.

Molnár József, Várkonyi Levente, Füzes-Solymosi Enikő, Birkó-Sulyok Zita Katalin, Izsák Tibor, Láng Levente Zete, Csenki-Bakos Zsolt, Staszny Ádám, Urbányi Béla, Bernáth Gergely, Bokor Zoltán (2020): Mélyhűtött csuka (*Esox lucius*) spermából származó lárvák különböző növekedési és morfológiai paramétereinek vizsgálata rövidtávú lárvanevelés során. Animal welfare, ethology and housing systems, (16)2 p. 146-155.

Nagy Borbála, Várkonyi Levente, Fodor Ferenc, Koltai Tamás, Bodnár Ádám, **Molnár József**, Láng Levente Zete, Izsák Tibor, Staszny Ádám, Ferincz Árpád, Birkó-Sulyok Zita Katalin, Urbányi Béla, Szári Zsolt, Bokor Zoltán, Bernáth Gergely, 2020.: A balatoni kőszüllő (Sander

volgensis, Gmelin, 1788) állomány hímivarsejt minőségének és mélyhűtésének vizsgálata az indukált szaporítás fejlesztése és a génbanki megőrzés céljából. ANIMAL WELFARE, ETOLÓGIA ÉS TARTÁSTECHNOLÓGIA (16)2 pp. 163-169.

Borbála Nagy, Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, **József Molnár**, Levente Zete Láng, Tibor Izsák, Tamás Bartucz, István Ittzés, Áron Ittzés, Béla Urbányi, Zoltán Bokor (2022): The comparison of sperm motility and density in four different goldfish (*Carassius auratus*) types. Agrártudományi Közlemények/Acta Agraria Debreceniensis, 2022. No. 1., pp. 135-140.

Szabó Tamás, **Molnár József**, Müller Tamás, Nyitrai Márk, Tóth Gábor, Ugrai Zoltán, Szabó Krisztián, Urbányi Béla (2022): Csukaikra termékenyítéséhez szükséges sperma mennyiségének meghatározása keltetőházi szaporítás során. Halászat-Tudomány, 8(2): pp. 14-18.

6.3. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

6.3.1. Előadások

Gergely Bernáth, Zsolt Csenki-Bakos, Zoltán Bokor, Levente Várkonyi, **József Molnár**, Alexandra Kajtár, Tamás Szabó, Ádám Staszny, Árpád Ferincz, Krisztián Szabó, Béla Urbányi, Balázs Csorbai (2017): The effects of different preservation methods on Ide (*Leuciscus idus*) sperm and the longevity of sperm movement. 6th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Czech Republic, České Budějovice, 2017. September 4-7. Kivonat p. 81.

József Molnár, Levente Várkonyi, Béla Urbányi, Enikő Solymosi, Zita Katalin Birkó-Sulyok, Tibor Izsák, Levente Zete Láng, Gergely Bernáth, Zoltán Bokor (2018): The development of a new large-scale sperm cryopreservation method in northern pike (*Esox lucius*). Seventh International Young Researchers' Conference of NACEE, Gorki, Belarus, 2018. december 11-14. Kivonat. p. 4.

Levente Várkonyi, Zoltán Bokor, **József Molnár**, Ferenc Fodor, Zsolt Szári, Árpád Ferincz, Ádám Staszny, Zita Birko-Sulyok, Levente Zete Láng, Balázs Csorbai, Béla Urbányi, Gergely Bernáth (2018): The comparison of two different extenders and the improvement of large-scale sperm cryopreservation in common carp (*Cyprinus carpio*). Seventh International Young Researchers' Conference of NACEE, Gorki, Belarus, 2018. december 11-14. Kivonat. p. 4.

6.3.2. Posztterek

Zoltán Bokor, **József Molnár**, Árpád Ferincz, Levente Várkonyi, Zsolt Szári, Ferenc Fodor, Tibor Tulipán, Gábor Nagy, Béla Urbányi, Gergely Bernáth (2017): Investigation of male maturation out-of- and during the spawning season in Sichel (*Pelecus cultratus*). 6th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Czech Republic, České Budějovice, September 4-7. Abstract book p. 94.

Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, Előd Szanati, **József Molnár**, Alexandra Kajtár, Solymosi Enikő, Béla Urbányi, Zoltán Bokor (2017): Practical improvement of Pike (*Esox lucius*) sperm cryopreservation. Aquaculture Europe '17 Dubrovnik, Croatia, October 16-20, 2017. Abstract book p. 101-102.

Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, Ferenc Fodor, **József Molnár**, Kajtár Alexandra, Árpád Ferincz, Ádám Staszny, Béla Urbányi, Zsolt Szári, Tibor Tulipán, Gábor Nagy, Gergely Boros, András Specziár, Zoltán Bokor (2017): Sex ratio and ichthyological parameters in Sichel (*Pelecus cultratus*) caught out-of- and during the spawning season. Aquaculture Europe '17 Dubrovnik, Croatia, October 16-20, 2017. Abstract book p. 103-104.

Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, **József Molnár**, Enikő Solymosi, Béla Urbányi, Zoltán Bokor (2018): The optimization of the large-scale cryopreservation and the motility assessment in wels catfish (*Silurus glanis*) sperm. 8th International Water and Fish Conference, Conference Proceedings, Serbia, Belgrade, June 13-15., Abstract book p. 144-147.

Zoltán Bokor, Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, **József Molnár**, Tamás Szabó, Béla Urbányi, Balázs Csorbai (2018): The development of an innovative technology for carnivorous fish production that fits well in the traditional production environment. 8th International Water and Fish Conference, Conference Proceedings, Serbia, Belgrade, June 13-15., Abstract book p. 214-216.

József Molnár, Zoltán Bokor, Levente Várkonyi, Solymosi Enikő, Béla Urbányi, Gergely Bernáth (2018): The methodical improvement and large-scale cryopreservation of northern pike (*Esox lucius*) sperm. 8th International Water and Fish Conference, Conference Proceedings, Serbia, Belgrade, June 13-15., Abstract book p. 237-240.

Levente Várkonyi, **József Molnár**, Ádám Staszny, Ádám Ferincz, Zoltán Bokor, Béla Urbányi, Gergő Németh, Gergely Bernáth (2018): The comparison of two hormonal induction method in the Heviz carp (*Cyprinus carpio carpio morpha hungaricus*). 8th International Water and Fish Conference, Conference Proceedings, Serbia, Belgrade, June 13-15., Abstract book p. 272-275.

Levente Várkonyi, **József Molnár**, Zete Levente Láng, Árpád Ferincz, Ádám Staszny, Ferenc Fodor, Zsolt Szári, Béla Urbányi, Zoltán Bokor, Gergely Bernáth (2018): Methodical improvement of sperm cryopreservation in a hungarian common carp landrace (*Cyprinus Carpio Carpio Morpha Accuminatus*) In: Aqua 2018: #We R Aquaculture, Abstract book p. 774.

Borbála Nagy, Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, **József Molnár**, Levente Zete Láng, Tibor Izsák, Tamás Bartucz, István Ittész, Áron Ittész, Béla Urbányi, Zoltán Bokor (2021): The comparison of sperm motility and density in four different goldfish (*Carassius auratus*) types. Aquaculture Europe, Funchal, Madeira, October 4 – 7, 2021., Abstract book p. 859.

Gergely Bernáth, Levente Várkonyi, Balázs Csorbai, Levente Zete Láng, **József Molnár**, Tamás Bartucz, Borbála Nagy, István Lehoczky, Gergely Szabó, Béla Urbányi, Zoltán Bokor (2021): The improvement of sperm cryopreservation methods in the endemic tench (*Tinca tinca*) and crucian carp (*Carassius carassius*) for conservation purposes. Aquaculture Europe, Funchal, Madeira, October 4 – 7, 2021., Abstract book p. 140-141.

Tamás Szabó, **József Molnár**, Márk Nyitrai, Gergely Tóth, Zoltán Ugri, Krisztián Szabó, Béla Urbányi (2021): Determination of the quantity of sperm required for the fertilization of northern pike (*Esox lucius*) eggs during hatchery breeding. Aquaculture Europe, Funchal, Madeira, October 4 – 7, 2021., Abstract book p. 1263-1264.

6.4. Hazai konferencia kiadványban megjelent közlemények

6.4.1. Előadások

Molnár József, Békési Richárd, Várkonyi Levente, Csorbai Balázs, Csenki-Bakos Zsolt, Müller Tamás, Szabó Tamás, Urbányi Béla (2019): A népesítési sűrűség növekedésre és megmaradásra gyakorolt hatásának vizsgálata a márna (*Barbus barbus*) intenzív rendszerben történő előnevelése során. VII. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap, Gödöllő, 2019. november 22., Kivonat p. 53.

