



A HALSPERMA MÉLYHÚTHETŐSÉGÉNEK ÖRÖKLŐDÉSE

DOI: 10.54598/003990

Doktori (PhD) értekezés

Pataki Bernadett

Gödöllő

2023

A doktori iskola megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

alprogram: Halbiológia és Halgazdálkodás

vezetője: Dr. Mézes Miklós (D.Sc.) egyetemi tanár, az MTA rendes tagja a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezetők: Dr. Horváth Ákos (D.Sc.) tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Zemenné Dr. Kollár Tímea (Ph.D.)

.....

Dr. Mézes Miklós iskolavezető jóváhagyása

.....

Dr. Horváth Ákos
témavezető jóváhagyása

.....

Zemenné Dr. Kollár Tímea
témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	3
1.1	Célkitűzés.....	4
2	Irodalmi áttekintés.....	5
2.1	A vizsgálatba bevont fajok.....	5
2.1.1	A ponty.....	5
2.1.2	A zebradánió.....	5
2.2	Halak szaporodásbiológiája.....	6
2.2.1	A here típusai és szerkezete.....	7
2.2.2	Spermatogenezis.....	7
2.2.3	A spermiumok felépítése.....	8
2.2.4	Spermiumok aktiválása.....	9
2.2.5	A spermiumok mozgásának biológiai háttere.....	10
2.2.6	A sperma összetétele.....	11
2.2.7	A halsperma kinyerése és a spermiumok mozgására ható tényezők.....	11
2.3	A mélyhűtés.....	12
2.3.1	A mélyhűtés eredete.....	12
2.3.2	A mélyhűtés biológiája.....	12
2.3.3	A halsperma mélyhűtése.....	13
2.3.4	A halsperma felolvasztása.....	17
2.3.5	A ponty spermájának mélyhűtése és felolvasztása.....	18
2.3.6	A zebradánió spermájának mélyhűtése és felolvasztása.....	19
2.3.7	A mélyhűtés hatásai.....	20
2.4	Számítógépes spermavizsgáló rendszer (CASA- Computer Assisted Sperm Analysis) 22	
2.5	A sejtdenzitás mérése.....	24
2.6	Morfometria.....	25
2.7	Morfometriai változások halakban.....	27
3	Anyag és módszer.....	29
3.1	Halak tartási körülményei.....	29
3.1.1	Ponty.....	29
3.1.2	Zebradánió.....	31
3.2	Halak kezelése a vizsgálatok előtt.....	32
3.3	Generációk létrehozása.....	33
3.3.1	Pontyok szülői nemzedékének (P) kialakítása.....	33
3.3.2	A pontyok első generációjának (F1) létrehozása.....	34

3.3.3	A pontyok második generációjának (F2) létrehozása	34
3.3.4	Szülői (P) zebradániók kiválogatása	35
3.3.5	Zebradániók első generációjának (F1) létrehozása	35
3.3.6	Zebradániók második generációjának (F2) létrehozása	35
3.3.7	Zebradániók harmadik generációjának (F3) létrehozása	36
3.4	Sperma gyűjtése, vizsgálata, mélyhűtése, termékenyítés	37
3.4.1	Ponty.....	37
3.4.2	Zebradánió.....	37
3.5	Sperma koncentráció vizsgálata, illetve koncentráció szerinti mélyhűtése	38
3.6	Spektrofotométerrel mért sejtdenzitás	39
3.7	CASA-val mért sejtkoncentráció	39
3.8	Sejtdenzitás és a mélyhűtés eredményessége közötti összefüggés	40
3.9	Morfológiai, testsúly és hossz különbségek meghatározása	40
3.10	Statisztikai analízis.....	41
4	Eredmények.....	42
4.1	Ponty	42
4.1.1	A ponty spermakonzentrációjának vizsgálata, illetve koncentráció szerinti mélyhűtése.....	42
4.1.2	A ponty első generációjának spermavizsgálata.....	45
4.1.3	A ponty második generációjának spermavizsgálata.....	47
4.1.4	A ponty második utódnemzedékének testhossz, illetve morfológiai különbségei ..	48
4.2	Zebradánió	50
4.2.1	Zebradánió első generáció (F1).....	50
4.2.2	Zebradánió második generáció (F2).....	53
4.2.3	Zebradánió harmadik generáció (F3)	54
5	Eredmények értékelése.....	56
6	Következtetések és javaslatok	58
7	Új tudományos eredmények.....	60
8	Összefoglalás.....	61
9	Summary	63
10	Köszönetnyilvánítás	65
11	Irodalomjegyzék.....	66

1 Bevezetés

Az első sikeres spermamélyhűtést Polge és munkatársai végezték 1949-ben szárazjégen, glicerin felhasználásával (Polge et al., 1949). A védőanyagok fontosságának felismerése után az ivarsejtmélyhűtésben robbanásszerű fejlődés indult el. A módszer célja a sejtek, szövetek megőrzése azáltal, hogy alacsony hőmérsékletre hűtik (-196 °C), majd folyékony nitrogénben tárolják azokat. Nagyon fontos kutatási területnek számít, amely által lehetővé vált a hímek és a nőstények térbeli és akár időbeli elválasztása a termékenyítés során. Előbb említett előnye mind gazdasági, mind pedig génmegőrzési célokat is szolgálhat (FAO, 2012).

Nem véletlen tehát, hogy szarvasmarha esetében a mesterséges termékenyítés önálló iparrá nőtte ki magát (Brackett, 1983). Halaknál is sok fajban fejlesztettek ki különböző spermamélyhűtési módszereket (Billard et al., 1995; Tiersch, 2000). A számos kutatás ellenére a halakon végzett spermamélyhűtés a mai napig nem terjedt el keltetőházi szaporítás gyakorlatában. Ennek több oka is lehet; a mélyhűtés viszonylag körülményes, időigényes, szakértelmet és olykor drága eszközöket is igényel, hiszen a mélyhűtés nem csak abból áll, hogy a sejteket, szöveteket folyékony nitrogénbe helyezik. Olyan szempontokat is figyelembe kell venni, mint a megfelelő védőanyag, hőmérséklet, fagyasztási idő, egyensúlyozási idő, stb.

A különböző védőanyagokat a fagyasztás előtt pontosan megválasztott egyensúlyozási idővel kell hozzáadni a mintához annak érdekében, hogy a megőrizni kívánt biológiai anyagok ne sérüljenek. A károsodásnak több oka is lehet, például a víz mennyiségének, ennek következtében pedig az ozmotikus nyomásnak a változása a sejtben. Ezt okozhatja a minták alacsony hőmérsékletre hűtése és felolvasztása is. Ezek a beavatkozások hatalmas stresszt okoznak a sejteknek, szöveteknek, azok el is pusztulhatnak. Sejtszelekció követheti tehát a mélyhűtést, ami befolyásolhatja a jövőbeli genetikai diverzitást is. Ezt felismervén elengedhetlenné vált nemcsak a fagyasztási módszerek tökéletesítése, hanem a mélyhűtés több aspektusból történő vizsgálata is.

A kutatásoknak természetesen elemét képezik az ivarsejtek minőségére gyakorolt hatások is. Halaknál jelenleg nincs lehetőség sem az ikra, sem pedig az embrió mélyhűtésére, ezért ezek a vizsgálatok kizárólag a spermamélyhűtésre korlátozódnak. Ezekben a kísérletekben általában figyelembe veszik a spermiumok motilitási paramétereit, alakját, esetleges sérüléseit, a DNS és a sejtszervecskék épségét, a flagellum meglétét, működését. További vizsgálatok tárgyát képezi a koncentráció szerinti mélyhűtés, a különböző védőanyagok használata, a mélyhűtési, illetve felolvasztási idő meghatározása, a hőmérséklet pontos feltérképezése. A vizsgálatok másik szegmense az utódgenerációk feltérképezése, amelyeknél arra keresik a választ, hogy a már előzetesen vizsgált spermiumokból milyen méretű, külsejű, stb. utódok fejlődnek. A cél annak megállapítása, hogy a mélyhűtés befolyásolja-e a következő generációk fenotípusát, illetve genotípusának megnyilvánulását.

Babai és munkatársai 2002-ben egy addig ismeretlen, a mélyhűtést által okozott hatást véltek felfedezni szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) esetében. Azt találták, hogy a mélyhűtött spermából származó egyedek mélyhűtött spermájának termékenyítőképesége felülmúlja a friss spermából született egyedeknél mért értékeket. A kutatók ezt esetlegesen egy eddig feltérképezetlen, a mélyhűtés által okozott epigenetikai módosulásnak tudták be.

1.1 Célkitűzés

Babiak és munkatársai (2002) kutatását alapul véve jelen dolgozat célja annak a megállapítása, hogy zebradánió (*Danio rerio*), illetve ponty (*Cyprinus carpio*) esetében, több generációt vizsgálva a mélyhűtött spermából született egyedek spermájának felolvasztás utáni motilitása és termékenyítő képessége jobb értékeket mutat-e a friss spermából származó teljes testvéreik spermájának felolvasztás utáni paramétereikhez képest. Célul tűztem ki továbbá annak vizsgálatát, hogy a mélyhűtés milyen hatást gyakorolhat az egyedek külső megjelenésére, vagyis morfometriájára. Előzetes kutatásaim során feltérképeztem a különböző generációk spermaminőségi paramétereit, majd ezekkel a mintákkal termékenyítve kívántam meghatározni pontyban a második generáció külalakjára gyakorolt hatást. A kutatómunkában természetesen helyet kapnak a különböző mélyhűtési eljárások tökéletesítésére szolgáló vizsgálatok, így a spermakonzentráció könnyű és gyors meghatározása, valamint a sejtdenzitás motilitásra, illetve termékenyítő képességre gyakorolt hatása, azonban jelen dolgozat legfőbb célja egy, a mélyhűtés során még nem feltérképezett hatás bemutatása.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A vizsgálatba bevont fajok

2.1.1 A ponty

A ponty (1. ábra) a sugarasúszójú halak (Actinopterygii) osztályába, a pontyalakúak (Cypriniformes) rendjébe, a pontyfélék (Cyprinidae) családjába és azon belül a Cyprininae alcsaládba tartozó faj (Kovács et al., 2018). Legújabb kutatások szerint Kelet-Ázsiából származik és ma ismert alfajai elterjedéstől függően alakultak ki (Zhao et al., 2020). Magyarországon a legjelentősebb halfajok közé tartozik, a tógazdasági haltermelés 80%-át adja (Országgyűlés hivatala, 2020).



1. ábra. A ponty (*Cyprinus carpio*). Saját felvétel.

2.1.2 A zebradánió

A zebradánió (2. ábra) a Sugarasúszójú halak (Actinopterygii) osztályába, a pontyalakúak (Cypriniformes) rendjébe, a pontyfélék (Cyprinidae) családján belül a Danioninae alcsaládba tartozó mindenevő halfaj, amely Kelet-Indiából származik (McCluskey és Postlethwait, 2014). Elterjedten használják laborállatként szaporasága, gyors ivarérése, kis termete és korai optikai áttetszősége miatt. Széleskörű humán kutatásokban használt modellállat, hiszen a zebradánió genomjához viszonyítva a humán gének 70%-a legalább egy ortológ egyezést mutat (Anderson és Ingham, 2003).



2. ábra. A zebradánió (*Danio rerio*). Csenki-Bakos Zsolt felvétele.

2.2 Halak szaporodásbiológiája

Az élőlények szempontjából a szaporodás jelenti a fajfenntartást, a szülőkre hasonlító utódok létrejöttét (Szabó et al., 2000). Fontos azonban, hogy az utódok genetikailag változékonyak legyenek, ezáltal tudjanak alkalmazkodni a külső környezeti feltételekhez. Erre pedig a számfelező sejtosztódás, vagyis a meiózis teremt lehetőséget. A haploid spermium és haploid petesejt fejlődése során a meiózis első profázisának zigotén fázisában rekombináció történik, az anafázisban pedig lezajlik a homológ kromoszómák szétválása és véletlenszerű elrendeződése. Ez a két jelenség és a termékenyülés során történő véletlenszerű összekapcsolódás teszi lehetővé az utódok szülőkhöz viszonyított és túlélést szolgáló genotípusos eltérését (Röhlich, 2014).

A sikeres szaporodáshoz számos külső és belső tényező szükséges. A belső tényezők közül megemlíthetjük a szaporodási szervek, vagyis ivarmirigyek meglétét, a gametogenezis, ezen belül a spermatogenezis és az ovogenezis során az ép ivarsejtek kialakulását. Fontos továbbá a szaporodási folyamatokat befolyásoló belső elválasztású mirigyek (hipotalamusz, hipofízis, pajzsmirigy) helyes működése, valamint a homeosztázis, vagyis a belső környezet dinamikus egyensúlya is. A külső környezeti tényezőknek is nagy szerep jut, hiszen bármely paraméter változása esetén (pl. hőmérséklet, pH, oxigén) a halak szervezete elsőként a belső egyensúly helyrehozására, majd megtartására törekszik, a szaporodásbiológiai folyamatok leállnak, a hal nem szaporodik, hanem túlél (Szabó et al., 2000).

Figyelembe kell venni azt is, hogy a halak változó testhőmérsékletű állatok. Ennek előnye, hogy az állandó testhőmérséklet fenntartására nem kell energiát fordítaniuk, ugyakkor hátránya, hogy az anyagcsere sebessége a környezeti hőmérséklet függvénye. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy a mérsékelt égövön élő halak többsége télen nem táplálkozik, nem növekszik és ebből kifolyólag nem is szaporodik, vagyis ezeknek a halaknak a szaporodási időszaka meghatározott időközönként zajlik (Csorbai & Urbányi, 2018). Ettől természetesen eltérő lehet az intenzív rendszerben, egész évben állandó hőmérsékleten tartott halak szaporítása/szaporodása.

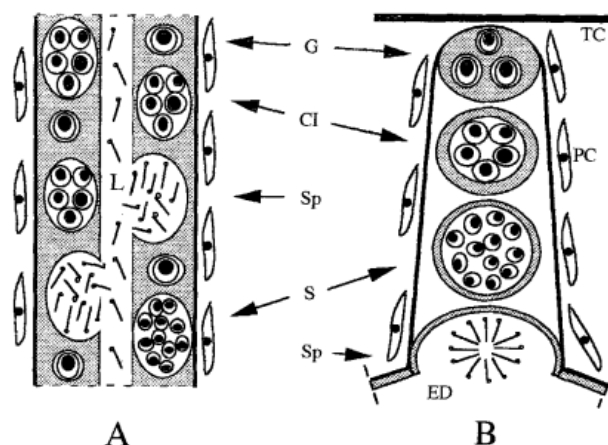
További fontos észrevétel, hogy a spermiumoknak nagyon kevés idő áll rendelkezésre a termékenyítéshez (Amanze & Iyengar, 1990), amely alatt károsodhatnak is. Sérülhetnek egyrészt az ozmotikus sokktól, amely a külvilágba kerülve éri a sejteket (Morisawa, 1985; Hart, 1990), másrészt pedig például az oxidatív stressztől (Dzyuba et al., 2015). Az emlősöktől eltérően, ahol a spermium az akroszóma és egyéb képletek segítségével hatol keresztül a petesejt zona pellucida rétegén, a halak (kivéve tokalakúak, lsd. 2.2 A spermiumok felépítése) spermiumán nem található akroszóma, ezért a petesejtbe való behatolás csak egy helyen, a mikropylén keresztül lehetséges. Az emlősök a kortikális reakció segítségével küszöbölik ki a polispermiás termékenyítést, amely halak esetében is nagy szerepet kap. Továbbá a petesejt aktiválódásával, vagyis duzzadásával járó mikropyle bezáródása gátolja meg ennek bekövetkezését, amely szintén lerövidíti a termékenyítési időt (Fehér & Kovács, 1973; Szabó et al., 2000).

2.2.1 A here típusai és szerkezete

A here két lebenyből álló, hosszúkás páros szerv, amely hosszanti irányban helyezkedik el a hasüreg háti részén (Szabó et al., 2000). Csontoshalak esetén a herének két fő típusát különböztethetjük meg, a csöves (tubuláris) és a lebenyes (lobuláris) herét.

A csöves here központjában nagyméretű üreget találunk, amelyből a here szélei felé sugárirányban csövek nyílnak (3. ábra). Ezekben a csövekben található a spermatogenezis fázisainak különböző stádiumában lévő hímivarsejtek, vagyis fejlődési sorrendben: az őszondósejtek, az A- és B típusú spermatogóniumok, az elsőrendű spermatociták, a másodrendű spermatociták, a spermatidák és végül az érett ondósejtek, vagyis a spermiumok. Ilyen here típus jellemző az eleveniszülő fogaspontyfajokra (Poecilidae).

A lebenyes herében ezzel ellentétben egy szerteágazó csőrendszerben fejlődnek a spermiumok és a csőrendszer bármely részén találkozhatunk változó fejlettségű hímivarsejtekkel (3. ábra). A gazdasági jelentőséggel (pl. ponty) bíró halfajainkra, illetve zebradánióra is ez a heretípus jellemző. A tubuláris herével rendelkező fajok spermatogenezise egész évben folyamatos, míg a lobuláris herével rendelkező fajok spermiumtermelését elsősorban az élőhely klimatikus viszonyai, illetve a víz hőmérséklete határozza meg, így ezekre a ciklikusság jellemző (Billard, 1986).



3. ábra. A here típusai. A: lobuláris here, B: tubuláris here, PC: peritubuláris sejtek, TC: kötőszövetes tok, ED: efferens csatornák, G: spermatogónium, CI: elsőrendű spermatocita, S: spermatida, Sp: érett spermium. Forrás: Loir et al., 1995.

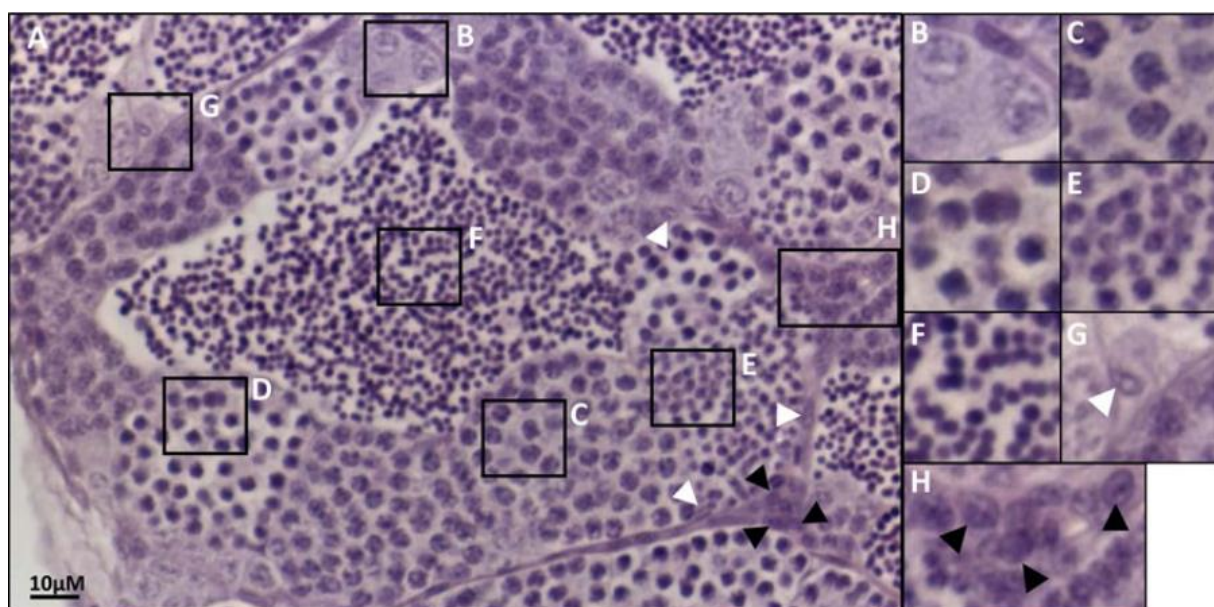
2.2.2 Spermatogenezis

A Witschi-féle, mára már bizonyított csírapálya elmélet szerint az állásos ősvarsejtek a szikzacskó falából vándorolnak az ivari redőkbe (plica genitalis), ahol az ivarszervek differenciálódása történik (Witschi, 1948). Hímek esetében az ivarérésig a kanyarulatot herecsatornák (tubuli seminiferi contorti) sejtek töltik ki. Ivarérést követően megindul a meiotikus sejtosztódás. A spermatogenezis különböző fázisában lévő sejtek a Sertoli-sejtekbe ágyazva, cisztákban fejlődnek. Az A-típusú spermatogóniumok mitotikusan folyamatosan osztódnak, belőlük alakulnak ki a B-típusú spermatogóniumok. Ezekből a sejtekből alakulnak ki a primer spermatociták. A Sertoli sejtek szoros sejtkapcsoló struktúrákkal (tight junction) kapcsolódnak egymáshoz, így védelmet nyújtanak a makrofágok ellen. A primer spermatocitákból alakulnak ki a sekunder spermatociták

(1n) és végül a spermaticidák (1n) is (Schulz et al., 2010; 4. ábra). Ezt a differenciálódást nevezzük citogenezisnek. Morfogenezis során kialakul a spermium, láthatóvá válik a flagellum, az elkülönült nyaki és feji rész, amelyeknek megfelelően fő-, vég- és középdarabot is megkülönböztethetünk (Fehér & Kovács, 1973, Billard 1990).

A Sertoli sejtek feladata nem merül ki a meiózison átesett sejtek makrofágoktól való védelmében. A feleslegessé vált sejttermeléket is képesek újrafelhasználni. Az emlősök Sertoli sejtjei a halakéhoz képest két különbséget is mutatnak. Egyrészt a halakban a Sertoli sejtek ivarérettség után is képesek osztódni (Schulz et al., 2005), másrészt pedig a Sertoli sejtek cisztákat képeznek, amelyekben belül ugyanolyan érési stádiumú sejtek fejlődnek (Schulz et al., 2010). Emlősöknél, ezzel ellentétben ugyanazon, védelmet biztosító Sertoli sejten belül különböző differenciálódáson átesett sejteket figyelhetünk meg.

A herében található még Leydig -féle interstitialis endokrin sejteket, amelyeknek feladata a hím nemi hormon, vagyis a tesztoszteron termelése. Ezek a sejtek a herecsatornák közötti laza kötőszövetes állományban, szabálytalan csoportokban foglalnak helyet (Harbert & Picon, 1984).



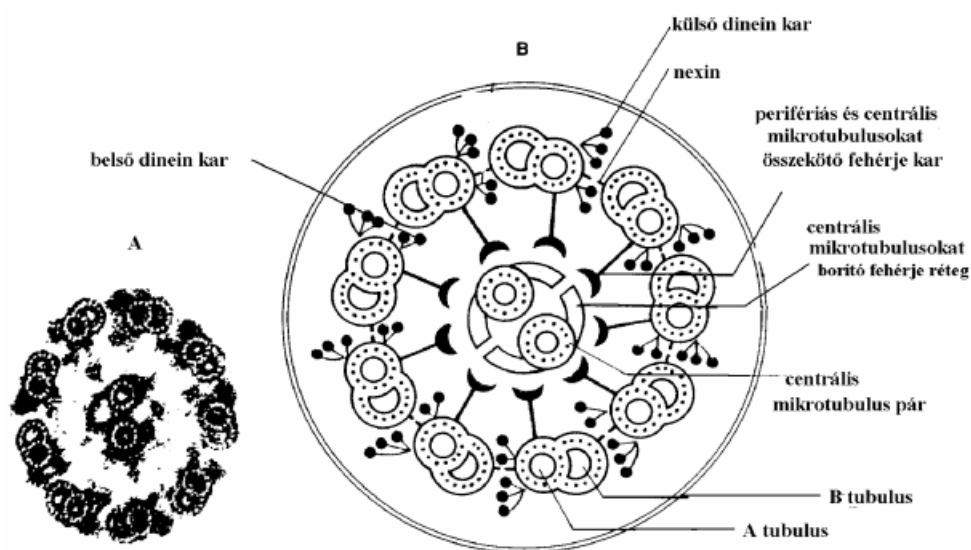
4. ábra. A here szövetei metszete különböző fejlődési stádiumban lévő hímivarsejtekkel. A: tubulus, B: spermatogonium, C: leptotén fázisban lévő elsőrendű spermatocita, D: zigotén fázisban lévő elsőrendű spermatocita, E: másodrendű spermatocita, F: spermium, G és fehér nyilak: Sertoli sejtek, H és fekete nyilak: Leydig -féle interstitialis sejtek. Forrás: Siegfried & Steinfeld, 2021.

2.2.3 A spermiumok felépítése

A spermiumoknak három fő részét különíthetjük el, a fejet, a nyakat és az ostort. A spermiumok felépítése és morfológiája azonban a megtermékenyítés módjának változatossága miatt halfajonként különbözik (Nagahama, 1983). A spermiumok feje lehet gömbölyű, elliptikus, mint például a ponty esetében vagy hosszúkás. A fej körülbelül 2 mikrométeres nagyságú, amely a farok tengelyéhez képest mindig oldalra eltolódva, vagyis excentrikusan helyezkedik el. A fejben találjuk az öröklődéshez szükséges apai DNS-t.

A fark tövénél, a nyaknál citoplazmatikus kitüremkedést találunk, amelyben a spermiumok mozgási energiáját biztosító mitokondriumok (2-10 db) találhatóak (Cosson, 2013; Csorbai & Urbányi, 2018). A mitokondriális DNS habár megtalálható a spermiumokban, az nem öröklődik tovább az utódokban, a mitokondriumokban kizárólag az anyától származó DNS-t találunk (DeLuca & O'Farrell 2012).

A spermiumok mozgása az ostor által lehetséges. A flagellum általában 30-60 mikrométeres (Mattei, 1991; Islam & Akhter, 2011), bazális testének mikrotubuláris elrendeződése a centriólumhoz hasonlóan 9×3-as szerkezetet mutat, amíg perifériás része 9×2-est, közepén 2 darab további struktúrával. Ezekhez (A-tubulus) rögzülnek a dineinkarok, amelyek elősegítik a flagellum mozgását (5. ábra). A mikrotubulusok tubulin fehérjéből felépülő, az eukarióta sejtek sejtvázáinak alkotói, amelyek elektronmikroszkópos képen csőszerű képletekként jelennek meg (Darvas & László, 2011).



5. ábra. Az ostor mikrotubulus rendszerének elrendeződése. Forrás: Darvas & László, 2011.

Fontos felhívni a figyelmet arra, hogy a tokalakúak (Acipenseriformes) megtartották ősi rendszertani bélyegüket, vagyis spermiumaik fején, épp úgy, mint emlősök esetében, akroszómát is megfigyelhetünk (Ciereszko et al., 2000). Ez más halfajoknál nem jellemző, ugyanakkor szívárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) egyedeinél a spermatogenezis egy korai stádiumában akroszómaszerű vakuólumot lehet megfigyelni a sejtek fején, amely az érett spermiumban már nincs jelen (Billard, 1983). Az akroszóma emlősöknél a spermium áthatolását segíti a petesejt zona pellucida rétegén, azonban funkciója tokhalak esetében egyelőre nem tisztázott (Fehér & Kovács, 1973; Pšenička et al., 2010).

2.2.4 Spermiumok aktiválása

Az emlősök, illetve hüllők spermiumai már a szemínális traktusban aktiválódnak és víz hatására immobilizálódnak (Krasznai et al., 1995). A halak hímivarsejtjeinek mozgásához ezzel szemben elengedhetetlen a víz jelenléte. A spermiumok mozgását élőhelytől függően az ozmotikus nyomás csökkenése (édesvízi halfajok esetében), illetve növelése (tengeri halak esetében) is elindíthatja

(Alavi & Cosson, 2006), valamint különbséget tehetünk a lazacfélék spermiumainak aktiválása tekintetében is.

Az édesvízi fajok többségében, például a pontyfélékben a mozgás kiváltója a hipotóniás közeg. A szeminális plazma ozmotikus nyomása fajtól függően 250-300 mOsmol/kg között változhat. Ez azt jelenti, hogy egy édesvízi hal spermiumának aktiválásához a spermát egy ennél kisebb ozmolaritással rendelkező közegbe kell helyezni. A sperma előzőleg immobilizáló oldatba kerülése sem befolyásolja a hipotonikus közegben való aktivációt.

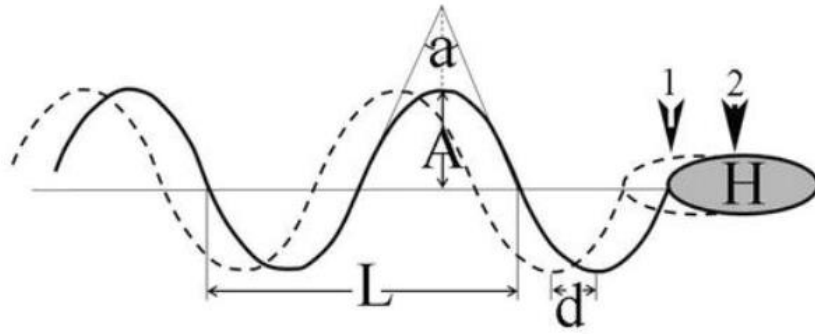
Pontyfélék esetében a pH is hatással lehet a motilitásra (Márián et al., 1997). A lazacfélék spermiumát pedig a K^+ ionok immobilizálják, így például kalcium-kloridot adva a hígítóhoz a sejtek mozgásnak indulnak a hipertóniás közeg ellenére is (Morisawa et al., 1983).

Tengeri halfajok esetében azt fedezték fel, hogy a mozgás kiváltásához nem feltétlenül elegendő a magasabb ozmolaritású közeg (Morisawa & Suzuki, 1980), hanem ovariális folyadékra is szükség van (Morisawa et al., 1992). Tengeri halak spermiumai általában hosszabb ideig mozognak, mint az édesvízi halaké (Cosson et al., 2008). Például az európai angolna (*Anguilla anguilla*; Gibbons et al., 1985), illetve a tengeri angolna (*Conger conger*; Cosson et al., 2008) egyes hímivarsejtjei akár 30 percig is képesek változatlanul megőrizni motilitási értékeiket, míg az édesvízi halak hímivarsejtjei általában csupán 0,5-2 percig maradnak mozgásban (Cosson, 2010).

2.2.5 A spermiumok mozgásának biológiai háttere

A spermiumok mozgásában a pH épp olyan nagy jelentőséggel bír, mint maga az ozmolaritás, hiszen ez a két tényező depolarizálja a sejtmembránt, amely által stimulálódik a motilitás (Morisawa és Suzuki, 1980; Morisawa et al., 1983). A pH csökkenése gátolja a motoros dinein (ld. 2.3 A spermiumok felépítése) fehérjék mozgását, ezáltal negatív hatással van az ostor mozgására. Ugyanakkor a Na^+/H^+ ioncsere is hatással lehet a spermiumok motilitására, amit az ozmotikus koncentráció határoz meg (Márián et al., 1997).

A spermium membránjában lévő K^+ csatornák nyílása és záródása hipoozmotikus közegben a plazmamembrán lokális hiperpolarizációját, illetve depolarizációját okozza. Ennek következtében a Ca^{2+} csatornák kinyílnak, Ca^{2+} beáramlás történik és az ostor mozogni kezd (Krasznay et al., 2000). A fej balról jobbra, az ostor pedig jobbról balra, hullámzóan mozog (6. ábra). Az egy másodperc alatt létrejövő hullámok számát nevezzük mozgási frekvenciának (Cosson, 2019). A spermiumok mozgásának ideje természetesen függ a bennük tárolt energiától (Billard & Cosson, 1990). Amint a sejteknek több energiára van szükségük, beindul a mitokondriális ATP szintézis (Cosson, 2013). Az intracellurális ATP csökkenése maga után vonja a motilitás lassulását (Perchech, 1995).



6. ábra. A spermium mozgása. L: hullámhossz, H: a spermium feje, A: fél hullám amplitúdója, a: hullám hajlítási szöge, 1-2: a fej elmozdulása, d: a fark elmozdulása. Forrás: Cosson, 2019.

2.2.6 A sperma összetétele

A hím egyedek által, a herében termelt sejtszuszpenziót nevezzük spermának. A sperma hímivarsejtekből és szemínális plazmából áll. A szemínális plazma egy olyan természetes médiumnak tekinthető, amely megfelelő környezetet biztosít a spermiumok hosszútávú tárolásához (Ciereszko et al., 2011). Azt találták, hogy a szemínális plazma eltávolítása befolyásolja a spermiumok termékenyítőképességét, így bebizonyosodott, hogy nem csak a spermiumok mozgását, tárolását segítő szerepe van (Maxwell et al., 2007; Ratto et al., 2011).

A szemínális plazmában találhatunk antioxidánsokat, például húgysavat (Ciereszko et al., 1999), szuperoxid-dizmutázt, glutation-reduktázt, katalázt, glutation-peroxidázt (Li et al. 2010; Martinez-Paramo et al. 2012) és a humorális immunválaszban szerepet játszó transferrint (Dietrich et al., 2010). Az emlősökkel ellentétben a halak spermája kevesebb fehérjét és egyéb szerves anyagot tartalmaz (pl. koleszterin, vitaminok, cukrok, lipidek, aminosavak). Ugyanakkor nagyobb mennyiségben található benne Na^+ , K^+ és Cl^- (Linhart et al., 1991). A spermában található ionok koncentrációja határozza meg annak ozmolaritását. Ozmométerrel mérve ez pontyfélék esetében 290-300 mOsmol/kg között változik (Alavi & Cosson, 2006).

2.2.7 A halsperma kinyerése és a spermiumok mozgására ható tényezők

Begyűjtés során figyelni kell, hogy a sperma ne szennyeződjön vizelettel, bélsárral, illetve ne érje víz, ami azonnal aktiválhatná. Fontos a minták azonnali jégre helyezése is (Billard et al., 1995; Agarval, 2011). A minták szennyezettsége a termékenyítőképességet is negatívan befolyásolhatja (Bokor et al., 2007).

Ajánlott a halak altatása a fejés megkezdése előtt. Ez történhet trikain-metilszulfonáttal (MS-222; Piironen, 1993), illetve 2-fenoxietanollal is (Perchech et al., 1995). Abdominális masszázst alkalmazva, a legjobb eredmény elérése érdekében, a hímekből kifejt sperma nem szennyezett, száraz edénybe fejhető (Bozkurt et al., 2005). Egyes halfajok, például zebraadánió esetében, tekintettel a kis méretre, mikroszkóp alatt, óvatos mozdulatokkal üvegkapillárisba fejkik ki az egyedekből a hím ivarterméket egy csipesz segítségével (Caetano et al., 2019).

A sperma minősége halfajonként eltérő lehet (Piironen, 1985), de nagymértékben befolyásolja a táplálék minősége, mennyisége, valamint a víz hőmérséklete is (Broomage & Roberts, 1995; Rurangwa et al., 2004; Billard & Cosson, 1988; Dadras et al., 2016a). Ponty esetében például a hőmérséklet csökkenése képes negatív hatást gyakorolni a motilitási értékekre (Dadras et al., 2016b). Az egyedek érettsége is hatással lehet a minőségi paraméterekre (Lahnsteiner et al., 1996). A már fentebb említett ovarialis folyadékról olyan hipotézisek is születtek, amelyek szerint a pH, az ionkoncentráció, vagy akár a hőmérséklet megváltoztatásával segíti a spermiumok mozgását (Eisenbach & Giojalas, 2006). Számos halfaj esetében bizonyítást nyert, hogy az ovarialis folyadék képes megnyújtani azt az időintervallumot, amelyben az ikra képes megtermékenyülni, illetve a spermium képes termékenyíteni (Lahnsteiner, 2002). Kekäläinen és Evans (2018) kutatásukban pedig rámutattak, hogy nem csak az ovarialis folyadéktól, hanem a spermium és az ikra közötti kémiai kommunikációtól is függ a termékenyülés sikeressége.

2.3 A mélyhűtés

2.3.1 A mélyhűtés eredete

A sperma mélyhűtés eredete egészen 1949-ig nyúlik vissza, amikor Polge és munkatársai glicerinnel segítségével, szárazjégen ($-79\text{ }^{\circ}\text{C}$) sikeresen mélyhűtötték baromfi spermát. A glicerinnel való használat fontos mérföldkő volt, hiszen felhívta a figyelmet az úgynevezett „védőanyagok” használatára. Egy évvel később, 1950-ben Smith és Polge sikerrel krioprezerváltak bikaspermát. Ettől kezdve robbanásszerű fejlődés indult meg a spermamélyhűtés tekintetében, olyannyira, hogy ma már külön iparágga nőtte ki magát a mélyhűtött spermával történő mesterséges termékenyítés.

2.3.2 A mélyhűtés biológiája

A mélyhűtés lényege a sejtek életfolyamatainak lelassítása, az életképességük hosszabbtávú megőrzése, anélkül, hogy bármilyen kár is keletkezne bennük. A krioprezervációt általában folyékony nitrogén segítségével végzik, amelynek forráspontja $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ezen az extrém alacsony hőfokon a víz kristályosodott, illetve amorf szilárd állapotban is jelen lehet (Mazur, 1984). Ha a víz $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on nem fagy meg, akkor beszélhetünk a túlhűlés jelenségéről. Ekkor központi jégkristályok képződhetnek, amelyek mentén indul el a kristályosodás (Mazur, 1990).

A különböző ionokat tartalmazó víz fagyáspontja valamivel $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt van. Ennek mértéke az oldott ionok milyenségétől és mennyiségétől is függ. Amikor egy ilyen oldatot hűtünk, először a vízmolekulák fagnak meg, megnövelve ezzel a maradék oldat koncentrációját, ezáltal csökkentve a fagyáspontját. A megnövekedett ozmotikus nyomás azonban szintén károsíthatja a sejteket (Mazur et al., 1972). Ezért a mélyhűtésnél az egyik legfontosabb tényező a sejt belsejében lévő víz mennyiségének csökkentése, olyan hígító alkalmazásával, amelynek az ozmotikus koncentrációja nem károsítja a biológiai anyagokat. A mélyhűtés során ugyanis nem a hőmérséklet csökkenése okozza a legnagyobb problémát, hanem a jégkristályok különböző konformációi (Mazur 1963, Willadsen 1977, Shaw et al., 2000).

A hűtési intenzitás befolyásolja azonban az intracelluláris, illetve extracelluláris jégkristályok formáját, típusát és méretét is (Cabrita et al., 2022). A túl nagy vízveszteség is károsíthatja a sejteket, ezért minden fagyasztani kívánt minta esetében a sejteknek megfelelő „arany középutat”

kell megtalálni. Léteznek például gyorsabb mélyhűtési módszerek (Kumar & Betsy, 2015), illetve lassabbak is (Viverios et al., 2000). Mindezeknél nagyon fontos, hogy elegendő időt hagyjunk az intracelluláris víz sejtekből történő kiáramlásához. A gyors mélyhűtés eredményeképpen túl sok víz maradhat a sejtek belsejében, a lassú eljárásokkal pedig pont ellentétes hatást érhetünk el. Mindkét véglet a megőrizni kívánt biológiai anyagok pusztulásával járhat (Cabrita et al., 2022). Fontos továbbá kiemelni, hogy a mélyhűtés során a membrán lipidjeinek fázisátalakulása is előidézhethet károsodásokat (Belous & Bondarenko, 1982).

A sejtek túlélése tehát függ a hűtés időintervallumától, a használt védőanyagok koncentrációjától, a sejtmembrán átjárhatóságától és a sejtek nagyságától. Általában a kisebb sejteket gyorsabban lehet hűteni, mivel nagyobb felületen érintkeznek a hígítóval, illetve a vízvesztés is gyorsabban megy végbe. Érdeemes tehát a sejtek méretét is figyelembe venni a megfelelő protokoll kiválasztása előtt.

2.3.3 A halsperma mélyhűtése

Halak esetében az első sikeres mélyhűtést Blaxter végezte 1953-ban, aki szárazjégen hűtött hering (*Clupea harengus*) spermát 12,5 %-os glicerin és tengervíz felhasználásával. Blaxter munkássága által a világ számos országában kezdtek el különböző halfajok spermájának mélyhűtését, illetve a mélyhűtés tökéletesítését. Olyannyira sikeres volt a kutatók munkája, hogy a 2000-es évig mintegy 200 halfaj spermamélyhűtési protokollját dolgozták ki (Billard et al., 1995; Tiersch, 2000), és számos spermabank épült a világ minden pontján (Harvey et al., 1998). Annak ellenére, hogy a halak spermamélyhűtése mintegy 70 éves múlttal rendelkezik, a mélyhűtött spermával történő termékenyítést inkább laboratóriumi körülmények között használják, csak elenyészve találkozhatunk a módszerrel keltetőházi szaporítás során (Tiersch, 2008; Cabrita et al., 2010). Ennek több oka is lehet, mint a drága eszközök, a szakértelem hiánya, a megtérülés kérdésessége és a megnövekedett munkaidő.

Fontos kiemelni, hogy a friss sperma minőségét is ellenőrizni kell a mélyhűtés előtt, amely szintén megnöveli a termékenyítéssel járó munka összidejét. A felolvasztás utáni motilitást ugyanis leginkább a friss motilitás határozza meg, így nagyon fontos a megfelelő minőségű ivartermék használata. Érdeemes szem előtt tartani továbbá azt is, hogy az édesvízi halak spermiumai kevésbé ellenállóak a fagyasztással szemben, mint a tengeri halaké (Drokin et al., 1989).

Napjainkban a halak spermamélyhűtéséhez két módszert alkalmaznak; mindkettő folyékony nitrogénnel dolgozik. Az egyik kevésbé szabályozható, a másik pedig programozható mélyhűtő berendezés segítségével pontosan beállítható mélyhűtés. A szárazjéggel végzett krioprezerváció mára már kikopott az eszköztárból. A különböző mélyhűtési protokollok kidolgozása természetesen napjainkban is folyik, azonban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a mélyhűtés által okozott DNS károsodásokkal (Labbe et al., 2001), az életképesség tesztelésével (Beirão et al., 2011), a génexpresszióval (Hossen et al., 2021), illetve az epigenetikai változásokkal (Depincé et al., 2020) kapcsolatos kutatások.

2.3.3.1 Mélyhűtés során használt védőanyagok

A mélyhűtés során, a sikeres eredmények elérése érdekében elengedhetetlen a megfelelő védőanyagok alkalmazása. A védőanyagok szerepe abban áll, hogy segítenek megőrizni a sejtek életképességét a mélyhűtés ideje alatt, a tárolás során, illetve a felolvasztás után (Graybill & Horton, 1969; Kamaruding et al., 2012). Fontos funkciójuk továbbá, hogy immobilizált állapotban tartják a spermiumokat, így állandósítják a sejtek fizikai-kémiai paramétereit (Ohta & Izawa, 1996).

A védőanyagokat két csoportba sorolhatjuk, aszerint, hogy hol védik a sejtet (Tiersch et al., 2007). Az extracelluláris védőanyagok nagy molekulájú polimer molekulák. Ezek a sejt külsejéhez, a sejtmembránhoz kapcsolódva stabilizálják azt. Ilyenek például a cukrok, vagyis a glükóz, fruktóz, stb., és a szintetikus polimerek, mint a polietilén-glikol, a polivinilpirrolidon, valamint egyéb fehérje tartalmú anyagok, mint a tej, a tojássárgája, vagy a szarvasmarha szérum albumin (Meryman, 1971). Az intracelluláris védőanyagok belülről, a sejtmembránon keresztül behatolva védik meg a sejteket a nagyobb méretű jégkristályok kialakulásától és az ozmotikus sokktól a fagyáspont csökkentése által (Leung, 1991). Intracelluláris krioprotektáns például a glicerin, a metanol, a dimetil-szulfoxid (DMSO), a dimetil-acetamid (DMA) és egyéb kis molekulású anyagok (Hagedorn és Kleinhaus, 2000).

Az összes védőanyag azon az elven működik, hogy gyorsítja a sejt vízleadását, illetve csökkenti az oldat fagyáspontját. Ez a folyamat azt eredményezi, hogy kevesebb, a sejtet károsító jégkristály keletkezik (Denniston et al., 2000). A nem megfelelő védőanyag használatának számos negatív hatása lehet, például a sejtek duzzadása és a sejtmembrán sérülése (Taylor et al., 1974). A védőanyagok, habár elengedhetetlenek a sejtek túléléséhez, bizonyosfokú toxicitással is rendelkeznek. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy a krioprotektánsok bizonyos mértéknél magasabb koncentrációja (ennek értéke minden védőanyagnál különbözik) esetén már a fagyasztás előtt elkezdődik a sejtek károsodása (Fahy, 1986). A koncentráción kívül az egyensúlyi idő (ld. 2.13 Egyensúlyi idő) is befolyásolhatja a spermiumok életben maradását (Li et al., 2010).

Az antioxidánsok, amelyekkel a szeminális plazmában is találkozhatunk, igen fontos szerepet töltenek be. A mélyhűtés során ugyanis felborul a reaktív oxigéngyökök egyensúlya és oxidatív stressz következik be, ami károsítja a sejteket (Halliwell, 2006; Shaliutina-Kolešová et al., 2019). Az oxidatív stressz során fellépő lipidperoxidáció negatív hatással lehet a motilitásra és a termékenyítő képességre is (Aitken et al. 1998). Ennek ellenére a halak spermiumában kevés, antioxidáns hatással rendelkező vegyületet találunk, így azok nagyon érzékenyek a reaktív oxigéngyökökkel szemben. Ezáltal felértékelődik a szeminális plazma és az esetlegesen, a mélyhűtés során spermához adagolt antioxidánsok szerepe (Koppers et al., 2010; Gazo et al., 2013). Egyes kutatások szerint a mélyhűtés során fellépő oxidatív stressz számos módosulást okozhat a spermiumokban (Balamurugan et al., 2018; Figueroa et al., 2019), mint például a lipid peroxidáció (Klaiwattana et al., 2016), a DNS töredezettség (Cabrita et al., 2011; Ögretmen et al., 2015), a mitokondriális diszfunkciók (Figueroa et al., 2016), a fehérjék oxidációja (Purdy et al., 2016), illetve a spermiumok mozgásában szerepet játszó enzimek inaktivációja (Nynca et al., 2015). Ezen okokból kifolyólag terjedt el az enzimatis (kataláz, szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz, stb.), illetve a nem enzimatis (metionin, oxidált glutation, stb.) antioxidánsok használata számos halfaj spermamélyhűtése esetében (Lahnsteiner et al., 2011; Figueroa et al., 2018; Li et al., 2018).

2.3.3.2 A sperma hígítása a mélyhűtés előtt

Mélyhűtés előtt hígítót kell a spermához adagolnunk, amelynek az a feladata, hogy reverzibilisen gátolja a hímivarsejtek aktivációját. Ebben általában a már előzőleg említett extracelluláris, illetve intracelluláris védőanyagok találhatók, valamint olyan vegyület, amely az oldat pufferelését, pH-ját biztosítja a krioprezerváció során is (pl. trisz-(hidroximetil)-amino-metán-Tris). A jó hígító képes immobilizálni a spermát, nem tartalmaz toxikus anyagokat, pH-ja megfelelő és a mélyhűtés során is optimális ozmotikus koncentrációt teremt a sejtek számára (Leung, 1991).

Mélyhűtés során a megfelelő hígítási arány megválasztása az egyik legfontosabb lépés, ugyanis ez befolyásolhatja a sejtek túlélését, valamint termékenyítőképességet is (Rieniets & Millard, 1987; McPartlin et al., 2008). A spermát általában 1:3-20 arányban hígítják lazacfélék, ponty és tilápia esetén (Rana, 1995; Magyary et al., 1996). Az intracelluláris, vagyis a sejt belsejébe bejutó védőanyagok rendelkeznek bizonyos fokú toxicitással (ld. 2.11 Mélyhűtés során használt védőanyagok), ezért precízen meg kell határozni a végső arányukat, ami általában a végső koncentráció 5, 10, 15%-a (Harvey et al., 1983). Az intracelluláris védőanyag aránya, illetve fajtája pedig az adott halfajtól függ (Linhart & Rodina, 2000; Lahnsteiner et al., 2003; Alavi et al., 2007). Fontos továbbá megemlíteni, hogy a toxicitás csökkentése érdekében érdemes a sperma hígítását 0 °C-on végezni, amelynek hátulütője, hogy minél kisebb hőmérsékleten végezzük, annál több időt kell rászánni az egyensúlyozás idő miatt.

2.3.3.3 Equilibrációs idő

Equilibrációnak nevezzük az extracelluláris, illetve az intracelluláris koncentrációkülönbség kiegyenlítését. Az equilibrációs idő pedig az az idő, amely ennek a koncentrációkülönbségnek a kiegyenlítéséhez szükséges és minimalizálja a toxicitás mértékét (Grout & Morris, 1986).

Az equilibrációs időt befolyásolhatja a spermium membránjának permeabilitása. Előfordulhat az is, hogy nincs szükség equilibrációs időre, hiszen a spermium kicsi és a membránpermeabilitása is megfelelő (pl. zebradánió; Harvey, 1983). Vannak azonban olyan fajok, amelyeknél jóval több idő szükséges a megfelelő hatás eléréséhez. Ez például márnánál (*Tor putitora*) 60 percet (Ponniah et al., 1999), az állas kűsznél (*Chalcalburnus chalcoides*) 5 percet (Lahnsteiner et al., 2000), a pisztráng (Pérez-Cereales et al., 2010) és a ponty (Ponniah et al., 1998) esetében pedig egyaránt 10-10 percet jelent. Európai harcsa (*Silurus glanis*) spermáját 12 percre, pontyét pedig 20 percre a hígítóban hagyva már szignifikáns csökkenést tapasztaltak a motilitásban (Linhart et al., 1993).

2.3.3.4 Krioprezerváció típusai

A szárazjég mint krioprezervációs közeg szerepét napjainkban átvette a folyékony nitrogén. Ez annak köszönhető, hogy beállítható a hűtési sebesség és a hűtés ideje is, ezáltal elkerülhető a nagy hőmérsékletkülönbség okozta sejtkárosodás. A mélyhűtés szabályozása szerint további két csoportra tudjuk osztani a folyékony nitrogénnel történő fagyasztást.