Molnár József, Várkonyi Levente, Füzes-Solymosi Enikő, Birkó-Sulyok Zita Katalin, Izsák Tibor, Láng Levente Zete, Csenki-Bakos Zsolt, Staszny, Ádám, Urbányi Béla, Bernáth Gergely, Bokor Zoltán (2019): Mélyhűtött csuka (*Esox lucius*) spermából származó lárvák különböző növekedési és morfológiai paramétereinek vizsgálata rövidtávú lárvanevelés során. VII. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap, Gödöllő, 2019. november 22., Kivonat p. 54.

Nagy Borbála, Várkonyi Levente, Fodor Ferenc, Koltai Tamás, Bodnár Ádám, **Molnár József**, Láng Levente Zete, Izsák Tibor, Staszny Ádám, Birkó-Sulyok Zita Katalin, Urbányi Béla, Szári Zsolt, Bokor Zoltán, Bernáth Gergely (2019): A balatoni kősüllő (*Sander volgensis*) állomány hímivarsejt minőségének és mélyhűtésének vizsgálata az indukált szaporítás fejlesztése és a génbanki megőrzés céljából. VII. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap, Gödöllő, 2019. november 22., Kivonat p. 55.

Molnár József, Várkonyi Levente, Urbányi Béla, Solymosi Enikő, Birkó-Sulyok Zita Katalin, Izsák Tibor, Láng Levente Zete, Bernáth Gergely, Bokor Zoltán (2018): Csuka (*Esox lucius*) sperma üzemi mélyhűtési technológiájának kidolgozása. XXVIII. Óvári Tudományos Napok, 2018.11.09-10. Kivonat p. 151.

Várkonyi Levente, Bokor Zoltán, Ferincz Árpád, Staszny Ádám, **Molnár József**, Birkó-Sulyok Zita, Láng Levente Zete, Juhász Vera, Fodor Ferenc, Szári Zsolt, Urbányi Béla, Bernáth Gergely (2018): A hévízi törpenövésű magyar vadponty (*Cyprinus carpio morpha Hungaricus*), valamint a balatoni sudár ponty (*Cyprinus carpio Morpha acuminiatus*) szaporodásbiológiájának vizsgálata és in vitro spermabankjának létrehozása. XXVIII. Óvári Tudományos Napok, 2018.11.09-10. Kivonat p. 154.

Pataki Bernadett, Staszny Ádám, Mészáros Gergely, Kitanović Nevena, Ács András, Hegyi Árpád, **Molnár József**, Csorbai Balázs, Urbányi Béla, Horváth Ákos (2022): Morfológiai változások pontyban (*Cyprinus carpio*): befolyásolja-e az utódok külalakját a mélyhűtött spermával történő termékenyítés? XLVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2022. május 25-26. Kivonat p. 61-64.

6.4.2. Posztterek

Bernáth Gergely, Daniel Zarski, Csorbai Balázs, Várkonyi Levente, Varjú Milán, **Molnár József**, Szilágyi Gábor, Sziráki Bence, Uros Ljubobratovic, Péter Géza, Rónyai András, Urbányi Béla, Müller Tamás (2018): Intenzív nevelő telepekből származó süllők spermatermelésének vizsgálata. XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás. Szarvas. 2018. május 30-31. Kivonat p. 41.

Molnár József, Bernáth Gergely, Várkonyi Levente, Solymosi Enikő, Urbányi Béla, Bokor Zoltán (2018): A csuka (*Esox lucius*) sperma mélyhűtésének gyakorlati szempontú fejlesztése. XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2018. május 30-31. Kivonat p. 57-58.

Molnár József, Várkonyi Levente, Solymosi Enikő, Birkó-sulyok Zita Katalin, Izsák Tibor, Láng Levente Zete, Csenki-Bakos Zsolt, Urbányi Béla, Bernáth Gergely, Bokor Zoltán, (2019): Mélyhűtött spermából származó csukalárvák (*Esox lucius*) vizsgálata különböző növekedési paraméterek alapján. XLIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2019. május 29-30. Kivonat p. 108-109.

Nagy Borbála, Bernáth Gergely, Várkonyi Levente, Fodor Ferenc, Koltai Tamás, Bodnár Ádám, **Molnár József**, Láng Levente Zete, Izsák Tibor, Staszny Ádám, Ferincz Árpád, Birkó-Sulyok Zita Katalin, Urbányi Béla, Szári Zsolt, Bokor Zoltán (2020): A balatoni kősüllő (*Sander volgensis*) hímivarsejt minőségének és mélyhűtésének vizsgálata. XLIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2020. szeptember 23-24. p. 111-115.