2.3.3.4.1 Nem programozható, folyékony nitrogénnel történő mélyhűtés

A módszer lényege, hogy a mintákat először folyékony nitrogén gőzében hűtik. Előnye, hogy a mélyhűtés ideje a felszíntől való távolság függvényében szabályozható. A hűtés történhet fémlapon, pelletált formában (Tiersch, 1994), fémrácsos műszalmába töltve (Magyary et al., 1996), illetve a nitrogén felszínén úszó porisztírol kereten (7. ábra) szintén műszalmába töltve (Baynes & Scott, 1987; Horváth et al., 2003; Boryshpolets et al., 2009). A szakirodalmak szerint ponty spermamélyhűtése esetében ez a módszer bizonyult a leghatékonyabbnak, így a doktori kutatómunka során is ezt alkalmaztam.



7. ábra. Spermamélyhűtés folyékony nitrogén gőzében. Molnár József felvétele.

2.3.3.4.2 Programozható, folyékony nitrogénnel történő mélyhűtés

A programozható mélyhűtő berendezéshez (8. ábra) egy tartály kapcsolódik, amelyből a gép a beállított program alapján közvetlenül fecskendezi be a folyékony nitrogént, így a hűtési intenzitása sokkal jobban szabályozhatóvá válik. Ezen okból kifolyólag ezt használják például humán spermamélyhűtéshez (Hammit et al. 1989), de egyre elterjedtebb halak esetében is (Cognie et al., 1989; Sultana et al., 2009; Vuthiphandchai, 2015).

Előnye, hogy pontosan beállítható a percenkénti hűtési sebesség (Gorin, 1992), amely lehet egységes, vagy akár lépcsőzetes. Ezen kívül több program, illetve végleges hűtési hőmérséklet is megadható (Rana & McAndrew, 1989; Linhart et al., 1993; Conget et al., 1996; Ponniah et al., 1998). A motilitási értékek akár különböző hőmérsékleteken is vizsgálhatók (Conget et al., 1996). A szakirodalmak szerint zebraadánió spermamélyhűtése esetében ez a módszer bizonyult a leghatékonyabbnak, így a doktori kutatómunka során is ezt alkalmaztam.



8. ábra. Programozható mélyhűtőberendezés. Saját felvétel.

2.3.3.5 A mélyhűtött sperma tárolása

A mélyhűtött spermát felhasználásig folyékony nitrogénben tárolják. Fontos, hogy a minták pontos jelölést kapjanak, a műszalma (különböző térfogatú, műanyagból készült cső) és a goblet (több műszalma tárolására alkalmas műanyag cső) is feliratozva legyen. Az azonos mintákat célszerű ugyanabban a gobletben, illetőleg kaniszterben (fémből készült, a folyékony nitrogénnel teli tartályhoz rögzíthető, a gobletek tárolására alkalmas edény) tárolni. A minták elhelyezésére szolgáló kanna folyamatos utántöltése a nitrogén párolgása miatt elengedhetetlen. Ezt elmulasztva a minták lépcsőzetesen felolvadhatnak és használhatatlanná válhatnak.

2.3.4 A halsperma felolvasztása

A felolvasztás lényege a sejtek rehidratálása. A minták felolvasztásánál, mint a mélyhűtésnél, törekedni kell a pontosságra. Ennél is fontos tényezővé válik a sebesség, illetve az idő. A túl gyors, illetve a túl lassú felolvasztás is károsíthatja a sejteket (Diwan et al., 2010). A jól megválasztott felolvasztási hőmérséklet és időintervallum által elkerülhető az intracelluláris jégkristályok újraalakulása, amely a sejtek sérülését okozhatja (Piironen, 1993; Richardson et al., 2011). Például egy 0,25 ml térfogatú műszalma kiolvasztása optimális esetben 40 °C-on 5 mp-ig történik (Szabó et al., 2005). A felolvasztásnál ugyanakkor figyelembe kell venni a minta tárolójának méretét, milyenségét, valamint az adott faj spermájának és spermiumának paramétereit (Tiersch & Green, 2011). A minták kiolvasztására a legmegfelelőbb eszköz a programozható vízfürdő (9. ábra), amelyen beállítható a kívánt hőfok.



9. ábra. Programozható vízfürdő. Saját felvétel.

2.3.5 A ponty spermájának mélyhűtése és felolvasztása

A ponty megfelelő spermamélyhűtési protokolljának kidolgozásánál a kutatók leginkább a hígító összetételére, a krioprotektánsok koncentrációjára, illetve a mélyhűtés és felolvasztás idejének, hőmérsékletének tökéletesítésére koncentráltak. Szakirodalmi adatok alapján rengeteg információ áll rendelkezésünkre ahhoz, hogy a számunkra legmegfelelőbb variációkat alkalmazzuk. A következőkben, a teljesség igénye nélkül betekintést nyerhetünk az eddig használt módszerek sokszínűségébe.

Ahogy egy korábbi fejezetben említettem (ld. 2.11 Mélyhűtés során használt védőanyagok), a védőanyagok toxikus hatással rendelkeznek, ezért mint minden fajnál, pontynál is fontos volt több védőanyag tesztelése. Ezeknek az anyagoknak a végkoncentrációja is nagyon fontos tényező, ami általában nem lépi túl a 15%-ot. Különböző intracelluláris védőanyagokat alkalmazva, mint a DMSO (Horváth et al., 2003) a DMA (Warnecke & Pluta, 2003), a glicerin (Bozkurt et al., 2014), vagy a metanol (Horváth et al., 2003), a kutatók más felolvasztás utáni motilitási értékeket kaptak. Egyes esetekben a metanol (Horváth et al., 2003), míg másokban a DMSO teljesített jobban (Irawan et al, 2010). A kapott eredményeket természetesen befolyásolhatja a hígító összetétele is.

A különböző szakirodalmakat lapozgatva számtalan, különböző összetételű hígítóval találkozhatunk. Magyarok által kifejlesztett hígító az úgynevezett „pér hígító” (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH: 8,0±0,2, Horváth et al., 2012), amelytől annyiban tér el a Kurokura és munkatársai (1984) által alkalmazott, hogy az glükóz helyett nátrium-hidrogénkarbonátot, magnézium-kloridot és kalcium-kloridot tartalmaz. Egyes publikációkban olvashatunk tojássárgája (Babiak et al., 2008), méz (Ögretmen & İnanan, 2014), vagy akár kókusztej (Devita et al., 2021) hozzáadásáról is.

Fontos további tényező a fagyasztási idő és hőmérséklet megfelelő megválasztása. A fagyasztás kezdődhet különböző hőmérsékleten, amely szintén befolyásolhatja a sperma minőségét. Azáltal, hogy megnöveljük a műszalmák és a folyékony nitrogén felszíne közötti távolságot, a hőmérséklet a következőképpen befolyásolható; $-190^{\circ}\text{C}/1\text{ cm}$, $-150^{\circ}\text{C}/3\text{ cm}$, $-110^{\circ}\text{C}/6\text{ cm}$, $-70^{\circ}\text{C}/9\text{ cm}$ (Boryshpolets et al., 2017). A mélyhűtés ugyanakkor végezhető programozható mélyhűtő berendezés segítségével is (Várkonyi et al., 2019). A hőmérséklet szabályozásán kívül a minták tárolására használt eszköz is befolyásolhatja a motilitást. A mintákat különböző méretű műszalmákba (Horváth et al., 2003) vagy akár kriocsővekbe is tölthetik (Várkonyi et al., 2019).

A sejtek túlélése szempontjából a minták felolvasztása is épp olyan fontos (Izd. 2.16 A halsperma felolvasztása), mint a mélyhűtésük, ezért a kutatók erre is különböző protokollokat dolgoztak ki. A felolvasztást eltérő hőmérsékleten végezhetik, így például 40°C -os (Horváth et al., 2003), 35°C -os (Linhart et al., 2000) vagy 25°C -os (Lubzens et al., 1997) vízfürdőbe helyezve is. Végezetül pedig a minták felolvasztási ideje is befolyásolhatja a sperma minőségi paramétereit (Linhart et al., 2000).

2.3.6 A zebradánió spermájának mélyhűtése és felolvasztása

A zebradánió spermamélyhűtési eljárásai közül is számos ismeretes. A hígító összetételére, a krioprotektánsok koncentrációjára, illetve a mélyhűtés idejének tökéletesítésére ennél a halfajnál is nagy hangsúlyt fektettek a kutatók. A zebradánió és a ponty ivartermékei között található különbségeket, illetve hasonlóságokat is. Nem véletlen tehát, hogy egyes anyagok, eszközök épp úgy beváltak a ponty, mint a zebradánió spermamélyhűtése esetében, míg mások nem. A következőkben, a teljesség igénye nélkül ezeket az eljárásokat szeretném bemutatni.

A védőanyagokat tekintve helyet kapott a metanol (Caetano et al., 2019), a DMA (Morris et al., 2003), a DMSO és a glicerin (Yang et al., 2007). A sejtek toxikózisának elkerülése végett zebradánió esetében ezeknél a krioprotektánsoknál is maximum 15%-os végkoncentrációt alkalmaznak a kutatók. Fontos azonban megemlíteni, hogy egyes védőanyagok hatásossága a mélyhűtés idejének a függvényében változhat. Így például Yang és munkatársai (2007) $20^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ hűtési sebesség mellett DMA-t alkalmazva kapták a legmagasabb felolvasztás utáni motilitási értéket. A metanol azonban $10^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ mellett sokkal jobb védőanyagnak bizonyult és felülmúlta a DMA hatását is.

Hígítók közül a már említett, magyar fejlesztésű „pér hígító”-t (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH: $8,0 \pm 0,2$, Horváth et al., 2012) zebradániónál szintén felhasználták a mélyhűtés tökéletesítéséhez (Caetano et al., 2019). Egy másik kísérletben 400 mmol/kg ozmolaritású hígítót (130 mM KCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 10 mM D-(+)-glükóz, 30 mM HEPES-KOH, pH 7,9) alkalmaztak sikeresen (Matthews et al., 2018). Számos kutatásban összetevőként lelhetjük fel a tejport (Harvey et al., 1982; Draper et al., 2004) vagy a tojássárgáját és a szarvasmarha szérum albumint is (Diogo et al., 2019).

A mélyhűtés tekintetében is több módszert teszteltek. Matthews és munkatársai (2018) a szárazjeget épp olyan megfelelőnek találták, mint a programozható mélyhűtő berendezést. Caetano és munkatársai (2019) is sikerrel mélyhűtöttek szárazjégen zebradánió spermát. A legmagasabb felolvasztás utáni motilitási értékeket azonban beállított $10\text{-}15^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ hűtési sebesség mellett mérték (Matthews et al., 2018). A minták felolvasztásának szakirodalma viszonylag egységes,

általában a műszalmákat 40 °C-os vízfürdőbe helyezik 5 másodpercig (Yang et al., 2007, Caetano et al., 2019).

Különleges eljárást dolgoztak ki a kis mennyiségű minta műszalmában való tárolásához (10. ábra). E szerint előzetesen a hígítót, majd a kihígított mintát szívják fel a műszalmába, úgy, hogy a kettő között levegő legyen, így a két folyadék nem keveredik. Erre azért van szükség, hiszen máskülönben a minimális mennyiségű mintát teljes egészét felszívná a két pamutszövet-dugó és a köztük található, folyadék hatására gélesedő por (Caetano et al., 2019).



10. ábra. A műszalmába betöltött spermaminta. Saját felvétel.

2.3.7 A mélyhűtés hatásai

Számos kutatás szól arról, hogy a mélyhűtés károsíthatja a spermiumokat, ezáltal befolyásolva a motilitási paramétereket és a termékenyítőképességet. Újabb kutatások kiemelik a mélyhűtés hatását az utódgenerációkra például egyes gének expressziójának befolyásolása által. Fontos megemlíteni azonban, hogy a mélyhűtés során használt módszerek epigenetikai változásokat is okozhatnak.

2.3.7.1 Mélyhűtés hatása a spermiumra

A mélyhűtés hatására spermium feje és a citoplazma dehidratálódása által a plazmamembrán is sérülhet, továbbá megdagadhat a mitokondrium, az ostor leszakadhat, rongálódhat (Billard et al., 2000; Butts et al., 2010). Mindezek hozzájárulnak a spermium morfológiájának megváltozásához és a termékenyítőképesség csökkenéséhez. Fontos azonban megemlíteni, hogy a spermium morfológiája és az egyed fenotípusa között mérhető az összefüggés (Immler et al., 2014). A spermiumok külalakja továbbá sok mindentől függ, többek között szezonálisan is eltérhet (Lüpold et al., 2012). Hasonló kutatás született márna (*Barbus barbus*) esetében, ahol megállapították, hogy a sperma mennyisége és a spermiumok morfológiája a reprodukciós időszakban folyamatosan változott (Alavi et al., 2007).

Zebraadánióban azt találták, hogy a mélyhűtés, illetve felolvasztás során a fej megdagadhat, vagy le is szakadhat, a farok megrövidülhet és meggömbülhet (da Costa et al., 2020). Egy angolnán végzett kutatás rámutatott, hogy felolvasztás után a sejtek nem nyerik vissza eredeti méretüket (Asturiano et al., 2007). Ezek a hatások mind negatívan befolyásolhatják a progresszív motilitást, illetve a spermiumok sebességét (Yao et al., 2000; Zhang et al., 2003).

A mélyhűtés során fellépő oxidatív stressz is károsíthatja a spermiumok motilitását, sebességét, illetve a DNS-t is (Gazo et al., 2015). Megfelelő védőanyagok alkalmazásával azonban csökkenthetők ezek a negatív hatások (Shaliutina-Kolešová et al., 2015). Kecsegen végzett kutatásban azt találták, hogy a hígítóhoz adott fagyásgátló fehérjék megnövelik a sejtek túlélési esélyét.

2.3.7.2 Mélyhűtés hatása a DNS-re

A mélyhűtés által a DNS is károsodhat (Labbe et al., 2001), ennek mértéke azonban egyes kutatások szerint a megfelelően megválasztott védőanyag alkalmazásával csökkenthető (Zilli et al., 2003). Egy koreai sziklahallal (*Sebastes schlegelii*) foglalkozó kutatásban azt találták, hogy a mélyhűtés 179 génnek az expresszióját befolyásolta és további 1266 génnek a metilációs mintázatát módosította (Niu et al., 2022). 2010-ben Zeng és munkatársai azt találták, hogy az abnormális epigenetikai módosulások hatással lehetnek a sperma motilitására. Egyes humán kutatásokban azt feltételezik, hogy a normálistól eltérő epigenetikai mintázatnak köze lehet a vetéléshez (El Hajj et al., 2011), valamint a férfiaknál a termékenyítőképesség elvesztéséhez is vezethet (Nanassy & Carrell 2011a, 2011b).

A mélyhűtés ugyanakkor aktiválhatja a hőszokk fehérjéket. Egyes géneket pedig hipermetiláció nélkül is elcsendesíthet. Ezek a változások egyértelműen a mélyhűtés, illetve felolvasztás hatásához köthetők, nem pedig a védőanyagok alkalmazásához (Riesco & Robes, 2013). Kijelenthető tehát, hogy a mélyhűtés által egyfajta szelekció történik (Asturiano et al., 2017), amely az utódgeneráció fenotípusának megváltozásával járhat (Immler et al., 2014; Alavioon et al., 2017).

2.3.7.3 Mélyhűtés hatása az utódok ivarsejtjeire

Babiak és munkatársai 2002-ben azt találták, hogy a mélyhűtött spermából született szivárványos pisztráng egyedeknek a spermája felolvasztás után 8%-kal jobban termékenyített (89,6%), mint a friss spermából származó egyedeké (81,7%). A friss spermával történő termékenyítési eredmények azonban nem mutattak különbséget a két csoport esetében. Mivel az egyedek teljes testvérek voltak, illetve azonos körülmények között tartották őket, így azt a következtetést vonták le, hogy a mélyhűtés során a spermiumok szelekciója történik. A fagyasztással szemben ellenálló spermiumok élnek túl. Azt feltételezték továbbá, hogy a spermiumok ezen tulajdonsága „átörökíthető” az utódokba (Babiak et al., 2002; Cabrera et al., 2010).

2.3.7.4 Mélyhűtés hatása az utódok növekedésére, testalakulására

Az egyedek növekedését is befolyásolhatja a spermiumok mélyhűtése. Nusbaumer és munkatársai (2019) azt találták sebes pisztráng (*Salmo trutta*) esetében, hogy a mélyhűtött spermából született egyedek szignifikánsan kisebbek. Európai harcsa (*Siluris glanis*) esetében ezzel ellentétes megfigyelésre jutottak, vagyis a mélyhűtött spermából született egyedek hossza szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll csoport értékei (Bokor et al., 2015). Egy másik, szivárványos pisztrángokkal foglalkozó tanulmány pedig arra mutatott rá, hogy a friss spermából született halak

átlagosan nehezebbek voltak, azonban az egyedek hosszúságát nemcsak a mélyhűtés, de a szülői feno- és ezáltal genotípusok is befolyásolták (Hayes et al., 2004). Számos kutatás szól arról is, hogy az ivarsejt mélyhűtésének semmilyen hatása nem volt az utódgeneráció növekedésére. Ilyen kutatások születtek a teljesség igénye nélkül például csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*), csíkos sügér (*Morone saxatilis*), jávai márna (*Barbonymus gonionotus*), illetve *Brycon insignis* esetében is (Kerby et al., 1985; Tiersch et al., 1994; Rahman et al., 2009). Egyes halfajok esetében az embriogenezis során sem találtak eltérést a két csoport között (Viveros et al., 2012).

Diogo és munkatársai (2019) zebradánióban azt találták, hogy a mélyhűtés során használt védőanyagok koncentrációja hatással lehet az utódgeneráció csontvázának alakulására. Más kutatások is alátmasztják, hogy a mélyhűtött spermával történő termékenyítés a lárvák alakjának normálistól eltérő változataihoz vezethet (Miskolczi et al., 2005). Egy szívárványos pisztrágon végzett kutatásban azonban a kutatók eltérő eredményeket kaptak. A mélyhűtött spermából született egyedek morfológiájukban szignifikánsan nem tértek el friss spermából született társaikhoz képest (Young et al., 2009).

Összességében tehát elmondható, hogy a mélyhűtésnek számos hatása lehet a sperma minőségére. Ezeknek nagy része kiküszöbölhető a megfelelő mélyhűtési protokollok, védőanyagok használatával. Ezek az anyagok azonban befolyással lehetnek az utódgeneráció növekedésére, csontszerkezetére, illetve egyéb genetikai értékekre is. Nagyon fontos tehát a megfelelő módszereket minden faj esetében átfogó vizsgálatok alkalmazásával egyenként megállapítani. Hiszen a filogenetikai különbségek miatt nem létezik olyan univerzális megoldás, amely minden élőlény ivarsejtmélyhűtésénél használható lenne.

2.4 Számítógépes spermavizsgáló rendszer (CASA- Computer Assisted Sperm Analysis)

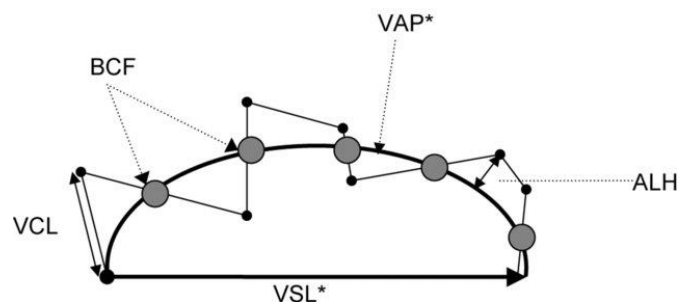
A számítógépes spermavizsgáló rendszer, vagyis CASA (11. ábra) egy számítógéphez kapcsolt mikroszkópot jelent és a hozzá tartozó spermavizsgáló szoftvert, amely által precízebb, objektívebb képet kaphatunk a spermiumok mozgásáról, mint a fénymikroszkóppal történő szubjektív becslés esetében (Fauvel et al., 2010). A pontossághoz elengedhetetlen a CASA által mért paraméterek szakirodalom szerinti manuális beállítása, hiszen a program szarvasmarha spermára lett alapértelmezve. Ezen kívül egy virtuális vonalzóval megadhatjuk a spermiumok fejének nagyságát, így a számítógépes spermavizsgáló rendszer képet kap arról, hogy milyen méretű sejteket vizsgáljon. Ez nagyon hasznos lehet, amikor különböző halfajok spermájának motilitását mérjük.

A mérés végén egy videón is megtekinthetjük a spermiumok mozgását, amelyen a program más színekkel jelöli meg a különböző sebességű spermiumokat. Azokat a sejteket is láthatjuk, amelyeket a CASA valamilyen okból kihagyott a mérésből. Ezeket további beállításokkal mérhetővé tehetjük. Elmondható tehát, hogy a számítógépes spermavizsgáló rendszer nagyon fontos mérési eszköz, de ellenőrzésre szorul. A nagyobb pontosság elérése érdekében indokolt a mérési eredmények manuális felülvizsgálata. Segítséget nyújthat továbbá a vizsgálat ismétlési számának növelése is.



11. ábra. Számítógépes spermavizsgáló rendszer. Saját felvétel.

A CASA által mért motilitási adatok tükrében megállapíthatjuk, hogy milyen a sperma minősége (Lahnsteiner et al., 2004). További előnye, hogy nem csak a mozgó spermiumok arányát adja meg, hanem a mozgó spermiumok fejének elmozdulási útvonalát is végigköveti (12. ábra). Így méri az átlagolt útvonalra számított- (VAP), az egyenes vonalra számított- (VSL), a ténylegesen megtett útvonalra számított sebességet (VCL), a fej kilengésének frekvenciáját (BCF), a fej oldalirányú kilengésének nagyságát (ALH) és az említett paraméterekből is képes további értékeket számolni, mint a százalékban kifejezett LIN (az útvonal egyenestől számított eltérése) és az STR (az átlagolt mozgás útvonalának egyenestől számított különbsége; WHO, 2010). A spermiumok mozgását külön is lekövethejtük, illetve az adatokat egységesítve is megtekinthetjük.



Calculated parameters:
 $LIN^* = VSL^*/VCL \times 100$
 $STR = VSL^*/VAP^* \times 100$

12. ábra. A spermium mozgási irányjai. Az átlagolt útvonalra számított sebesség (VAP), az egyenes vonalra számított sebesség (VSL), a ténylegesen megtett útvonalra számított sebesség (VCL), a fej kilengésének frekvenciája (BCF), a fej oldalirányú kilengésének nagysága (ALH), az útvonal egyenestől számított eltérése százalékban kifejezve (LIN), az átlagolt mozgás útvonalának egyenestől számított különbsége százalékban kifejezve (STR). Forrás: Slotter et al., 2006.

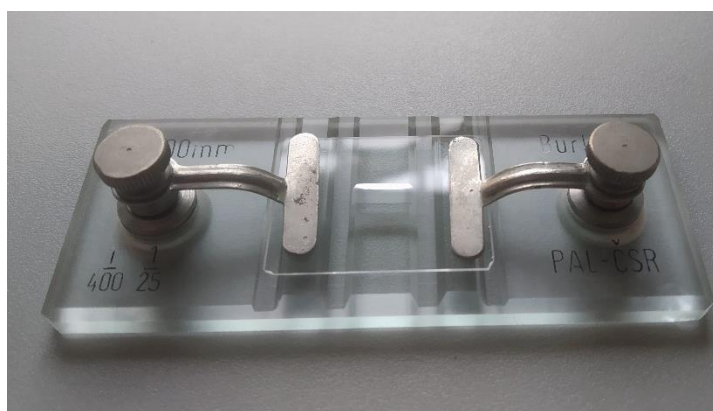
A motilitási adatok és a termékenyítőképeség között sok halfaj esetében összefüggést találtak (Harvey et al., 1982; Stoss, 1983; Cosson et al., 1985; Billard & Cosson 1992; Ohta et al., 1995), így tehát a CASA-ból kinyert adatok alapján óvatos becsléssel következtethetünk a termékenyülési

eredményekre. Fontos azonban megemlíteni, hogy a motilitás, a sebesség és a termékenyítőképesség a szeminális plazma ozmolaritásától is függ, amely évszakonként változó lehet (Benau & Terner, 1980; Akcay et al., 2004).

2.5 A sejtdenzitás mérése

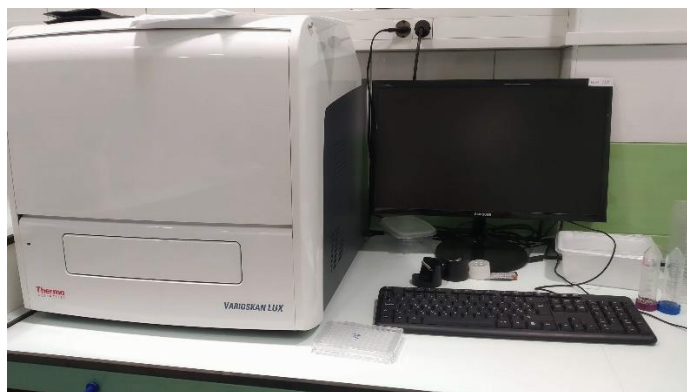
A sejtkoncentráció értéke megadja az 1 ml mintában jelenlévő sejtek számát. Ez az adat főként keltetőházi szaporításnál nyújthat segítséget, ahol a megfelelő sperma/ikra arány meghatározásával lehet elérni a kívánt termékenyülési százalékot. Egyes kutatók rámutattak arra, hogy a sejtdenzitás mérésének a mélyhűtés előtt is nagy szerep juthat. A megfelelően megválasztott koncentráció többek között növelheti a mélyhűtés eredményességét (Cuevas-Uribe et al., 2011). Babiak és munkatársai (1997) szintén arra jutottak, hogy az egyedenként eltérő spermadenzitás befolyásolhatja a felolvasztás utáni termékenyítőképességet. Ennek ellenére a legtöbb mélyhűtési módszer hígítási arányokkal dolgozik.

A sejtkoncentráció mérésére különböző eszközöket használhatunk. Rendelkezésre állnak különféle sejtszámláló kamrák (Bürker-Türk; 13. ábra); Thoma, Neubauer, Neubauer Improved, Makler), amelyekbe a megfelelő hígítást követően beletölthető a vizsgálni kívánt minta. Minden kamránál a térfogatot, illetve a hígítási arányt figyelembe véve kaphatjuk meg a sejtdenzitást. Fontos azonban megemlíteni, hogy a kamrák pontossága különbözhet (Christensen et al., 2005).



13. ábra. Bürker-Türk kamra Sajat felvétel.

A sejtkoncentráció meghatározásához használt további eszköz a spektrofotométer (14. ábra), amely adott hullámhossztartományban a fényelnyelés mértéke alapján képes meghatározni a sejtdenzitást. Először emlősöknél tesztelték ezt a módszert, majd később számos kutató sikerrel próbálkozott különböző halfajokban is. A kísérletek során a Bürker-Türk kamrával történő sejtszámlálás alapján alkottak egy lineáris regressziós függvényt, amelynek az egyenletébe behelyettesítve a különböző fényelnyelési értékeket, következtettek a sejtszámra (Ciereszko & Dabrowski, 1993, Fauvel et al., 1999). Ez a módszer képes lényegesen meggyorsítani a sejtkoncentráció mérését.



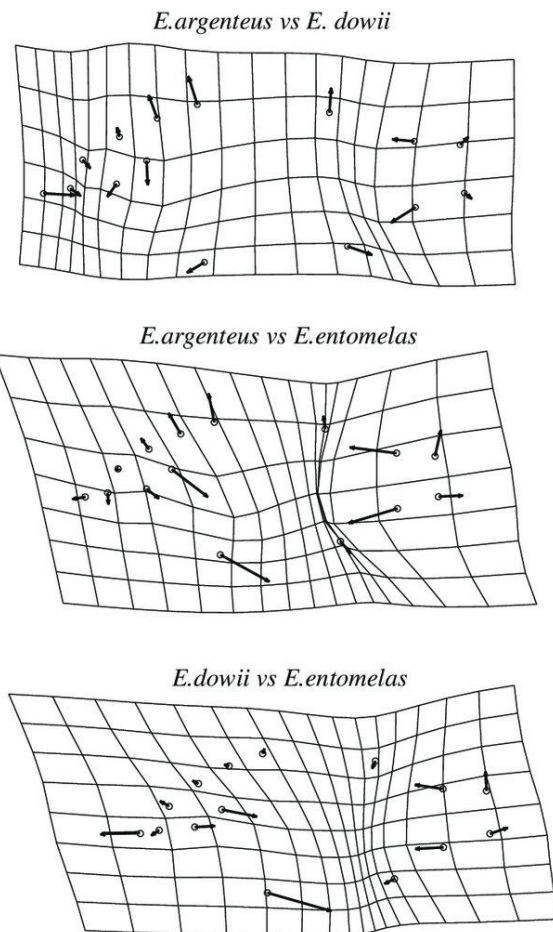
14. ábra. Plate leolvasó spektrofotométer. Saját felvétel.

Potenciális, sejtsűrűség mérésére alkalmas eszközként merült fel a CASA is (Cuevas-Urbe & Tiersch, 2011), amelynek a pontossága megkérdőjelezhetővé vált (Sørensen et al., 2013), ezért nem terjedt el halak esetében. Léteznek ugyanakkor nem a sejtszámolásra kidolgozott, de arra is használható módszerek. Ilyenek például az áramlási citométerek vagy a Coulter számlálók (Fauvel et al., 2010).

2.6 Morfometria

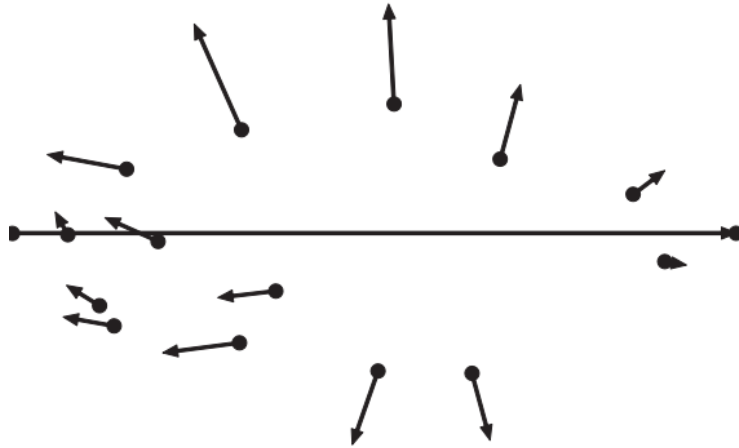
A morfometria a statisztikának az a területe, amely esetében az alak számszerűsített leírása történik (Mitteroecker & Gunz, 2009). Kezdetben, az 1960-as és 1970-es években a morfometria az élőlények eredeti alakjának leírásán alapult, ezt nevezzük tradicionális morfometriának (Marcus, 1990; Reymont 1991). Ez a módszer azért nem volt a legmegfelelőbb, mert egyes egyedeken számtalan hosszmerést végeztek (Rohlf, 1990), ez pedig sok időt vett igénybe, ami túlaltatáshoz, így végül a halak pusztulásához vezetett (Specziár et al., 2009).

Az 1980-as évektől kezdve az alak leírása hatalmas változásokon ment keresztül. A technika fejlődése által, a számítógép segítségével megjelentek a koordinátákon alapuló módszerek és a deformitás rácsok számítógépes elemzése is (Bookstein, 1998). A thin plate spline (TPS) lehetővé tette, hogy az alak síkját egy vékony fémlapként értelmezve, azon különböző mérőpontokat felvéve és ezeket interpolálva a másik mérőpont készlethez, láthatóvá váljanak a lemez hajlítási irányai. Így tulajdonképpen nyomonkövethetők az alakban végbement változások (Bookstein, 1989;1997; Staszny, 2016). A következő, 15. ábrán ezeket az ontogenetikus változásokat láthatjuk ábrázolva thin plate spline segítségével 3 faj esetében.



15. ábra. Három *Eucinostomus* nemzetségbe tartozó halfaj testalakja közötti különbség. Forrás: De La Cruz-Agüero, 2004.

Egy új irányzat, a geometriai morfometria fejlődése vette kezdetét, amelynek lényege, hogy az élőlények alakját mérőpontok felvételével és azok különböző geometriai alakok szerinti összekötésével határozzák meg (Adams et al., 2004). Leginkább használatos a Prokrusztész módszer, amelyben a mérőpontok felvétele után a Prokrusztész-koordináták (16. ábra) geometriai átlagaként rajzolódik ki a teljes minta átlagos alakja. Ehhez az úgynevezett referencia alakhoz viszonyíthatjuk az egyedeket, csoportokat. A kialakuló mérőpontok irányába vektorokat húzva láthatóvá válik az eltérés az átlagos alaktól, továbbá az egyes minták különbségét is megfigyelhetjük (Zelditch, 2004a).

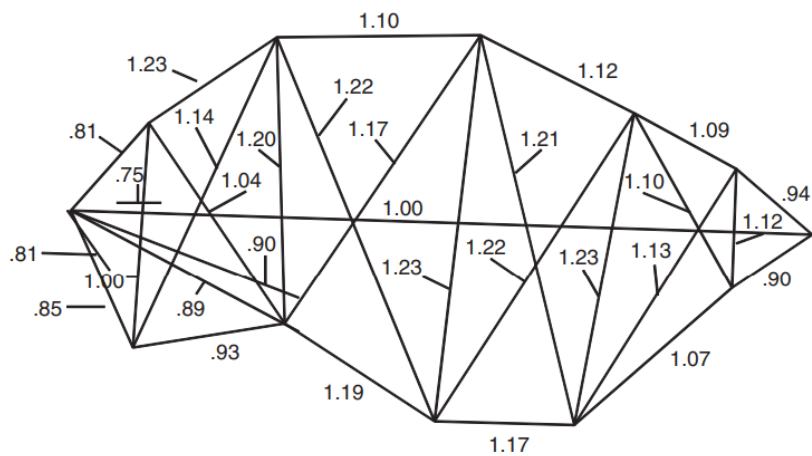


16. ábra. Ontogenetikus változások jellemzése Prokrusztész módszer segítségével a pirája (*Serrasalmus gouldingi*) esetében. Forrás: Zelditch, 2004a.

2.7 Morfometriai változások halakban

A morfometriai változások megfigyelése vízi élőlényekben nem újkeletű, hiszen 1906-ban Fulton volt az első, aki tengeri csigákat vizsgálva matematikailag állapította meg összefüggést a testtömeg és a testhossz között. Manapság is általában ezzel a hagyományos morfometriai módszerrel dolgoznak a kutatók (Binohlan & Pauly, 2000). A leggyakrabban használt egyenlet a $W = a TL^b$, ahol a „W” jelöli a testtömeget, a „TL” a testhosszat, az „a” a testalak koefficiensét és végül „b” a dimenziók kiegyenlítésére szolgáló koefficienset. Az „a” értékei lehetnek 0,1 (kis és gömbölyű hal), 0,01 (áramvonalas testű hal), illetve 0,001 (angolna testű halak). A „b” pedig lehet < 3 (a hal gyorsabban nyúlik, mint ahogyan a tömege nő), > 3 (a hal tömege gyorsabban nő, mint ahogy nyúlik), végül $b = 3$ (izometrikus növekedés; Leonart et al., 2000). Ezek az allometrikus együtthatók azért előnyösek, mert képesek megmutatni a relatív növekedés sebességét is.

Ezen kívül használják még a vizsgált paraméterek mintán belüli átlagát is (Leonart et al., 2000). Ezekre a változókra azért van szükség, mert a halakra általában az allometrikus növekedés jellemző, vagyis a különböző korú egyedek testarányai is különböznek egymástól (Huxley & Teisser, 1992). A módszerrel ugyanakkor az a probléma, hogy rengeteg standardizálási eljárást fejlesztettek ki rá, amelyek mind más és más eredményt adnak, így ezeket nem lehet összehasonlítani egymással (Adams et al., 2004). Zelditch és munkatársai például egy pirája faj esetén határozták meg az allometrikus együtthatókat. Az érték < 1 esetén arra utalt, hogy az adott hossz növekedett gyorsabban, > 1 esetén lassabban, illetve $= 1$ esetén a standard testhosszal azonos mértékben növekedett (17. ábra).



17. ábra. Tradicionális morfometriai allometrikus koefficiensek. Forrás: Zeldrich, 2004b.

A hagyományos morfometriai eljárásokban a merisztikus bélyegeket is figyelembe veszik (Specziár et al., 2009), amely előnyös lehet a halpopulációk elkülönítésében (Hubbs, 1922).

3 Anyag és módszer

3.1 Halak tartási körülményei

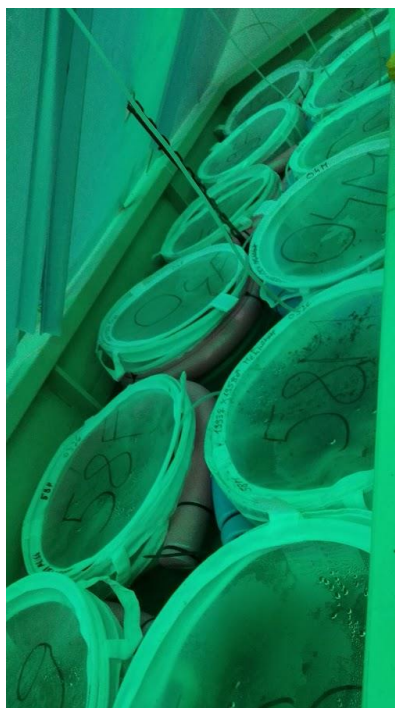
3.1.1 Ponty

A pontyokat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének recirkulációs rendszerében tartottam (Sentimento Kft., Érd, Magyarország). A doktori kutatómunka során egyaránt pikkelyes és tükrös pontyokkal is dolgoztam, amelyeket nem különítettem el (P: N=66, életkor: 4+, testtömeg: 817-3000 g; F1: N=46, mélyhűtött spermából született egyed és N=63, friss spermából született egyed, életkor: 2+, testtömeg: 100-520 g; F2: N=68 friss spermából-, N=63, mélyhűtött spermából született egyed, életkor: 1+, testtömeg: 28-640 g, 1. táblázat).

1. táblázat. Pontyok testtömege, darabszáma és életkora generációk szerint. M: mélyhűtött spermából született egyedek, F: friss spermából született egyedek, P: szülői generáció, F1: első generáció, F2: második generáció.

Generációk	Darabszám	Életkor (év)	Testtömeg (g)
P	66	4+	817-3000
F1	M=46; F=63	2+	100-520g
F2	M=63; F=68	1+	28-640

A halakat 10 literes akváriumokban keltettem, majd generációtól függően egészen 3-4 hónapos korukig ebben neveltem őket. Ezután 3 m³-es műanyag medencékbe helyeztem át őket, külön ketrecekben (18. ábra), a csoportjuknak megfelelően. Erre azért volt szükség, mert ekkor még nem tudtam egyedileg megjelölni őket.



18. ábra. Pontyok elkülönített, „svéd ketreces” tartása a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének recirkulációs rendszerében. Saját felvétel.

Az állatok, amikor jelölhetővé váltak (körülbelül fél éves korukban), mikrochipet (Agrident GmbH, Barsinghausen, Németország) kaptak a hasüregükbe (túl kicsik voltak a hátizomba történő jelöléshez), majd a 3 m³-es műanyag medencékbe szabadon engedtem őket. A mikrochip azonosítására leolvasó készüléket használtam (19. ábra). Mindegyik hal más azonosító számot kapott, így a csoportok megkülönböztethetővé váltak.



19. ábra. A pontyok megjelölése. Saját felvétel.

A vízparaméterek mindkét recirkulációs rendszerben (20. ábra) állandóak voltak: a hőmérséklet (23 ± 2 °C), valamint a vízminőség is (pH $7,0 \pm 0,2$, redoxi potenciál; 230 ± 2 mV, oldott O₂-szint; 4 ± 1 mgL⁻¹). Az idősebb halakat napi egyszer etettem 10 g/testtömegkilogramm táppal (Aqua Uni, Aqua Garant, Pöchlarn, Ausztria). A halnevelés során a halakat (csoportok száma F1 esetében N=12; F2 esetében N=8) az első hónapban artémiával (*Artemia salina* nauplii; INVE Aquaculture NV, Belgium) tápláltam, napi nyolcszor. A második hónaptól a kishalak zebradánió tápot is kaptak (100 µm alattitól 600 µm feletti; ZEBRAFEED[®], Sparos Lda, Portugália). A harmadik hónaptól

elhagytam az artémiát. A negyedik hónaptól a halakat fokozatosan egyre nagyobb (1,00 – 4,5 mm) táppal ettem (Aqua start; Aqua Uni, Aqua Garant, Pöchlarn, Ausztria).



20. ábra. A pontyok tartására szolgáló recirkulációs rendszer. Saját felvétel.

3.1.2 Zebradánió

A zebradániókat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének ZebTEC[®] recirkulációs rendszerében tartottam (Tecnplast, Olaszország; 21. ábra). A halakat 3-, illetve 8 literes akváriumokban tartottam, állandó víz hőmérséklet (25 ± 2 °C) és vízminőség (pH $7,0 \pm 0,2$; vezetőképesség 525 ± 50 μ S; alkalitás: 0 mM OH⁻, 0 mM CO₃²⁻, 0,4 mM HCO₃²⁻; keménység: < 0,5 °dH; DOC: > 90%) mellett. A megvilágítás periodikusan változott (14 óra megvilágítás, 10 óra sötétség). A halakat napi kétszer zebradánió táppal (ZEBRAFEED[®], Sparos Lda, Portugália) és napi egyszer artémiával (*Artemia salina* nauplii; INVE Aquaculture NV, Belgium) ettem. A nagyobb megmaradás érdekében a kishalakat 1,5 hetes korig napi vízcsere mellett állandó hőmérsékleten (25 ± 2 °C), inkubátorban neveltem. A kishalakat napi egyszer, a vízcsere előtt artémiával ettem.



21. ábra. A zebradániók tartására szolgáló recirkulációs rendszer. Saját felvétel.

3.2 Halak kezelése a vizsgálatok előtt

A pontyokat a termékenyítési, illetve spermavizsgálatok előtt Ovopellel (GnRH analóg; D-Ala⁶, Pro⁹ Net-mGnRH /18-20 µg/; Horváth et al. 1997) kezeltem (22. ábra). Ikrások esetében a 0. órában az ovulációhoz szükséges dózis 10%-át, majd 12 órával később a további 90%-át adtam be a halak testtömegének megfelelően. Hímek esetében egyszeri kezelést alkalmaztam, a halak a hormon 100%-át kapták meg. A halakat a kísérletek elvégzése előtt 2-fenoxietanollal altattam (0,04%, Reanal, Magyarország).



22. ábra. Pontyok hormonális kezelése. Mészáros Gergely felvétele.

A zebradániókat a vizsgálatok megkezdése előtt trikaine-metán-szulfonát (MS-222, Arlos Organics™, Geel, Belgium, 168 mg/l) oldatban altattam. A vizsgált halak esetében nem volt szükség előzetes hormonkezelésre.

3.3 Generációk létrehozása

3.3.1 Pontyok szülői nemzedékének (P) kialakítása

A szülői nemzedék 2016-ban, egynyarasan került a Dinnyési Halgazdaság Kft.-ből és a Jászkiséri Halas Kft.-ből a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének recirkulációs rendszerébe. A bekerült 41 tejes közül véletlenszerűen kiválasztottam 9-et. Ezek spermájának friss, illetve felolvasztás utáni motilitási paramétereit vizsgáltam 3 hónapon keresztül. Összesen 6 alkalommal mértem CASA segítségével a friss és olvasztott sperma minőségi paramétereit, ügyelve arra, hogy két fejés között legalább 1 hét elteljen, így az állatok tudjanak regenerálódni. Erre azért volt szükség, mert egyrészt ki akartam választani azokat az egyedeket, amelyeknek a spermája kevésbé mélyhűthető, másrészt pedig azokat, amelyek spermájának progresszív motilitása felolvasztás után 40% felett van, hiszen szakirodalmi adatok alapján ez az érték jónak számít (Horváth et al., 2003; Várkonyi et al., 2018). Mivel az egyedek spermájának minősége között nem találtam szignifikáns eltérést, így a 9 egyed közül véletlenszerűen kiválasztott 6 tejest használtam fel az első generáció létrehozásához.

3.3.2 A pontyok első generációjának (F1) létrehozása

74 ikrás közül véletlenszerűen kiválasztottam egyet, amelynek a mérete, kondíciója, egészségügyi állapota is megfelelt. Hormonális indukció után 24 órával lefejtem az ikrát. A termékenyítést Horváth és munkatársai (2003) kísérlete alapján végeztem. 12 darab, egyenként 10 grammos ikrátételt különítettem el. Ezeket 6 darab tejes frissen fejt, illetve előzőleg mélyhűtött spermájával termékenyítettem, így összesen 12 csoportot létrehozva. A termékenyítéshez felhasznált sperma mennyisége ikrátételenként 50 µl volt. A sperma minőségét fagyasztás előtt, majd azt követően CASA segítségével mértem meg. A spermát az ikrához adagoltam, majd 100 µl rendszervíz hozzáadása után spatulával 1 percig kevergettem. 1 perc után Woynárovich-féle oldatot (10 liter rendszervíz, 40 g konyhasó, 30 g karbamid; Woynárovich, 1962) adtam hozzá, annak érdekében, hogy az ikraszemek ne tapadjanak össze. Folyamatos kevergetés közben adagoltam további Woynárovich-féle oldatot a duzzadó ikrátételekhez. Végül háromszori csersavas kezelést követően helyeztem ki a megtermékenyített ikraszemeket a 10 l-es akváriumok aljára. A lárvák 3-5 nap múlva kikeltek. Az első 3 napban metilinkékkel kezeltem a vizet a különböző fertőzések elkerülése érdekében. Kelés után az ikrahéjat eltávolítottam a medencék aljáról, a halakat pedig 3-4 hónapos koruk elérése után helyeztem át a 3 m³-es medencékbe (lsd. 3.1.1 Ponty).

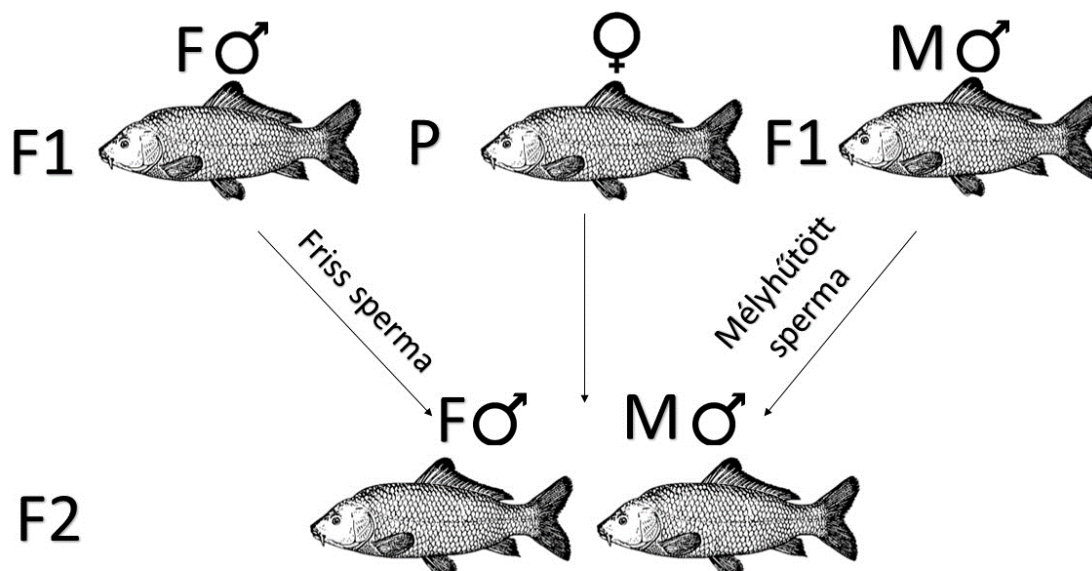
3.3.3 A pontyok második generációjának (F2) létrehozása

Az első generáció egyedei közül csoportonként kiválasztottam 1 pontyot. Vagyis friss spermából, illetve mélyhűtött spermából született egyedek közül is 6 darabot. Ezekből a pontyoktól a hormonkezelés után vett spermát számítógépes spermavizsgáló rendszer (CASA) segítségével vizsgáltam meg. A mintákat Horváth és munkatársai (2003) által kidolgozott módszer szerint mélyhűtöttem (lsd. 3.4 Sperma gyűjtése, vizsgálata, mélyhűtése, termékenyítés). A mintákat felhasználásig folyékony nitrogénben tároltam. A felolvasztás utáni motilitás méréséhez szintén CASA-t használtam (lsd. 3.4 Sperma gyűjtése, vizsgálata, mélyhűtése, termékenyítés).

Egy darab P ponty ikráját használtam fel az összes csoport létrehozásához, még hozzá ahogyan az F1 generáció létrehozásánál, 10-10 gramm ikrát termékenyítettem meg, így létrehozva 8 csoportot. Ezek közül 4-et mélyhűtött spermából született egyedek mélyhűtött spermájából, 4-et pedig friss spermából született egyedek spermájából hoztam létre. A termékenyítéshez felhasznált sperma mennyisége ikrátételenként 50 µl volt.

A csoportok számának csökkentésére azért volt szükség, mert két csoport esetében nem kaptam megfelelő egyedszámot, így ennél a két csoportnál mind a friss, mind pedig a mélyhűtött vonalat kizártam a további vizsgálatokból. A megtermékenyített ikrátételeket ezúttal is Woynárovich-féle oldattal kezeltem, majd a tanninos kezelést követően a 10 l-es akváriumokat tartalmazó recirkulációs rendszerbe helyeztem ki csoportonként elkülönítve.

Pontyok esetében azért 2 generációt hoztam létre, mert a doktori kutatómunka időtartama alatt ennyire volt lehetőség. Tapasztalataim szerint a pontyok ivarérésére még állandó környezeti paraméterek mellett is minimum 1,5 évet kell várni. A következő, 23. ábrán sematikusán láthatjuk az F2 generáció létrehozását.



23. ábra. A vizsgálati csoportok létrehozása ponty (*Cyprinus carpio*) fajban. A mélyhűtött spermából született egyedeknek (M) a spermáját mélyhűtöttem, a második, mélyhűtött spermából születő generációt (M) így hoztam létre. A friss spermából született egyedek (F) spermáját pedig frissen használtam fel, így megkapva a friss spermából született egyedek (F) második generációját. Saját szerkesztés.

3.3.4 Szülői (P) zebradániók kiválogatása

50 darab zebradánió hím spermájának minőségét vizsgáltam meg CASA segítségével, amelyeket külön medencékben tartottam. Kéthetente néztem meg az egyedek spermájának minőségi értékeit, összesen 3 alkalommal. Végül 6 olyan egyedet választottam ki, amelyek spermájának progresszív motilitása mind a három vizsgálat során 80% felett volt. Ezek után 6 darab ikrást választottam ki véletlenszerűen. Ezek az egyedek alkották a szülői (P) generációt.

3.3.5 Zebradániók első generációjának (F1) létrehozása

Az előzőleg kiválasztott 6 darab ikrásnak az ikráját egyenként megfelezttem. Az ikratételeket egyenként 6 különböző hím felolvasztott, illetve friss spermájával termékenyítettem meg. Így megalkotva a teljes testvérekből álló csoportokat. Összesen 12 darab csoportot hoztam létre, amelyből 6 csoport friss spermából, a másik 6 pedig mélyhűtött spermából született.

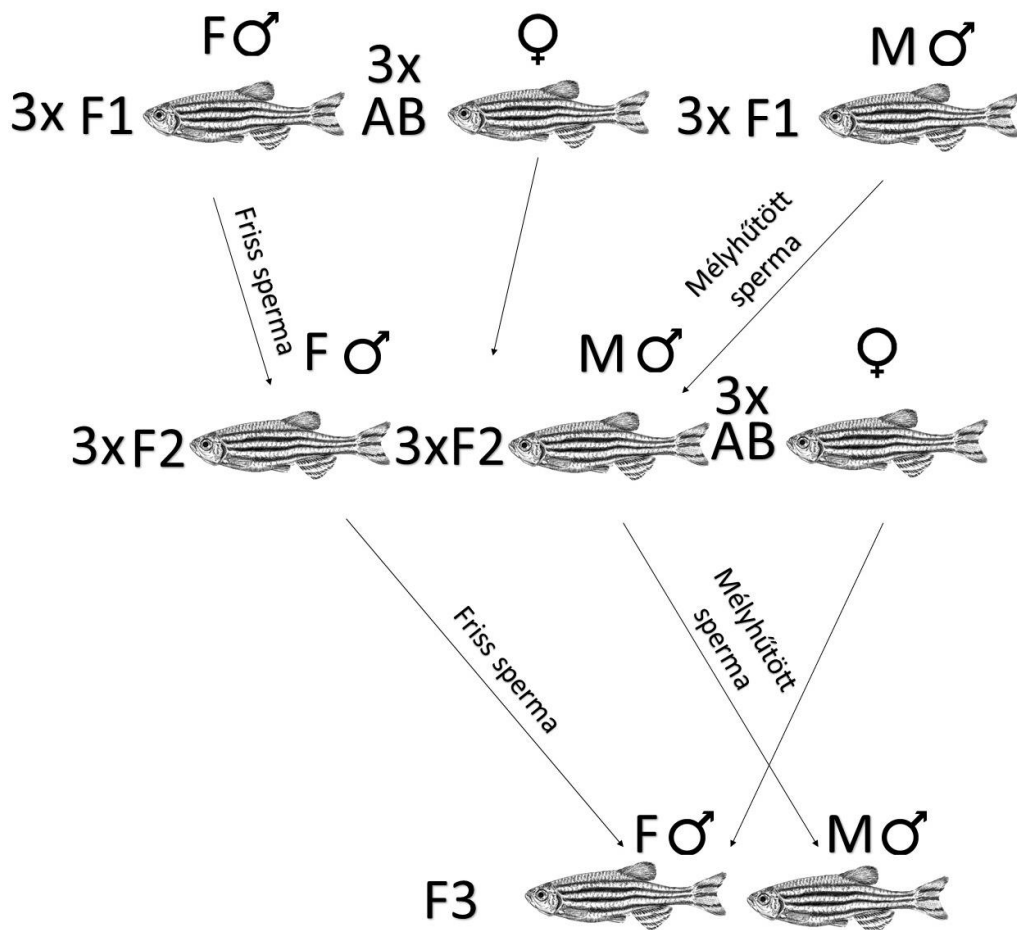
3.3.6 Zebradániók második generációjának (F2) létrehozása

A második generáció létrehozásához mindegyik csoportból 3 hímét választottam ki. Az egy csoporton belüli tejesek spermáját összekeverve mélyhűtöttem. Hat darab, vad típusú ikrást választottam ki véletlenszerűen, amelyeknek az ikráját szintén összekevertem, majd a kevert ikratételeket megfelezttem. Csoportonként az ikratételek egyik felét mélyhűtött spermával, másik

felét pedig friss spermával termékenyítettem, így kialakítva a teljes testvérekből álló második generációt. Az összekeverésre azért volt szükség, mert az egyedek olyan kevés mennyiségű ivarterméket adtak, hogy többszöri próbálkozásra sem tudtam egyénileg újabb generációt létrehozni, így a továbbiakban is ezt a módszert alkalmaztam.

3.3.7 Zebradániók harmadik generációjának (F3) létrehozása

A harmadik generációt, hasonlóan a második generációhoz, úgy hoztam létre, hogy a második generációból véletlenszerűen csoportonként kiválasztottam 3 tejest. Az azonos csoportból származó tejesek spermáját összekeverve mélyhűtöttem. Véletlenszerűen, vad típusú, 2 éves ikrások közül csoportonként kiválasztottam 6-ot. Az ikrások összeadott ikratételét megfelezttem, majd azonos csoportban lévő tejesek kevert mélyhűtött, illetve friss spermájával termékenyítettem (24. ábra).



24. ábra. A vizsgálati csoportok létrehozása zebradánió (*Danio rerio*) halfajban. Az F1 esetében minden csoport létrehozásánál 1-1 nőténytől vettünk ikrát, amelyet megfelezttem. Ekkor még csoportonként ugyanazon hím mélyhűtött, illetve friss spermáját használtam a termékenyítéshez. Az első generációtól kezdve azonban áttértem az összekevert ikrá, illetve sperma használatára, így csoportonként 3-3 hím-től vettem spermát, amelyet a mélyhűtött spermából született egyedek esetében mélyhűtöttem. A friss spermából született egyedek esetében pedig összekevert, friss spermával történt a termékenyítés. AB- genotípus megjelölése. Saját szerkesztés.

3.4 Sperma gyűjtése, vizsgálata, mélyhűtése, termékenyítés

3.4.1 Ponty

Ovopellel történő kezelés után, 24 óra elteltével a halakat ismét elaltattam, majd nedves törölközőre helyeztem és óvatos hasmasszázzsal, mennyiségtől függően különböző térfogatú centrifugacsövekbe (1,5 ml, 15 ml) préseltem ki a spermát. A sperma minőségi vizsgálatához (sűrűség, motilitási paraméterek meghatározása) a már előzőleg is említett számítógépes spermavizsgáló rendszert (Minitüb GmbH AndroVison, Németország) használtam. A spermát először frissen, majd felolvasztás után is megvizsgáltam. A mélyhűtést a Horváth és munkatársai (2003) által kidolgozott módszer alapján végeztem. A sperma hígításához hígítót (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH: 8,0±0,2) alkalmaztam 10% végkoncentrációjú metanollal, amelyet 1:9 arányban kevertem el a spermával. A mintát 0,5 mL-es műszalmákba töltöttem. Ezek után a szalmákat folyékony nitrogénnel töltött porisztírol dobozba helyeztem a nitrogén felszínétől 3 cm-re. A folyékony nitrogén gőzében 3 percig hűtöttem a mintákat, majd felhasználásig folyékony nitrogénbe helyeztem azokat. Motilitási paraméterek mérése, illetve termékenyítés előtt a műszalmákat 40 °C-os vízfürdőben (Thermo Haake P5, Thermo Electron Corp, Waltham, Massachusetts, USA) 13 másodpercig olvasztottam fel.

3.4.2 Zebradánió

A zebradániókat altatás után (MS-222) egy nedves szivacsra helyeztem, majd csipesszel abdominális masszázst végezve 10 µL-es üvegapillárisba szívtam fel a kiáramló spermát (25. ábra).



25. ábra. Zebradánió hím fejése mikroszkóp alatt. Saját felvétel.

Zebradánió esetében a sperma minőségi paramétereinek a meghatározásához is a már fentebb említett számítógépes spermavizsgáló rendszert alkalmaztam (Minitüb GmbH AndroVison,

Németország). A sperma minőségi mutatóit frissen, illetve egy másik fejés alkalmával felolvasztás után is megnéztem. A két vizsgálat elkülönítésére azért volt szükség, mert a zebradánió hímek kis mennyiségű (<1 µl) spermát adnak. A mélyhűtést Caetano és munkatársai (2019) által kidolgozott módszer alapján végeztem el. A spermát hígítóval (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH: 8,0±0,2, Horváth et al., 2003) hígítottam, majd metanolt adtam hozzá, úgy, hogy a végkoncentráció 8%-a legyen. A mintákat 0,25 ml-es műszalmákba szívtam fel. A mélyhűtést programozható mélyhűtő berendezés (IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria) segítségével végeztem el, 10 °C/perc hűtési sebesség mellett. A mintákat folyékony nitrogénben tároltam. Későbbi felhasználás előtt a műszalmákat, 5 másodpercig 40 °C-os vízfürdőbe (Thermo Haake P5, Thermo Electron Corp, Waltham, Massachusetts, USA) helyeztem.

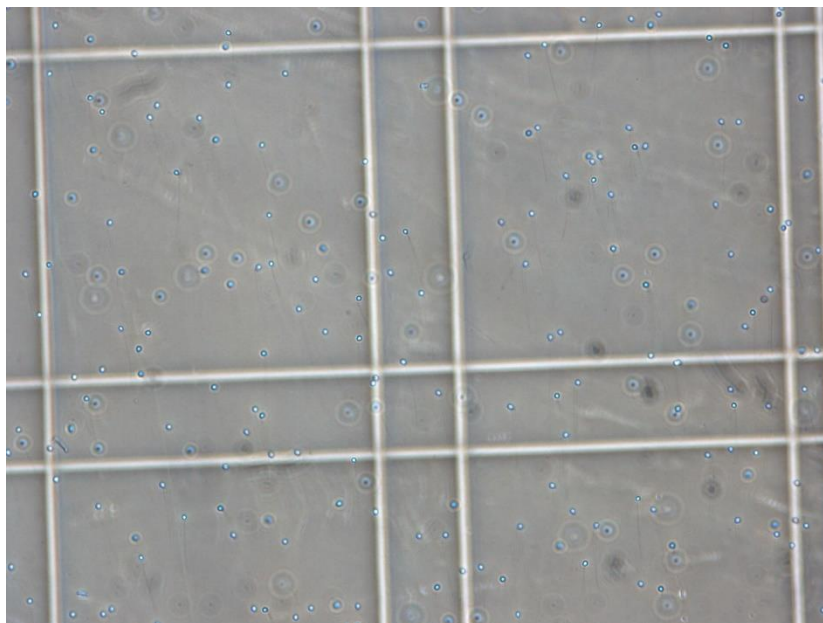
3.5 Sperma koncentráció vizsgálata, illetve koncentráció szerinti mélyhűtése

A doktori kutatómunka során, a nagy elemszám, illetve kísérletszám miatt fontos volt egy olyan módszer kidolgozása a sperma denzitásának meghatározására, amellyel az könnyen és gyorsan meghatározhatóvá válik. Így a denzitás méréséhez két különböző eszköz eredményeit igazítottam a már ismert, Bürker-Türk kamrával történő, manuális sejtszámoláshoz. Egy plate leolvasó spektrofotométert (Thermo Scientific Varioskan Lux) és a már fentebb említett számítógépes spermavizsgáló rendszert (CASA; Computer-assisted sperm analysis, Minitüb GmbH AndroVison) használtam a sperma koncentrációjának gyorsabb meghatározásához.

3.6 Mikroplate leolvasó spektrofotométerrel mért sejtdenzitás

A mikroplate olvasó spektrofotométeres vizsgálathoz 9 db, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének recirkulációs rendszerében tartott ponty spermáját használtam fel. A mintákat ezerszeres, illetve kétezerszeres hígítást alkalmazva, a nagyobb pontosság elérése érdekében, két lépcsőben hígítottam. Első körben 990 és 995 μL hígítóhoz (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0) adtam 10 és 5 μL spermát. A már kihígított mintából 100 μL -t adtam 900 μL hígítóhoz. A minták abszorbanciáját rázás után 505 nanométeren mértem meg. Ezt követően a kihígított minták sűrűségét Bürker-Türk kamra segítségével állapítottam meg.

A Bürker-Türk kamrával végzett mérésnél 10-10 μL mintát töltöttem a fedőlemez alá (26. ábra). Összesen 10 darab nagy négyzetben számoltam meg a sejteket, majd ezeknek az átlagát vettem a további eredmények megállapításához. A hígításokat minden minta esetében háromszor ismételtam meg.

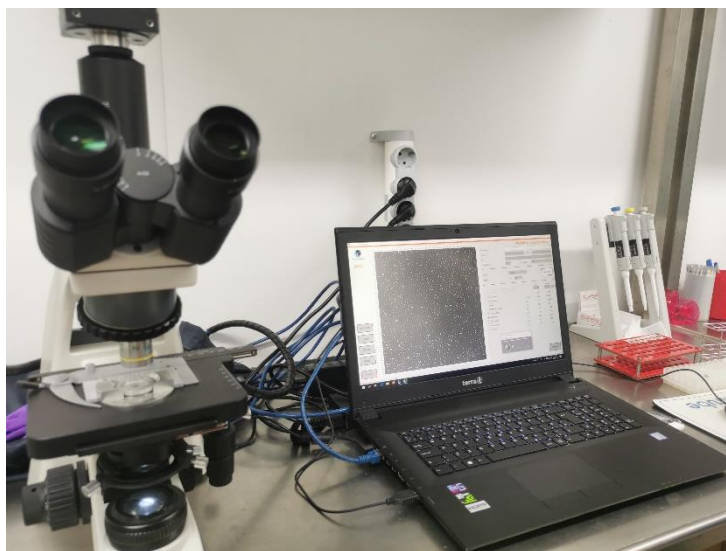


26. ábra. Sejtkoncentráció Bürker-Türk kamrával mérve, mikroszkópon keresztül. Saját felvétel.

3.7 CASA-val mért sejtkoncentráció

A vizsgálathoz 12 db, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének recirkulációs rendszerében tartott ponty (P) spermáját használtam fel. A vizsgálatok elvégzéséhez a már említett CASA-t (AndroVision, Minitüb, Tiefenbach, Germany) és a számítógéphez csatolt, 10 \times nagyítású negatív fáziskontrasztú objektívvel felszerelt Motic BA310 mikroszkópot használtam. A mintákat 100-szorosára hígítottam, majd a hígított, immobilizált mintából 3 μL -t cseppenttem a Makler-kamrára, ezután a CASA segítségével mértem meg a sejtkoncentrációt (27. ábra). A pontos meghatározás érdekében a már hígított mintákat tovább hígítottam, hogy azok elérjék az 1000-szeres hígítást, majd a sejtszámot, ahogyan a spektrofotométeres vizsgálat

esetében is, Bürker-Türk kamra segítségével is megállapítottam. A minél nagyobb pontosság elérése érdekében mindegyik mérést háromszor ismételt meg.



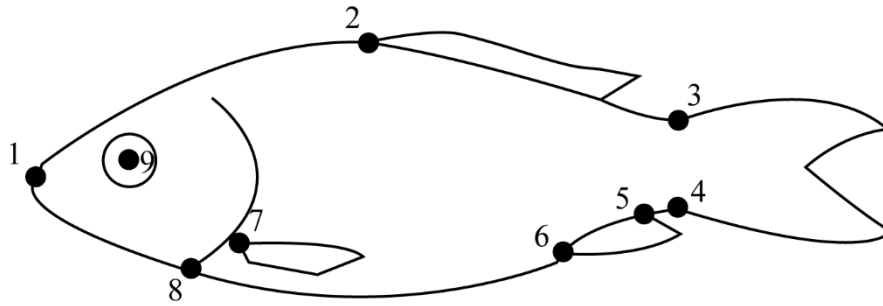
27. ábra. A CASA, (AndroVision, Minitüb, Tiefenbach, Germany) amellyel sejtdenzitás is mérhető. Saját felvétel.

3.8 Sejtdenzitás és a mélyhűtés eredményessége közötti összefüggés

A későbbi mélyhűtéses munkák miatt fontos volt annak a meghatározása, hogy a mélyhűtés hatékonyságát befolyásolja-e a koncentráció. Ezért előkísérleteimben elvégeztem pontyban különböző koncentrációk szerinti mélyhűtést is. Öt különböző hím spermáját használtam fel, amelyeket a következőképpen hígítottam: $0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 2×10^9 , 4×10^9 sejt/ml és standard 1:9 arányú. A sejtdenzitások eléréséhez a mintákat a már fentebb említett hígítóval hígítottam (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0). A denzitási értékeket a standardizált CASA segítségével becsültem meg. Az 1:9 arányú hígítás kontrollként szolgált, amely körülbelül $1,2-2,1 \times 10^9$ sejt/ml-nek feleltethető meg. A mélyhűtést Horváth és munkatársai (2003) módszere alapján végeztem el, majd felolvasztás után a különböző motilitási paramétereket CASA-val mértem meg. A mintákat 2%-os szarvasmarha szérum albumint (BSA) tartalmazó rendszervízben aktiváltam, 1:5 hígítási arányban.

3.9 Morfológiai, testsúly és hossz különbségek meghatározása

Pontyok esetében a második generáció egyedeit egy Nikon D7200 DSLR típusú, AF-S Nikkor 35 mm 1:1.8G objektívvel ellátott fényképezőgéppel fotóztam le. A morfológiai vizsgálat során 6 csoport (3 mélyhűtött, 3 friss) egyedeit vizsgáltam. 177 friss spermából, illetve 173 mélyhűtött spermából született pontyot fotóztam le. A halakon összesen 9 darab mérőpontot vettem fel (28. ábra). Ezekhez a pontokhoz igazítva mértem a csoportok közötti különbségeket.



28. ábra. Mérőpontok felvétele a pontyokon.

3.10 Statisztikai analízis

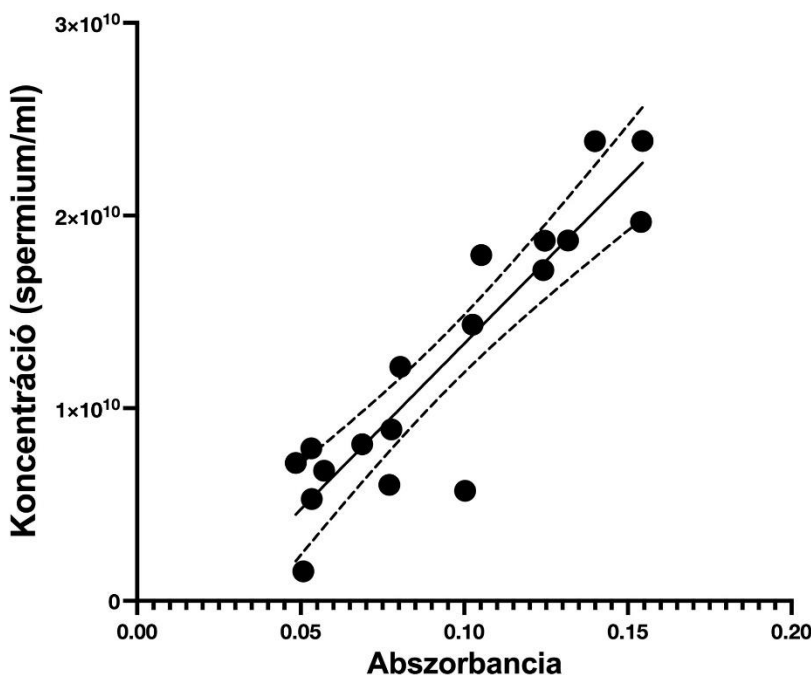
Az adatok kiértékeléséhez Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA), Microsoft Office Excel (Mondo 365) és JASP (0.14.3) szoftvert használtam. Lineáris regressziót alkalmaztam a CASA, illetve spektrofotométer adatainak Bürker-Türk kamrával számított eredményeinek összehasonlításához. A mélyhűtött, illetve friss spermából származó egyedek motilitási paramétereinek egymáshoz viszonyításához egy-, illetve többváltozós ANOVA-t, illetve Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztam. A termékenyülési adatok összefüggésének megállapításához Welch-próbát és Dunnett-próbát használtam. A szignifikancia-szintet $p = 0,05$ értékben határoztam meg. A második generációs pontyok hosszát ImageJ szoftver segítségével állapítottam meg. Ezek után a képeket tpsUtil (Rohlf, 2015), tpsDig2 (Rohlf, 2005) és MorphoJ (Klingenberg, 2011) szoftverek segítségével, kanonikus variancia-analízissel értékeltem ki.

4 Eredmények

4.1 Ponty

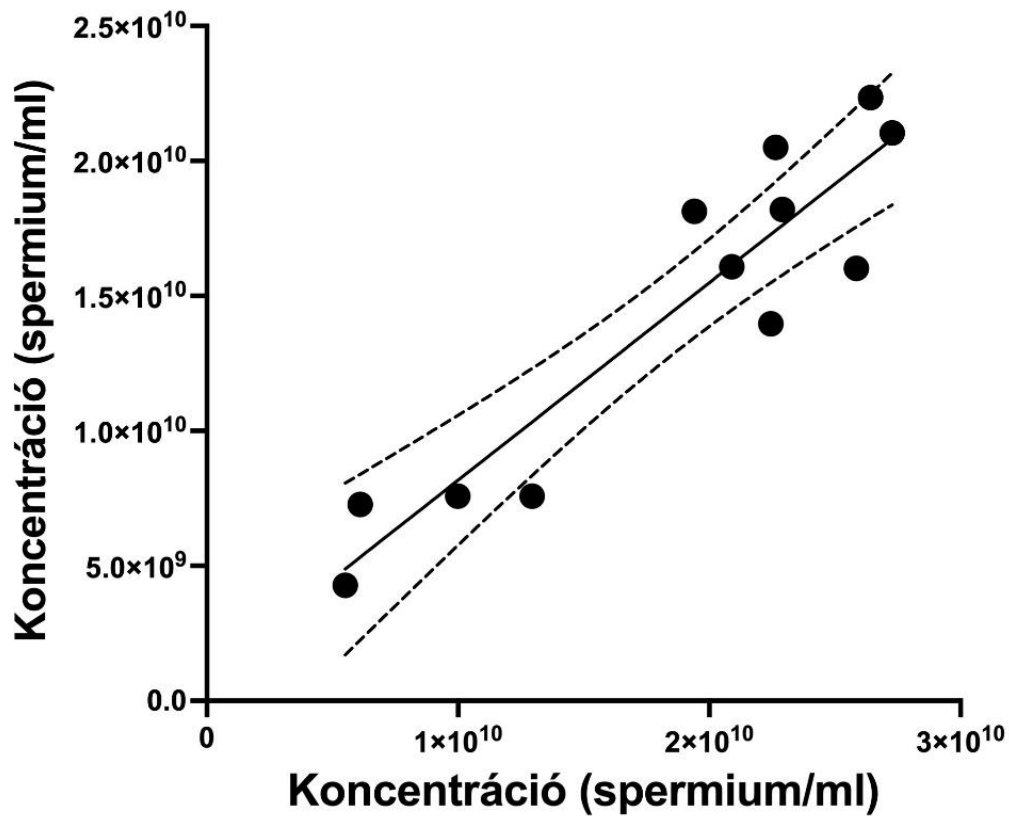
4.1.1 A ponty spermakonzentrációjának vizsgálata, illetve koncentráció szerinti mélyhűtése

A szülői nemzedék esetében a spermát előzetes vizsgálatoknak vettem alá a mélyhűtés tökéletesítése érdekében. Kísérletemben először spektrofotométerrel mértem meg az abszorbanciát, amelyet a standard, Bürker-Türk kamrával mért sejtkoncentrációval hasonlítottam össze. Pozitív irányú lineáris korrelációt találtam a spektrofotométerrel mért eredmények és a spermakonzentráció között ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.8289$, $1.849 \times 10^{10} \pm 3.853 \times 10^9$, 29. ábra).



29. ábra. Spektrofotométerrel és Bürker-Türk kamrával mért sejtkoncentrációk közötti lineáris összefüggés pontysperma esetén. $y = 1,363 \times 10^{11}x + 1,576 \times 10^9$ ($r^2 = 0,7602$, $p = 0,0022$).

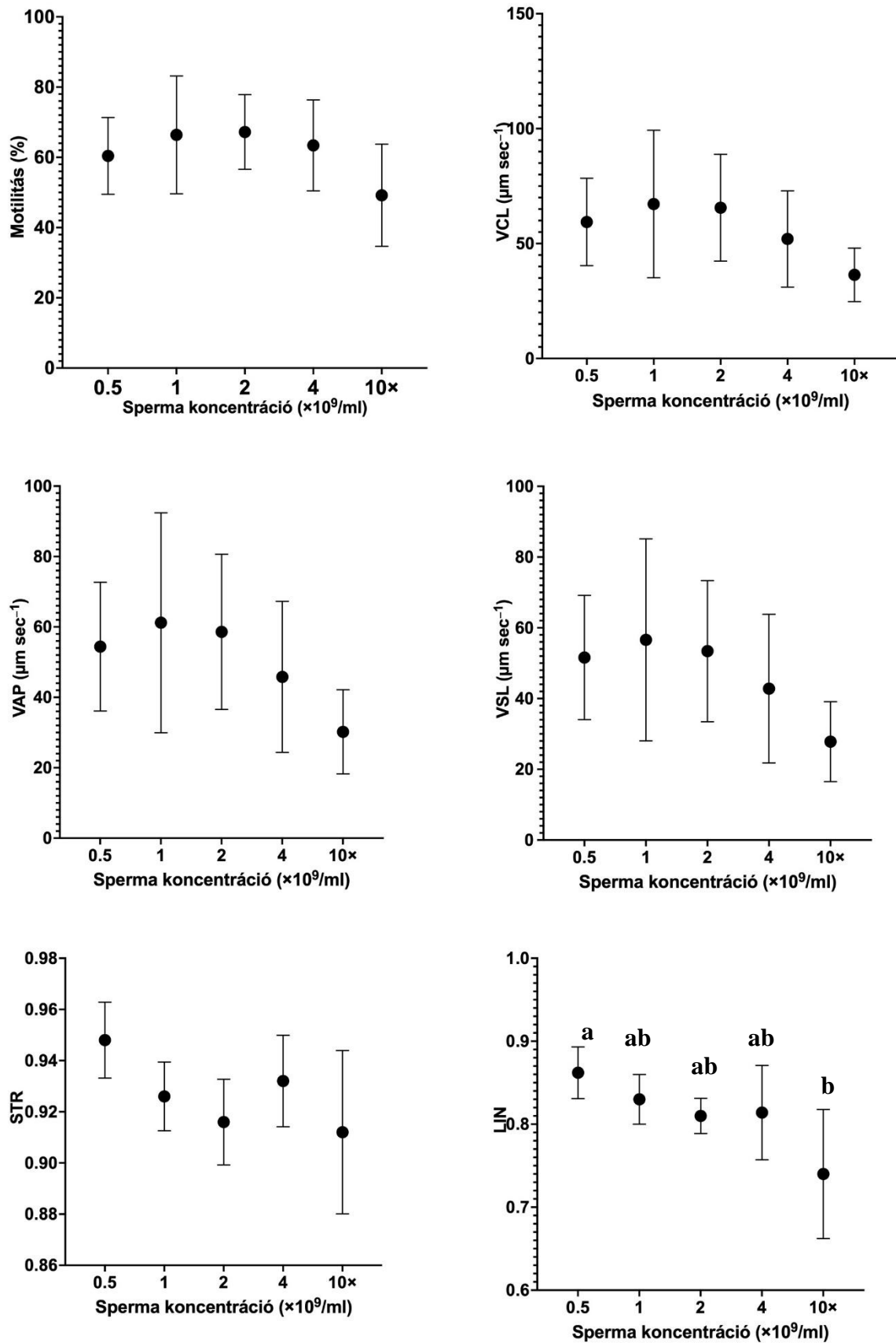
A spektrofotométeres kísérletek után CASA-val is megmértem a sejtdenzitást, majd a meghatározott értékeket szintén a standard, Bürker-Türk kamrával mértekhez igazítottam. Nem találtam szignifikáns különbséget ($p = 0,1685$, $N = 12$) a CASA-val ($1,853 \times 10^{10} \pm 7,854 \times 10^9$ spermium/mL) és a Bürker-Türk kamrával mért ($1,442 \times 10^{10} \pm 6,212 \times 10^9$ spermium/mL) sejtkoncentráció között sem. A CASA-val mért adatok ($p < 0,0001$, $r^2 = 0,8559$, $y = 0,7317x + 8,555 \times 10^8$) is lineárisan korreláltak a Bürker-Türk kamrával számolt adatokkal (30. ábra). Fontos azonban megemlíteni, hogy a vizsgálatokhoz immobilizált spermát használtam. CASA-val vizsgálva a mozgó spermiumok fals értéket adhatnak a sejtdenzitásról.



30. CASA-val és Bürker-Türk kamrával mért sejtdenzitások közötti lineáris összefüggés. X tengely: CASA-val mért, Y tengely: Bürker-Türk kamrával mért, $y = 0,7317x + 8,555 \times 10^8$ ($r^2 = 0,8559, p < 0,0001$).

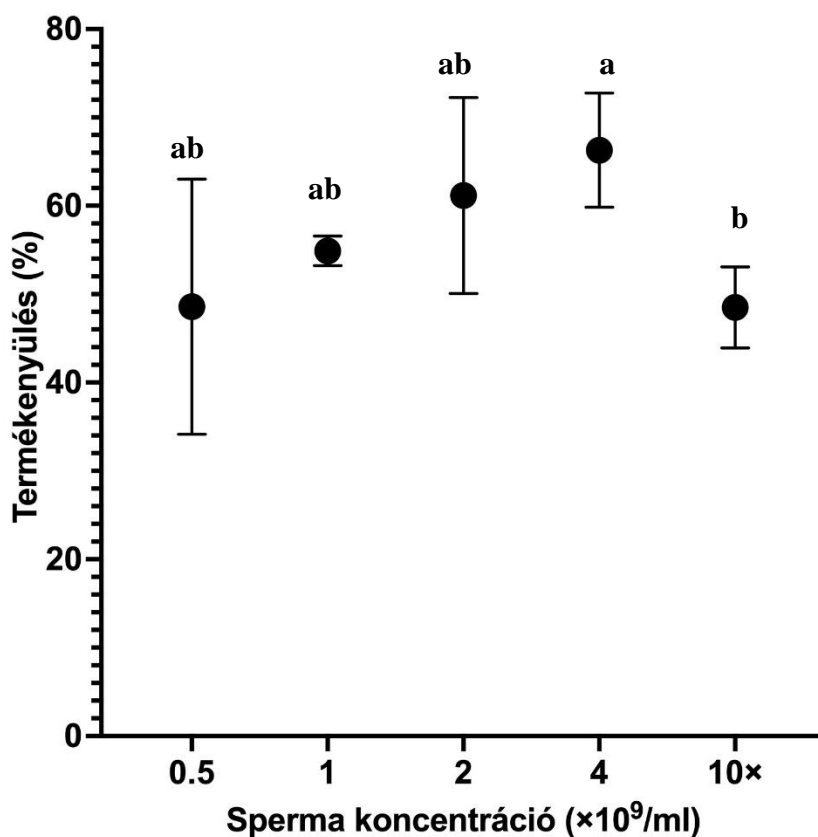
További vizsgálataimhoz a CASA-t használtam sejtdenzitás mérésére is. Ez azért volt praktikus, hiszen a számítógépes spermavizsgáló rendszer elengedhetlen részét képezte a motilitási paraméterek mérésének is. Ennek alapján készítettem el a következő kísérlet alapjait, amelyben meg szerettem volna állapítani, hogy a műszalmában lévő sejtkoncentráció befolyásolhatja-e a mélyhűtés eredményességét.

Öt különböző koncentrációban hígított ($0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 2×10^9 , 4×10^9 sejt/ml és standard 1:9 arányú) spermát mélyhűtöttem. A minták felolvasztása után nem találtam szignifikáns eltérést a CASA-val mért adatokban. A kivétel a LIN értéke volt, ahol a post-hoc teszt által szignifikáns különbséget ($p = 0,0056$) találtam a $0,5 \times 10^9$ spermium/mL ($0,86 \pm 0,03$) és az 1:9-es hígítású minták között ($0,74 \pm 0,08$; 31. ábra).



31. ábra. Különböző koncentrációban ($0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 2×10^9 , 4×10^9 sejt/ml és standard 1:9 arányú) mélyhűtött pontysperma minták különböző motilitási paramétereit (progresszív motilitás, VCL, VAP, VSL, STR, LIN) felolvasztás után. A különböző betűk (a, b) eltérő szignifikancia szinteket jelölnek ($p < 0,05$).

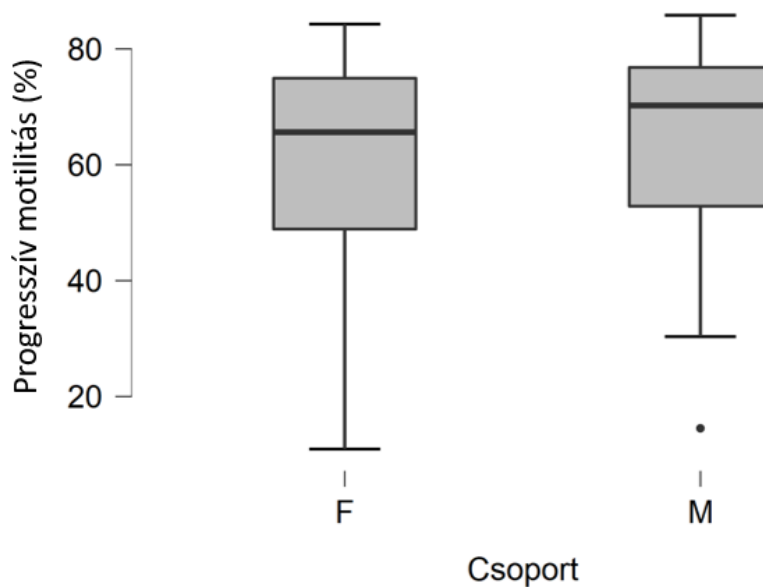
A másik, statisztikailag igazolható különbség a termékenyítőképességben mutatkozott meg. A post-hoc teszt egy esetben mutatott szignifikáns különbséget ($p = 0,0121$), még hozzá a 4×10^9 spermium/ mL ($66 \pm 6\%$) és a kontroll, vagyis az 1:9 hígítású, felolvasztott minták esetében ($49 \pm 5\%$; 32. ábra).



32. ábra. A termékenyülés és a sejtkoncentráció közötti összefüggés pontyban. A különböző betűk (a, b) eltérő szignifikancia szinteket jelölnek ($p < 0,05$). Szignifikáns eltérés egyedül a standard hígítás és a legnagyobb, 4×10^9 spermium/ mL koncentráció között volt tapasztalható.

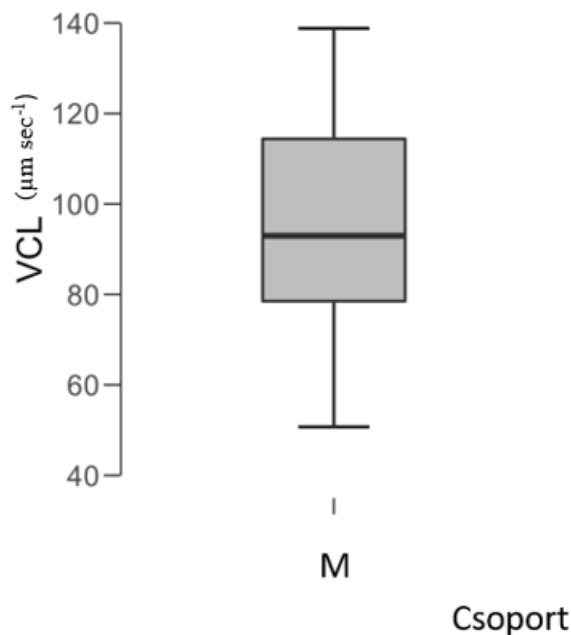
4.1.2 A ponty első generációjának spermavizsgálata

Összesen 3 időpontban vettem az egyedektől spermát, amelyet a motilitási vizsgálatok elvégzése után mélyhűtöttem. Eredményeim alapján a mintavétel időpontja ($p < 0,001$) épp úgy, mint az eredet ($p = 0,024$; 33. ábra), szignifikánsan befolyásolták a felolvasztás utáni progresszív motilitást.



33. ábra. Friss (F) és mélyhűtött (M) spermával végzett termékenyítésből származó teljes testvér ponty (*Cyprinus carpio*) egyedek mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni motilitása négy mintavételi időpontban. A statisztikai vizsgálat (kétszemponos varianciaanalízis) alapján a minták származásának ($p = 0,024$) statisztikailag szignifikáns hatása volt az eredményekre.

Az eredet, tehát hogy az, hogy az egyedek mélyhűtött vagy friss spermával történő termékenyítésből származtak, nem volt hatással a VCL-re (34. ábra), ahogyan a többi sperma minőségét leíró paraméterre (VAP, VSL, STR, LIN) sem.

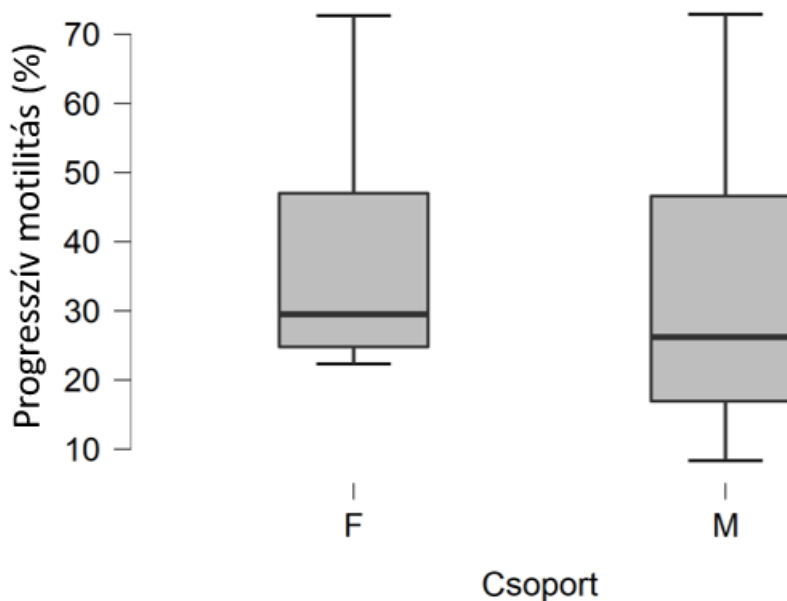


34. ábra. Friss (F) és mélyhűtött (M) spermával végzett termékenyítésből származó teljes testvér ponty (*Cyprinus carpio*) egyedek mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni ténylegesen megtett útvonalra számított sebessége (VCL). A statisztikai vizsgálat (kétszemponos varianciaanalízis) alapján a minták származásának nem volt szignifikáns hatása ($p > 0,05$) az eredményekre.

A termékenyítést mélyhűtött spermával, 10.000:1 spermium-ikra aránnyal végeztem el. A mélyhűtött ($87 \pm 5\%$) és friss ($86 \pm 13\%$) spermából született egyedek spermájának termékenyítőképesége statisztikailag igazolhatóan nem tért el ($p = 0,86$) egymástól.

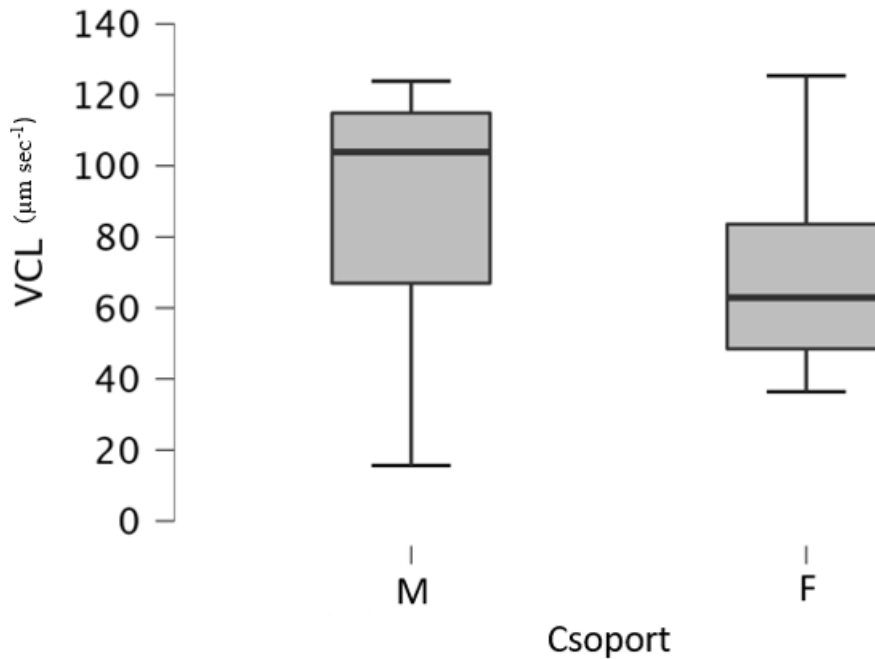
4.1.3 A ponty második generációjának spermavizsgálata

A pontyok második generációja esetében nem találtam szignifikáns ($p = 0,609$) eltérést a mélyhűtött ($32 \pm 22\%$), illetve a friss spermából született egyedek felolvasztott spermájának ($38 \pm 20\%$) progresszív motilitása között (35. ábra).



35. ábra. Második generáció adatai. Friss (F) és mélyhűtött (M) spermával végzett termékenyítésből származó teljes testvér ponty (*Cyprinus carpio*) egyedeinek mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni motilitása. A két csoport között nem volt szignifikánsan igazolható ($p = 0,609$) különbség.

Az eredet, tehát hogy az, hogy az egyedek mélyhűtött vagy friss spermával történő termékenyítésből származtak, nem volt hatással a VCL-re (36. ábra), ahogyan a többi sperma minőségét leíró paraméterre (VAP, VSL, STR, LIN) sem.



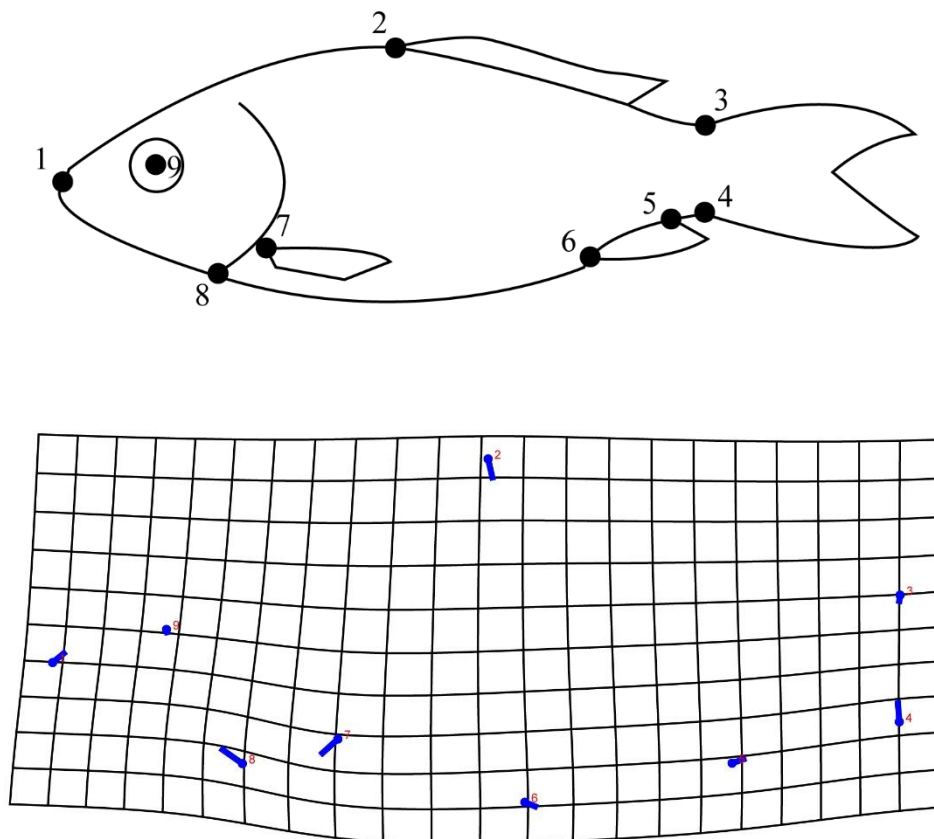
36. ábra. Második generáció adatai. Friss (F) és mélyhűtött (M) spermával végzett termékenyítésből származó teljes testvér ponty (*Cyprinus carpio*) egyedeinek mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni ténylegesen megtett útvonalra számított sebessége (VCL). A statisztikai vizsgálat (kétszemponos varianciaanalízis) alapján a minták származásának nem volt szignifikáns hatása ($p > 0,05$) az eredményekre.

A sejtkoncentráció meghatározásánál sem találtam statisztikailag igazolható eltérést ($p = 0,0516$) a két csoport között. Meg kell azonban említenem, hogy a mélyhűtött spermából született egyedek spermájának denzitása ($1 \times 10^{10} \pm 2,5 \times 10^9$ spermium/ ml) lényegesen magasabb volt, mint a friss spermából született egyedeké ($7 \times 10^9 \pm 3 \times 10^9$ spermium/ ml).

4.1.4 A ponty második utódnemzedékének testhossz, illetve morfológiai különbségei

A második generáció vizsgálata során a testhosszban nem találtam statisztikailag kimutatható különbséget ($p = 0,4078$) a friss ($N = 173$; 55 ± 13 mm), illetve a mélyhűtött ($N = 176$; 55 ± 13 mm) spermából született csoportok esetén.

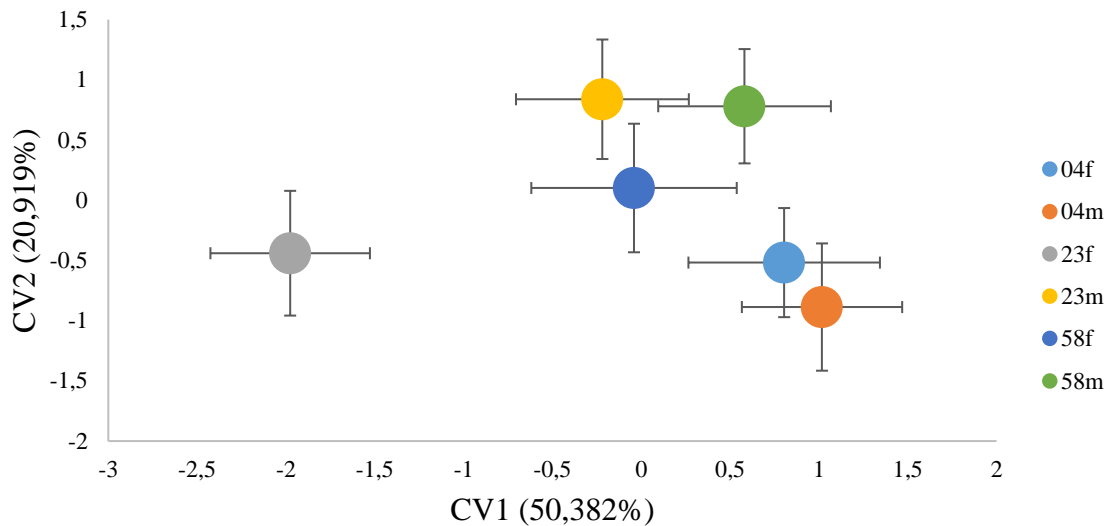
Annak ellenére, hogy a testhosszban nem találtam szignifikáns eltérést a két csoport között, a mélyhűtött spermából született egyedek morfológiailag eltértek a friss spermából született egyedektől. Ennek az eltérésnek a thin plate spin módszerrel történő ábrázolását láthatjuk a 37. ábrán.



f -- m

37. Ábra. Morfológiai eltérések a friss spermából (F), illetve mélyhűtött spermából (M) született ponty egyedek között, thin plate spline módszerrel ábrázolva.

A mélyhűtött spermából született egyedekről elmondható, hogy átlagosan kisebb fejjel, alacsonyabb háttal és keskenyebb faroknyéllel rendelkeztek. A következő, 38. ábrán a CV tengelyek mentén a különböző csoportok elkülönülése látható, ahol CV1 nagyobb varianciát hordoz, mint CV2, így súlyozva a tengelyek léptékét. A sperma milyensége (mélyhűtött vagy friss), amelyből az F2 generáció egyedei származtak, szignifikánsan befolyásolta ($p < 0,001$) az egyedek alakját. Az adatokon elvégzett CVA eredményei alapján az összes mélyhűtött spermából született csoport különbözött a friss spermából született egyedek csoportjaitól.



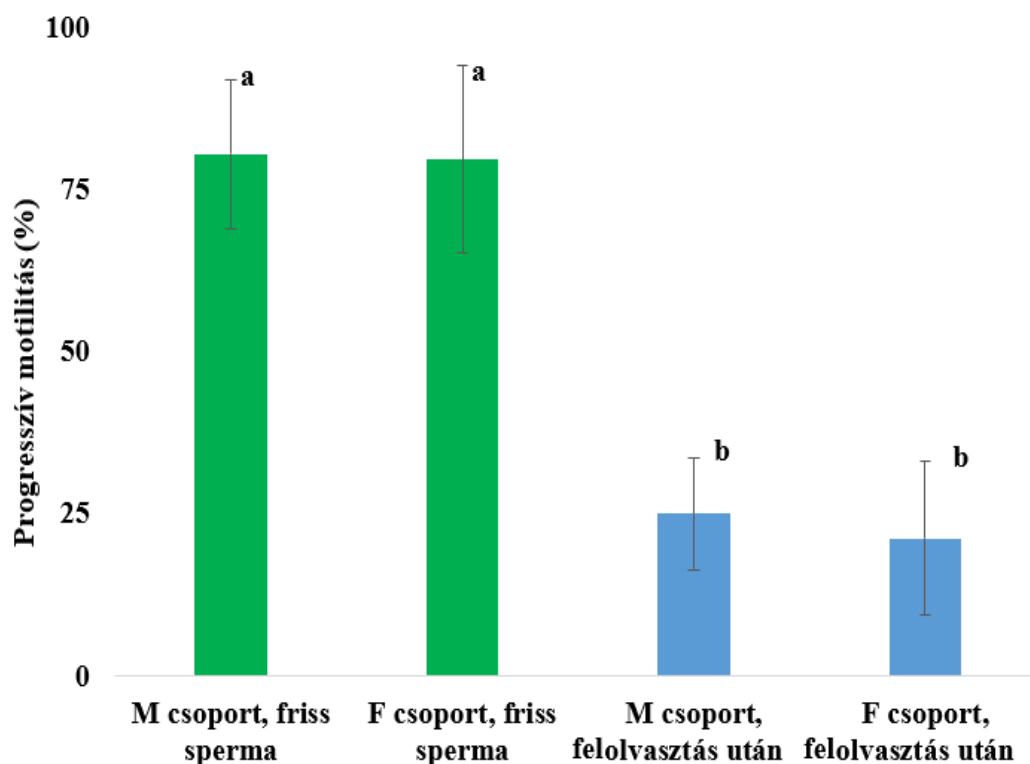
38. ábra. Kanonikus variancia-analízissel mért, friss spermából (f), illetve mélyhűtött spermából (m) született pontyok testalakjának eltérése. A szimbólumok a csoportátlagot, a szálkeresztek pedig a csoportok szórását mutatják.

4.2 Zebradánió

A következő fejezetekben a zebradánió egyedeken végzett kutatások eredményeit szeretném bemutatni. Zebradánió esetében összesen három generációt hoztam létre. Mindhárom generációnál megnéztem az egyedek spermájának minőségi paramétereit. Sejtszámolást is végeztem annak érdekében, hogy kiderítsem, van-e különbség a mélyhűtött spermából született egyedek, illetve a friss spermából született egyedek spermája között. Az első, illetve harmadik generáció esetében vizsgáltam a sperma termékenyítőképességét is.

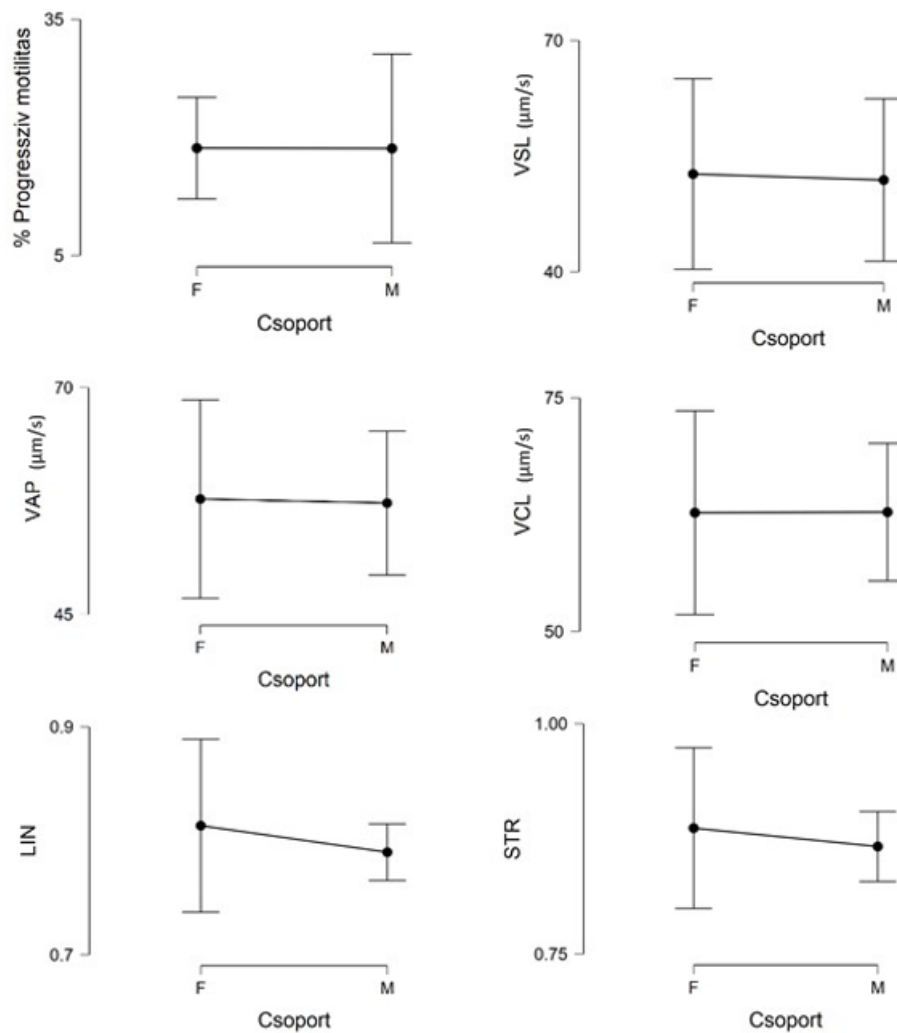
4.2.1 Zebradánió első generáció (F1)

Az első generáció esetében különböző kísérleteket végeztem a sperma minőségének meghatározáshoz. A mélyhűtött, illetve friss spermából született egyedek spermáját először frissen vizsgáltam meg CASA segítségével. A friss eredmények között nem találtam szignifikáns különbséget ($p = 0,9$). A csoportátlagok is megegyeztek (friss spermából született egyedek $80 \pm 11\%$, mélyhűtött spermából született egyedek $80 \pm 14\%$). A friss és a mélyhűtött progresszív motilitási eredmények az elvárásoknak megfelelően statisztikailag igazolhatóan különböztek egymástól ($p < 0,001$; 39. ábra).



39. ábra. Mélyhűtött spermából született egyedek (M) és friss spermából született egyedek (F) spermájának progresszív motilitási értékei mélyhűtés előtt (zöld oszlopok), illetve felolvasztás után (kék oszlopok). Az eltérő betűk (a, b) eltérő szignifikancia szinteket jelölnek ($p < 0,05$).

A mélyhűtött ($25 \pm 8\%$), illetve a friss ($21 \pm 12\%$) spermából született egyedek spermájának felolvasztás utáni progresszív motilitása sem különbözött szignifikánsan ($p = 0,73$), ahogyan a VCL, VAP, VSL, STR és LIN értékek sem (40. ábra).

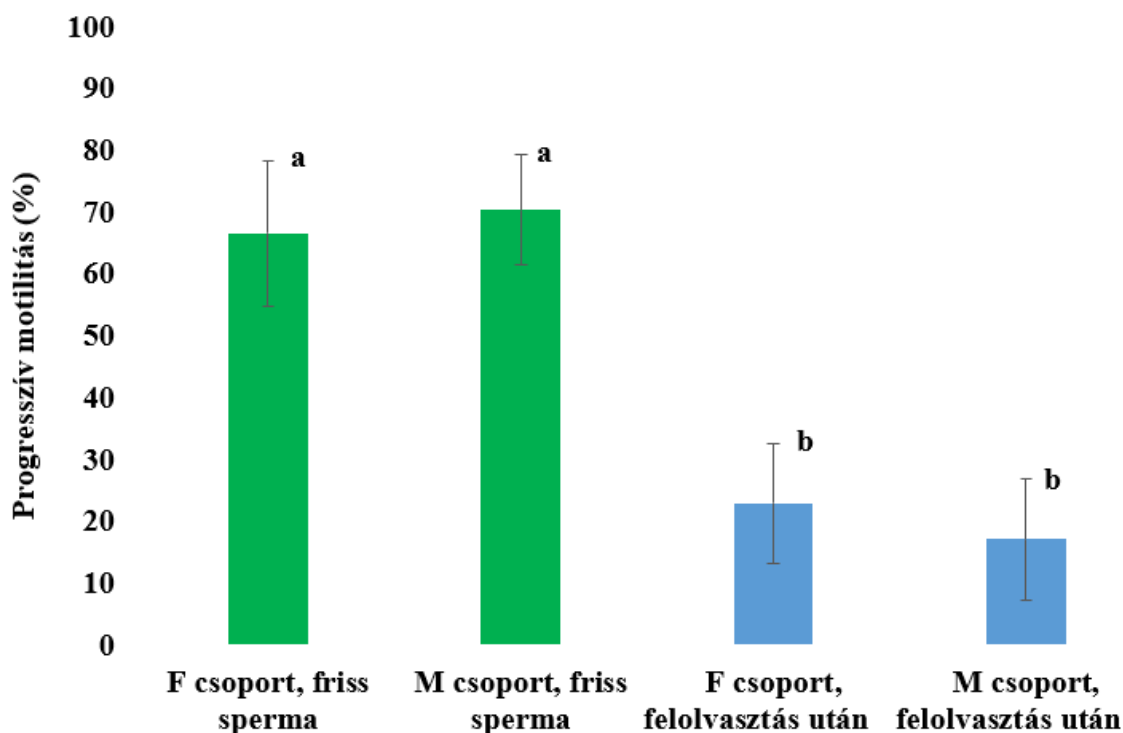


40. ábra. A mélyhűtött (M) és friss (F) spermából született egyedek spermájának felolvasztás utáni, CASA segítségével mért motilitási értékei (progresszív motilitás, VSL, VAP, VCL, LIN, STR) esetében nem találtam szignifikáns különbséget ($p > 0,05$).

A Bürker-Türk kamrával mért spermakonzentráció sem mutatott szignifikáns ($p = 0,56$) eltérést a mélyhűtött ($5 \pm 4 \times 10^8$ spermium/ ml) és a friss spermából született egyedek ($4 \pm 3 \times 10^8$ spermium/ ml) között. A termékenyítéshez 5000:1 spermium-ikra arányt alkalmaztam, kontrollként pedig friss spermával termékenyítettem. A termékenyítőképeségben sem mutatkozott eltérés ($p = 0,73$) a friss ($1 \pm 3\%$) és a mélyhűtött spermából született egyedek ($1 \pm 1\%$) között, habár meg kell jegyezni, hogy a termékenyülési százalék nagyon alacsony volt. Eredményeim szerint a két csoport spermája között nem volt minőségi és mennyiségi eltérés az első generáció esetében.

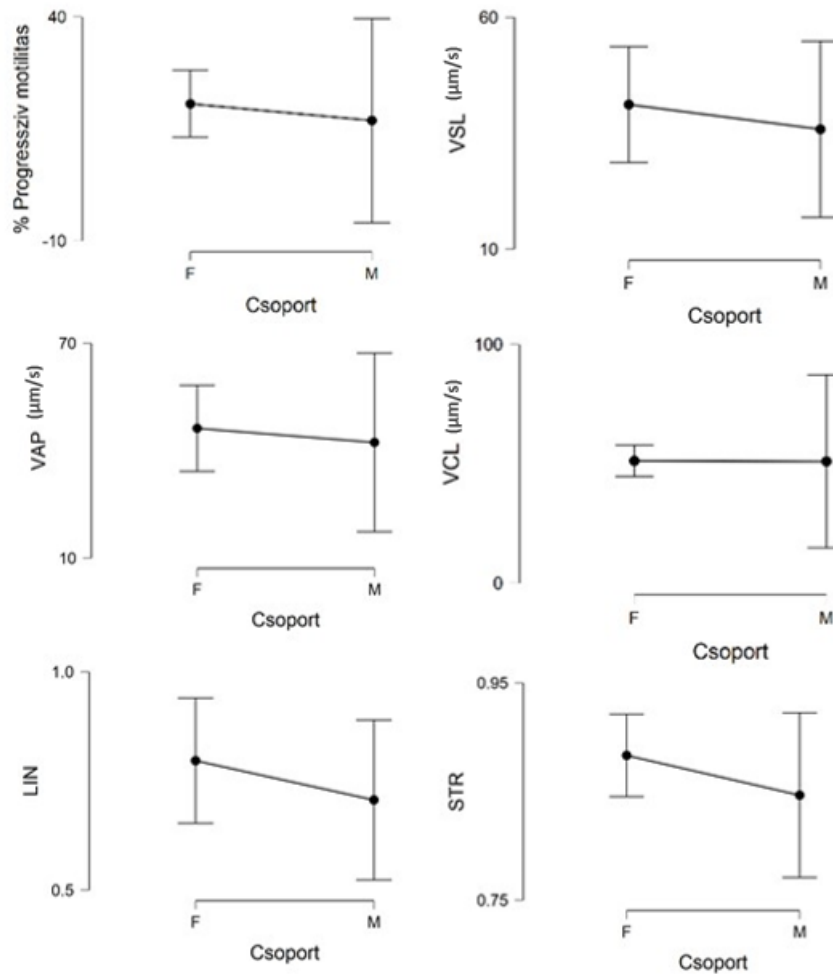
4.2.2 Zebradánió második generáció (F2)

Az F2 generáció spermaminőségének feltérképezése érdekében a termékenyítési kísérlet kivételével ugyanazokat a vizsgálatokat végeztem el, mint az F1 generációnál. A CASA-val mért friss motilitási adatok a második generációnál sem mutattak szignifikáns különbséget ($p = 0,281$). A friss spermából született egyedek friss spermájának progresszív motilitása $67 \pm 12\%$, a mélyhűtött spermából született egyedeké pedig $70 \pm 9\%$ volt. Nem meglepő módon, a friss progresszív motilitási eredmények a második generáció esetében is, mindkét csoportnál szignifikánsan eltérnek ($p < 0,001$) a felolvasztás után mért értékekhez képest (41. ábra). Ez alátámasztja azt a megfigyelést, miszerint a mélyhűtésnek hatása van a sperma minőségére.



41. ábra. Mélyhűtött spermából született egyedek (M) és friss spermából született egyedek (F) spermájának progresszív motilitásiértékei mélyhűtés előtt (zöld oszlopok), illetve felolvasztás után (kék oszlopok). Az eltérő betűk (a, b) eltérő szignifikancia szinteket jelölnek ($p < 0,05$).

A felolvasztott minták esetében nem volt szignifikáns ($p = 0,54$) különbség a mélyhűtött ($17 \pm 9\%$), illetve a friss spermából született egyedek ($21 \pm 3\%$) spermájának progresszív motilitása, illetve a VCL, VAP, VSL, STR és LIN értékei sem tértek el statisztikailag igazolható mértékben (42. ábra).

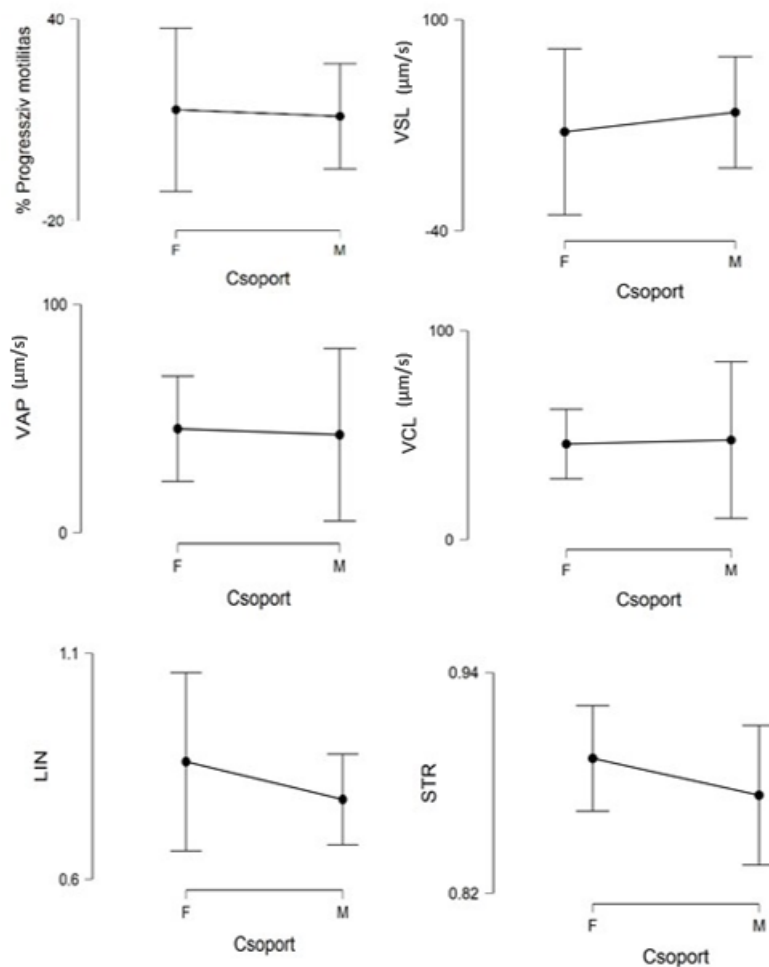


42. ábra A mélyhűtött (M) és friss (F) spermából született F2 egyedek spermájának felolvasztás utáni, CASA segítségével mért motilitási értékei (progresszív motilitás, VSL, VAP, VCL, LIN, STR) esetében nem találtam szignifikáns különbséget ($p > 0,05$).

A spermakonzentrációt mérve sem tapasztaltam szignifikáns eltérést ($p = 0,073$) a mélyhűtött ($1 \pm 2 \times 10^9$ spermium/ ml), illetve friss spermából született egyedek ($2 \pm 1 \times 10^9$ spermium/ ml) között. Eredményeink azt támasztják alá, hogy az F2 generáció esetén sem tért el a sperma minősége a vizsgált csoportok között.

4.2.3 Zebradánió harmadik generáció (F3)

Az F3 generáció esetében ugyanúgy, mint az első generációnál, mindhárom minősítési módszerrel megvizsgáltam a csoportok spermáját (CASA, termékenyítés, koncentráció). A friss sperma esetében itt sem találtam szignifikáns különbséget a csoportok között ($p > 0,05$). Ahogyan a felolvasztott sperma között sem volt statisztikailag igazolható ($p = 0,781$) eltérés a mélyhűtött ($30 \pm 16\%$), illetve a friss spermából ($15 \pm 2\%$) született egyedek progresszív motilitási értékei között, valamint a VCL, VAP, VSL, STR és LIN értékekben sem találtam statisztikailag igazolható különbséget (43. ábra).



43. ábra A mélyhűtött (M) és friss (F) spermából született F2 egyedek spermájának felolvasztás utáni, CASA segítségével mért motilitási értékei (progresszív motilitás, VSL, VAP, VCL, LIN, STR) esetében nem találtam szignifikáns különbséget ($p > 0,05$).

Szignifikáns különbség ($p = 0,44$) a mélyhűtött ($2 \pm 1 \times 10^9$ spermium/ ml), illetve a friss spermából (2×10^9 spermium/ ml) született egyedek spermakonzentrációja között sem volt. A termékenyülési eredmények szintén nem különböztek igazolható mértékben ($p > 0,05$) a mélyhűtött ($5 \pm 7\%$), illetve a friss csoport ($5 \pm 9\%$) egyedeinél. Mivel egyik generáció esetében sem találtam szignifikáns különbséget a spermiumok minőségét leíró paraméter között, ezért kutatásaimat nem folytattam tovább zebraadánióban. További vizsgálataimban a pontyra koncentráltam.

5 Eredmények értékelése

A sejtkoncentráció vizsgálata során azt találtam, hogy a mélyhűtés előtti koncentráció mérésének nagy szerep juthat. Magasabb sejtszámot alkalmazva ugyanis a termékenyítőképesség növelhető, ami egybeesik Babiak és munkatársai (1997) eredményeivel. Az ő kísérletükben $27,5 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ 80%-os progresszív motilitású spermát mélyhűtöttek le műszalmánként, majd ezzel termékenyítettek és hígítótól függően 4,0-72,9%-os termékenyülést kaptak. Saját kísérleteimben ennél kisebb sejtkoncentrációt ($0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 2×10^9 , 4×10^9 sejt/ml és standard 1:9 arányú) alkalmaztam műszalmánként, azonban szignifikáns különbséget ($p = 0,0121$) kaptam a $4 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ ($66 \pm 6\%$) és a kontroll, vagyis az 1:9 hígítású ($1,2\text{--}2,1 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$) felolvasztott minták esetében ($49 \pm 5\%$).

Az is megállapítható, hogy a megfelelően megválasztott sejtkoncentráció növelheti egyes felolvasztás utáni motilitási paraméterek értékét, esetünkben a LIN-t. Szignifikáns különbséget ($p = 0,0056$) találtam ugyanis a $0,5 \times 10^9$ spermium/ml ($0,86 \pm 0,03$) és az 1:9 hígítású minták között ($0,74 \pm 0,08$). Ez az eredmény egybeesik Nascimento és munkatársai (2021) által közölt adatokkal. Mélyhűtésnél ugyanis kecségénél (*Acipenser ruthenus*) kisebb sejtdenzitást ($0,01\text{--}0,31 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$) alkalmazva 50% fölötti felolvasztás utáni értéket mértek, amíg magasabb sejtszámnál ($0,92\text{--}4,58 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$) ez az érték 15 % alá csökkent. Cuevas-Uribe és munkatársai (2011) is kiemelték a műszalmánkénti sejtkoncentráció mérésének fontosságát, habár ez az akvakultúra ágazataiban azóta sem terjedt el széleskörűen.

Ezek az eredmények azért is érdekesek, mert amíg a nagyobb sejtkoncentráció magasabb termékenyülési százalékot eredményez, addig egyes motilitási értékeket negatívan befolyásol. A motilitás csökkenésének oka a hígítási arány megváltozása, amely irodalmi adatok alapján 1:9 körül optimális (Horváth et al., 2003). Ezt azonban a termékenyítéskor kompenzálja a nagyobb sejtkoncentráció, mert abszolút mennyiségben több sejt mozog és tud termékenyíteni. Ez ellentmond azoknak a kutatásoknak, amelyek szerint a motilitási értékek és a termékenyítőképesség között lineáris korreláció figyelhető meg (Stoss, 1983; Cosson et al., 1985; Billard & Cosson 1992; Ohta et al., 1995). Ez valószínűleg annak is köszönhető, hogy aktivációnál nem tudjuk modellezni az összes, termékenyítésnél megjelenő tényezőt, amely a spermium mozgását befolyásolhatja. Ilyen lehet például az ovariális folyadék azon hatása, hogy megnyújtja a spermiumok mozgásának idejét (Lahnsteiner, 2002), illetve a termékenyülésnél a spermium és az ikra közötti kémiai kommunikáció is közrejátszhat a termékenyülésben (Kekäläinen & Evans 2018).

Babiak és munkatársai (2002) szivárványos pisztrángban azt találták, hogy a mélyhűtött spermából született egyedek spermája ($89 \pm 6\%$) szignifikánsan jobban termékenyített ($p < 0,05$), mint a friss spermából született társaiké ($81 \pm 7\%$). Ezzel szemben a vizsgált zebradániók esetében nem találtam statisztikailag igazolható különbséget ($p > 0,05$) sem a termékenyítőképességben, sem pedig a sperma motilitási eredményeiben a két csoport között. Pontyban sem találtam szignifikáns különbséget ($p = 0,86$) a mélyhűtött ($87 \pm 5\%$) és friss ($86 \pm 13\%$) spermából született egyedek spermájának termékenyítőképessége között, azonban a sperma progresszív motilitási értékére mind a mintavétel időpontja ($p < 0,001$), mind pedig az eredet ($p = 0,024$), vagyis hogy az adott egyed mélyhűtött vagy friss spermából született, hatással volt. A második generációnál azonban már nem jelent meg ez a különbség. Magyarázatot adhat az eltérésre, hogy a sperma összetétele, illetve a spermiumok felépítése és morfológiája is halfajonként különböző lehet (Nagahama, 1983).

Egyik általam vizsgált halfajnál sem találtam szignifikáns különbséget a sejtdenzitásban a különböző csoportokat figyelembe véve. A már korábban, mások által leírt tapasztalatokat, miszerint a mélyhűtés statisztikailag igazolhatóan negatívan befolyásolja a felolvasztás utáni motilitási értékeket (Horváth et al., 2003), azonban sikerült igazolnom.

Egyes kutatások eredményei azt mutatják, hogy a spermamélyhűtés pozitívan befolyásolja a növekedést (Kerby et al., 1985), mások pedig ennek az ellentétét találták (Hayes et al., 2004; Nusbaumer et al., 2019). A mélyhűtés azonban nem csak testméretbeli eltéréseket, hanem deformációkat is okozhat az egyedekben (Miskolczi et al., 2005). Ezt támasztják alá az általam végzett kísérletek is, ugyanis vizsgálataimban a mélyhűtött spermából származó halak statisztikailag igazolhatóan ($p < 0,001$) kisebb fejjel, alacsonyabb háttal és keskenyebb faroknyéllel rendelkeztek a friss spermából született társaikhoz képest. Ezek az eltérések azonban nem mutatkoztak meg a testhosszban ($p > 0,05$), amely megegyezik Rahman és munkatársai (2009) eredményeivel.

6 Következtetések és javaslatok

Következtetésként elmondható, hogy mind a mikroplate leolvasó spektrofotométer, mind pedig a CASA alkalmas a spermakonzentráció pontos meghatározására, amely meggyorsítja a kutatók munkáját. Fontos azonban kiemelni, hogy a mintákat a mérések előtt immobilizálni kell, mert különben fals értékeket kaphatunk. A módszert természetesen eszközönként standardizálni kell, hiszen például CASA esetében gépenként eltérhet a vizsgált sejtszám, illetve mikroplate-enként a behelyezett minta optimális mennyisége.

Fontos továbbá megemlíteni, hogy a koncentráció beállításának mélyhűtés előtt hatása lehet a termékenyítőképességre. Ez összefüggésbe hozható azzal, hogy magasabb sejtszám mélyhűtése esetén a felolvasztás után több sejt marad életben, így több sejt tud termékenyíteni. Kísérleteimben a koncentráció szerinti mélyhűtésnek egyedül a linearitás motilitási paraméterre volt szignifikáns hatása. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy magasabb termékenyülés elérése érdekében érdemes lehet megfontolni magasabb koncentrációval történő mélyhűtés lehetőségét.

Az eredetnek, vagyis annak, hogy friss vagy mélyhűtött spermából születtek az egyedek, sem zebradánióban, sem pedig pontyban nem volt hatása a sejtdenzitásra, illetve a termékenyítőképességre. Zebradánióban továbbá nem jelent meg különbség egyik sperma motilitási paraméterben sem. Pontyban azonban az első generációban különbséget találtam a felolvasztás utáni progresszív motilitás tekintetében a mélyhűtött, illetve a friss spermából született egyedek között. Fontos azonban megemlíteni, hogy összesen három alkalommal vettem az egyedektől mintát és a mintavétel időpontjának is szignifikáns hatása volt a felolvasztás utáni progresszív motilitás értékére. Ez a különbség a második generációnál már nem jelent meg. Így egyértelműen nem jelenthető ki az, hogy a generációkban az egyedek származása, vagyis az, hogy mélyhűtött, vagy friss spermából születtek a halak, befolyásolja a felolvasztás utáni progresszív motilitás értékét. Fontos megemlíteni, hogy közrejátszanak e tekintetben az egyedi különbségek is. Befolyásoló tényező lehet továbbá, hogy a spermaminőség még egy egyedet vizsgálva is különbözhet. Érdemes tehát megfontolni a sperma minőségi paramétereinek hosszabb távú ellenőrzését mélyhűtés előtt és akkor lefagyasztani a mintát, amikor az a legjobb minőségi értékeket mutatja.

Pontynál a második generációban különbséget találtam a mélyhűtött, illetve a friss spermából született egyedek testparamétereik között. Mivel mindegyik friss spermából született csoport értéke eltért mindegyik mélyhűtött spermából született csoporthoz képest, ezért megállapítottam, hogy a mélyhűtésnek hatása van a születendő utódok morfometriájára. Ez esetben a mélyhűtés kisebb fejet, alacsonyabb hátat és keskenyebb faroknyelet eredményezett. Megállapítható tehát, hogy a mélyhűtés egyfajta sejtszelekcióval jár. Itt érdemes figyelembe venni a veszélyeztetett fajok génmegőrzését, ahol lényeges lenne a genetikai diverzitás megőrzése is, amelyet az ivarsejtfagyasztás nem feltétlenül támogat.

További vizsgálatok szükségesek tehát annak megállapításához, hogy a mélyhűtés milyen hatással járhat még az utódgenerációk fenó-, illetve genotípusára, mivel ezek az eltérések az általában használt módszerekkel (testhossz) nem mindig megállapíthatók. Szelekciós programokban, amelyekben lényeges az egyedek testalak szerinti kiválogatása, a mélyhűtés kifejezetten hasznos lehet. Például afrikai harcsa egyedeknél, ahol problémát okoz a nagy fejméret, érdemes lenne megállapítani, hogy hasonló eredményekkel jár-e a spermamélyhűtés, mint ponty esetében. Fontos lenne továbbá annak feltérképezése, hogy a mélyhűtés által okozott változások mennyiben érintik a belső szerveket, esetleg a csontváz méretét, a csontok alakulását.

Az ivarsejtmélyhűtésnek, vagyis jelen esetben a spermamélyhűtésnek tehát sok előnye és hátránya lehet, így számos tényezőt kell megvizsgálni a fagyasztás elvégzése előtt. A doktori kutatómunkában megállapítást nyert, hogy sem a termékenyítőképességet, sem pedig a sejt koncentrációt nem befolyásolja az, hogy a mintát adó egyedek friss vagy mélyhűtött spermából születtek. A sperma minőségi paramétereinek tekintetében egyedül pontynál a felolvasztás utáni progresszív motilitás értékében volt szignifikáns eltérés a csoportok között. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy a mélyhűtés ebben a tekintetben bármikor alkalmazható, hiszen nem befolyásolja az utódgeneráció termékenyítési/motilitási értékeit. Ezzel ellentétes hatás annak megállapítása, miszerint ponty második generációjánál testalakbeli eltéréseket láthattunk a két csoport között. Így megállapíthatjuk, hogy több aspektusból vizsgálva a spermamélyhűtés hatásait, nem jelenthető ki egyértelműen, hogy a fagyasztás bármikor használható, hiszen nincs befolyással az utódgenerációra.

Olyan fajoknál, mint például a lazac, ahol állandó kereslet van a halhús iránt, igény van a folyamatos ellátásra is. Ezért a termelőknek megéri egy olyan cégtől vásárolni a mélyhűtött spermát, amely garantálni tudja a minőséget, vagyis a biztos termékenyülési százalékot. Így az északi országokban el tudott terjedni a mélyhűtött spermával történő termékenyítés. Ezzel ellentétben, Magyarországon a halhús iránti kereslet inkább szezonális. Lehetőséget rejthet magában az afrikai harcsa, mert tenyésztéséhez *Heterobranchus longifilis* egyedeket használnak, amelyek korlátozott számban állnak rendelkezésre. Így ennél a fajnál kifejezetten fontosak lennének azok a kutatások, amelyek az utódgenerációra fókuszálnak.

7 Új tudományos eredmények

1. Zebradánió fajban megállapítottam, hogy a mélyhűtött és friss spermából született egyedek spermájának mélyhűtés utáni minőségi paramétereit, illetve sejtdenzitását nem befolyásolja a termékenyítésnél használt sperma származása (mélyhűtött, friss). Pontyoknál az első generáció esetében azonban az egyedek származása (mélyhűtött, friss) befolyásolta a mélyhűtés utáni progresszív motilitást, de nem határozza meg a sejtsűrűséget és nincs hatással a termékenyülési százalékra. Megállapítottam tehát, hogy pontyoknál a származás tekintetében a sperma minőségi paramétere különbözhetnek.
2. Megállapítottam, hogy termékenyítés során a mélyhűtött sperma alkalmazása befolyásolja az utódgeneráció külalakját a második generációban ponty fajban (kisebb fej, alacsonyabb hát, keskenyebb faroknyél).
3. Lineáris összefüggést találtam a pontysperma spektrofotométerrel mért abszorbanciája, illetve CASA-val mért sejtszáma és Bürker-Türk kamrával számolt sejtkoncentrációja között, amely az alábbi egyenes egyenletével írható le spektrofotométer esetében: $y = 1.363 \times 10^{11}x + 1.576 \times 10^9$ és CASA esetében: $y = 0.7317x + 8.555 \times 10^8$. Ezekbe a függvényekbe behelyettesítve a spektrofotométerrel mért abszorbanciát, illetve a CASA által mért sejtszámot, az immobilizált sperma denzitása könnyen és gyorsan meghatározhatóvá vált.
4. Pontyban előre meghatározott sejtkoncentrációval végzett spermamélyhűtéskor nem találtam szignifikáns különbséget a meghatározott sejtkoncentrációval, illetve a 1:9 hígítási aránnyal mélyhűtött minták minőségét leíró tényezők között (a LIN paraméter kivételével).
5. Ponty beállított sejtdenzitás melletti spermamélyhűtése esetén szignifikáns különbséget találtam a standard hígítás és a legnagyobb, 4×10^9 spermium/ mL koncentráció között, az utóbbinak a javára. Megállapítottam tehát, hogy a koncentráció szerinti mélyhűtés hatással lehet a sperma felolvasztás utáni termékenyítőképességére. A mélyhűtésnél alkalmazott magasabb koncentrációjú spermával történő termékenyítés nagyobb termékenyülést eredményez.

8 Összefoglalás

Az első sikeres ivarsejtmélyhűtés új ajtókat nyitott meg az állattenyésztésben. Egyrésztől lehetőség adódott a hímek és a nőtények időbeli, valamint térbeli elkülönítésére olyannyira, hogy az állat halála után is fel lehet használni annak ivartermékeit. Másrésztől költségsökkentésről is beszélhetünk, hiszen egy állomány fenntartása helyett elég lehet csupán az ivarsejtek tárolása. Fontos megemlíteni, hogy kihaló félben lévő fajok megmentésére is irányulhatnak a mélyhűtési tevékenységek.

Mivel halaknál egyelőre az embrió és az ikra mélyhűtése nem lehetséges, ezért a legtöbb ilyen kutatás a spermamélyhűtésre fókuszál. A keltetőházakban eddig nem igazán terjedt el a mélyhűtött spermával történő termékenyítés, jelenleg inkább laboratóriumokban használják azt. Mielőtt azonban széleskörűen elterjed, érdemes lenne feltérképezni, hogy milyen hatással járhat az ivarsejtmélyhűtés az utódgenerációra. Ennek egyik szegmense az utódok spermaminőségének, illetve külalakjának vizsgálata.

Kísérleteimben elsősorban a mélyhűtési protokollok tökéletesítésére, később a mélyhűtött spermából született egyedek tulajdonságaira koncentráltam. Két módszert találtam, amellyel a sperma denzitása könnyen és gyorsan meghatározhatóvá válik. A számítógépes spermavizsgáló rendszer épp úgy, mint a spektrofotométer, tökéletesen alkalmas a sejtkoncentráció mérésére. Fontos azonban, hogy a mérések előtt a spermát immobilizáljuk, különben fals eredményeket kaphatunk. Két függvényt (spektrofotométer: $y = 1,363 \times 10^{11}x + 1,576 \times 10^9$, $r^2 = 0,7602$, $p = 0,0022$; CASA: $y = 0,7317x + 8,555 \times 10^8$, $r^2 = 0,8559$, $p < 0,0001$) alkottam, amellyel a kapott adatok standardizálhatóvá váltak.

Teszteltem a koncentráció szerinti mélyhűtést is. Öt különböző koncentrációban ($0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 2×10^9 , 4×10^9 sejt/ml és standard 1:9 arányban) mélyhűtöttem le pontyspermát. Kontrollként az általában használt 1:9 hígítási arány szolgált. Szignifikáns eltérést találtam a termékenyítésben ($p = 0,0121$) a 4×10^9 sejt/ml ($66 \pm 6\%$) és a standard ($49 \pm 5\%$), 1:9 hígítási arány esetén, továbbá a LIN értéke a $0,5 \times 10^9$ sejt/ml ($0,86 \pm 0,03$) és a kontroll (1:9; $0,74 \pm 0,08$) között tért el szignifikánsan ($p = 0,0056$).

További vizsgálataimhoz létre kellett hozni a generációkat. Ez zebradánió esetében három, ponty esetében pedig két generációt jelentett. A mélyhűtött spermából született egyedek spermáját felolvasztás után, a friss spermából származó egyedek spermáját pedig frissen használtam fel termékenyítéshez. Az első generációk esetében teljes testvérpopulációkat hoztam létre, vagyis ugyanazon hím mélyhűtött és friss spermáját használtam a termékenyítéshez. Ponty esetében a második generáció kialakítására is így került sor. Zebradániókat termékenyítve azonban a minimális mennyiségű ivartermékek miatt több egyedről származó, kevert ikrát, illetve spermát (mélyhűtött, friss) használtam fel.

Megvizsgálva a különböző generációk spermájának motilitási paramétereit, zebradánió esetében nem találtam szignifikánsan igazolható ($p > 0,05$) eltérést a két csoport között. Pontynál viszont a felolvasztás utáni progresszív motilitási értékek statisztikailag igazolhatóan eltértek ($p = 0,024$) a friss ($59 \pm 20\%$), illetve a mélyhűtött ($64 \pm 17\%$) spermából született egyedeknél, továbbá a mintavétel időpontja (3 különböző időpont) is befolyásoló tényezőnek bizonyult ($p < 0,001$). A második generációban azonban nem találtam szignifikáns eltérést ($p > 0,05$).

Ponty esetében a második generáció egyedeit morfometriai méréseknek vetettem alá, amelyből kiderült, hogy a mélyhűtött spermából született egyedek testalakja statisztikailag igazolhatóan ($p <$

0,001) eltér. A mélyhűtött spermából született egyedek átlagosan kisebb fejjel, alacsonyabb háttal és keskenyebb faroknyéllel rendelkeznek a friss spermából született társaikhoz viszonyítva. Testhossz alapján azonban nem találtam szignifikáns eltérést ($p > 0,05$) a két csoport között.

Eredményeim egyrészt azt támasztják alá, hogy nagyon fontos a megfelelő mélyhűtési protokoll kidolgozása, mert a mélyhűtés során fellépő változások nagyban befolyásolhatják a mélyhűtés sikerességét, a spermiumok életképességét. Másrészt a spermamélyhűtés hatással lehet az utódok külalakjára, amely nem feltétlenül jelenik meg a testhosszban. További vizsgálatok szükségesek annak feltérképezésére, hogy ezek a külalakbeli eltérések hatással vannak-e pl. a belső szervekre, a csontalakulásra és egyéb paraméterekre.

9 Summary

Cryopreservation of sperm has long been recognized as an effective means of preserving genetic resources of wild and domestic animal species. Sperm cryopreservation methods have also been developed for freshwater and marine fish. Although the importance of these methods has widely been acknowledged, very few of them have seen actual application to aquaculture practice. In most cases fish sperm cryopreservation is restricted to the creation of gene banks maintained by research institutions without concrete commercial application.

In order to overcome these problems, standardization of cryopreservation protocols has been initiated by several laboratories working with fish sperm. However these studies focus mainly on the composition of the extender, type and concentration of cryoprotectants and conditions of freezing and thawing and not on the cryopreservation effects on the generations.

In this study I focused on the standardization of cryopreservation protocols and the effects on the next generations. I found two methods to fastly and easily identify the number of spermatozoa. I found the CASA as well as the spectrophotometer suitable for measurements. However these engines give reliable readings of sperm counts only if the cells are immotile. A significant positive linear relationship was detected between absorbance measured in the plate spectrophotometer and sperm concentration assessed using a hemocytometer ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.8289$) resulting in the equation $y = 1.720 \times 10^{11}x + 3.851 \times 10^9$. The concentration values measured with CASA were also in a significant linear relationship ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.8559$, $y = 0.7317x + 8.555 \times 10^8$) with sperm concentration counted in a hemocytometer.

In the case of cryopreservation after sperm counting, there was no significant main effect of sperm concentration on any of the parameters measured by CASA. The only exception was LIN ($p = 0.0112$) where the post-hoc test found a significant difference ($p = 0.0056$) between linearity value for the sperm concentration of 0.5×10^9 spermatozoa mL^{-1} (0.86 ± 0.03) and that for the dilution ratio of 1:9 (0.74 ± 0.08).

A significant main effect ($p = 0.0156$) of cell concentration on the fertilizing capacity of cryopreserved common carp sperm was found. The post-hoc test detected a significant difference ($p = 0.0121$), between the fertilization percentage of batches fertilized with sperm frozen at a cell concentration of 4×10^9 spermatozoa mL^{-1} ($66 \pm 6\%$) and the positive control (sperm diluted at a ratio of 1:9, $49 \pm 5\%$). The control fertilization rate was $95 \pm 5\%$ confirming satisfactory egg quality.

For further experiments I had to create 3 generations of zebrafish and 2 generations of carps. One male from each group was chosen. Batches of eggs of females were fertilized either with cryopreserved sperm for creating the “cryopreserved” group, or with fresh sperm creating the “fresh” group. For fertilization I cryopreserved the sperm of the individuals born from cryopreserved sperm and I used fresh sperm of the fish born from fresh sperm. For creating the first generations I used the same male’s cryopreserved and fresh sperm, creating full-sib populations.

I found no significant ($p > 0,05$) difference in motility parameters between the groups of zebrafish. In the case of carps I found no significant difference ($P = 0.86$, $N = 4$) between the fertilizing capacity of cryopreserved ($87 \pm 5\%$) and fresh sperm ($86 \pm 13\%$) of F1 males used to establish the F2 generation. On the progressive motility of cryopreserved carp sperm both the sampling date ($P < 0.001$) and the origin of males (fresh or cryopreserved sperm) had a significant effect ($P = 0.024$,

N = 46 for cryopreserved, N = 63 for fresh) although the family of fish had no effects on the results. The origin of the males neither affected the other motility parameters (VCL, VAP, VSL, STR or LIN).

Morphometry studies of F2 carp individuals revealed that fish can be classified according to their origin (fertilization with cryopreserved or fresh sperm) with $81.09 \pm 3.57\%$ accuracy across all tested families, based on DFA. A transformation grid for visualizing a shape change was taken where the group originating from cryopreserved sperm differed from that originating from fresh sperm at 9 measured points. Generally, fish originating from fertilization with cryopreserved sperm had a smaller head, lower back and narrower caudal peduncle than those originating from fresh sperm. However, I found no significant difference ($p > 0.05$) between the length or the weight of the individuals.

My researches raise attention to the importance of the suitable cryopreservation protocol and also to the effects of the sperm cryopreservation on the next generations. The cryopreservation might have an effect on the morphometry on the fish which can not be identified by measuring them. This topic requires more researches before placing this method in concrete commercial application.

10 Köszönetnyilvánítás

A doktori disszertáció egy 4-5 éves kitartó munkának és fejlődésnek az eredménye. Így a teljesség igénye nélkül szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik végigkísértek ezen az úton. Elsősorban szeretném megköszönni konzulenseimnek, Zemenné Dr. Kollár Tímeának, illetve Dr. Horváth Ákosnak, hogy mindenben segítségemre voltak és megteremtették a tudományos életbe történő publikálás alapjait. Hálás vagyok továbbá Dr. Urbányi Bélának, hogy biztosította a kísérletek elvégzéséhez szükséges háttérrel. Köszönöm Makádiné Farkas Anasztáziának, hogy a határidős munkákat mindig meggyorsította és azt, hogy tényleg mindenben lehetett rá számítani. Azt hiszem nem véletlenül nevezzük őt a PhD-sok anyukájának.

Köszönettel tartozom továbbá a Tanszék összes munkatársának, akik a kísérletekben nyújtottak segítséget, külön kiemelve, Dr. Kása Esztert, Reining Mártát, Berta Izabella Robertát, Ivánovics Bencét, Kitanović Nevenát, Staszny Ádámot Gazsi Gyöngyit, Dr. Ács Andrást, Dr. Csenki-Bakos Zsoltot, Molnár Józsefet, Nagy Borbálát, Dr. Várkonyi Leventét, Láng Levente Zetét, Mészáros Gergelyt, Dr. Bernáth Gergelyt, Dr. Müller Tamást. Hálával tartozom továbbá Mézes Miklós professzor úrnak a bátorító szavakért, amelyek mai napig kísérnek.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak, Édesanyámnak, Gál Anikónak és Édesapámnak, Pataki Imrének, hogy mellettem álltak és támogattak a tanulmányaim során. Nagypapámnak, Gál Ernőnek, hogy megszerettette velem a halakat és a horgászatot, nagymamáimnak, Szőke Franciskának és Boros Mária Magdolnának, akikhez mindig be lehetett menni egy fárasztó nap után egy „bügyögére”. Köszönöm bátyámnak, Pataki Balázsnak, nagynénimnek, Gáspárné Gál Editnek és keresztapukámnak, Gáspár Gábornak, hogy bátorítottak. Végezetül, de nem utolsó sorban pedig köszönöm minden barátomnak a rengeteg türelmet és azt, hogy végig hittek bennem.

11 Irodalomjegyzék

- Adams D. C., Rohlf F. J., Slice D. E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the “revolution.” *Italian Journal of Zoology*, 71(1), 5–16.
- Agarwal N. K. (2011). Cryopreservation of fish semen. *Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology*. Transmedia Publication, Srinagar (Garhawal) Uttarakhand, India. 104-27.
- Aitken R. J., Gordon E., Harkiss D., Twigg J. P., Milne P., Jennings Z., Irvine D. S. (1998): Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59, 1037–1046.
- Akcay E., Bukan N., Bozkurt Y., Tekin N., Secer S. (2004). Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 56:20390.
- Alavi S., Cosson J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30(1), 1–14.
- Alavi M. H. S., Psenicka M., Rodina M., Policar T., Linhart O. (2008). Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquatic Living Resources*, 21(1), 75–80.
- Alavi S. M., Rodina M., Policar T., Kozak P., Psenicka M., Linhart O. (2007). Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology*. 68(2):276-83.
- Alavi S. M., Hotzy C., Nakhro K., Rudolf S., Scofield D. G., Zajitschek S., Maklakov A. A., Immler S. (2017). Haploid selection within a single ejaculate increases offspring fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 114, 8053–8058.
- Amanze D., Iyengar A. (1990). The micropyle - a sperm guidance system in teleost fertilization. *Development* 109:495–500.
- Anderson K. V., Ingham P. W. (2003). The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nature Genetics*, 33(Suppl):285–293.
- Asturiano J. F., Cabrita E., Horváth Á. (2017). Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 245, 69–76.
- Asturiano J., Marco-Jiménez F., Peñaranda D., Garzón D., Pérez L., Vicente J., Jover M. (2007). Effect of Sperm Cryopreservation on the European Eel Sperm Viability and Spermatozoa Morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 162-166.
- Babiak I., Glogowski J., Brzuska E., Szumiec J., Adamek J. (1997). Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 28(7), 567–571.
- Babiak I., Glogowski J., Dobosz S., Kuzminski H., Goryczko K. (2002). Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation. *Journal of Fish Biology*, 60, 561–570.
- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M. J., Kucharczyk D., Luczynski M. (1995). Cryopreservation of the milt of the northern pike. *Journal of Fish Biology*, 46(5), 819–828.

- Balamurugan B., Ghosh S. K., Lone S. A., Prasad J. K., Das G. K., Katiyar R. (2018). Partial deoxygenation of extender improves sperm quality, reduces lipid peroxidation and reactive oxygen species during cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* 189: 60–68.
- Baynes S. M., Scott A. P. (1987). Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66: 53-67.
- Beirão J., Cabrita E., Pérez-Cerezales S., Martínez-Páramo S., Herráez, M. P. (2011). Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology*, 62(1), 22–31.
- Belous A. M., Bondarenko V. A. (1982). Structural changes of biological membranes during cooling. *Naukova Dumika*, Kiev.
- Benau D., Terner C. (1980). Initiation, prolongation, and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. *Gamete Research*. 3(3):247-57.
- Billard R. (1972). Racines flagellaires transitoires au cours de la spermiogenese de la truite. *Journal de microscopie*, pp. 14-21.
- Billard R. (1983). Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Cell and Tissue Research*, 233(2).
- Billard R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost species, *Reproduction Nutrition Development.*, 26, 877-920.
- Billard R. (1990). Spermatogenesis in teleost fish. *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol. 2. *Reproduction in the male*. vol. 2. 183-212.
- Billard R., Cosson M. P. (1988). Sperm motility in rainbow trout *Parasalmo mykiss*: effect of pH and temperature. In: *Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. Szerk.: Zohar Y., Breton B. Paris: INRA; p. 161–167.
- Billard R., Cosson M. P. (1990). The energetics of fish sperm motility. In: Gagnon C, editor. *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boca Raton: CRC Press; p. 153–174.
- Billard R., Cosson M. P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*. 261(2):122-31.
- Billard R., Cosson J., Crim L. W., Suquet M. (1995). Sperm physiology and quality. In: *Broodstock Management and Egg Quality*, Szerk: Bromage, N.R. és Roberts, R.J. pp. 25-52. Cambridge University press, Cambridge.
- Billard R., Cosson J., Linhart O. (2000): Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility. *Aquaculture Research*, 31, 283–287.
- Billard R., Cosson J., Perchec G., Linhart O. (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*. 129(1-4):95-112.
- Binohlan C., Pauly D. (2000). The length-weight table, In: *Fishbase 2000: concepts, design and data sources*, Szerk.: Froese R. és D. Pauly, 121-123, ICLARM, ISBN 971-8709-99-1, Manila, Philippines.

- Blaxter J. H. S. (1953). Sperm Storage and Cross-Fertilization of Spring and Autumn Spawning Herring. *Nature*, 172(4391), 1189–1190.
- Bokor Z., Ittész I., Mosonyi G., Kotrik L., Müller T., Urbányi B., Horváth Á. (2015). Survival and growth rates of wels catfish (*Silurus glanis* Ls, 1758) larvae originating from fertilization with cryopreserved or fresh sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 164–168.
- Bokor Z., Müller T., Bercsényi M., Horváth L., Urbányi B., Horváth Á. (2007). Cryopreservation of sperm of two European percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga pikeperch (*S. volgensis*). *Acta Biologica Hungarica*. 58(2):199-207.
- Bookstein F. L. (1989). Principal wraps: Thin-Plate Splines and the decomposition of deformations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 11: 567-585).
- Bookstein F. L. (1997). *Morphometric tools for landmark data*. New York: Cambridge University press. 456 p.
- Bookstein F. L. (1998). A hundred years of morphometrics. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 44(1–2), 7–59.
- Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M., Li P., Hulak M., Gela D., Linhart O. (2009). Freezing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology*. 59(3):291-6.
- Bozkurt Y., Akcay E., Tekin N., Secer S. (2005). Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Israeli J. Aqua. Bamidgeh*. 57:125-130.
- Bozkurt Y., Yavaş İ., Yıldız C. (2014). Effect of different avian egg yolk types on fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Aquaculture International* 22, 131–139.
- Brackett B. G. (1983). A review of bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*, 19(1), 1–15.
- Bromage N., Roberts R. J. (1995). Broodstock management and seed quality-general considerations. *Brood-stock management and egg and larval quality*. 1-24.
- Butts I. A. E., Litvak M. K., Kaspar V., Trippel, E. A. (2010). Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa: Effects of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology. *Cryobiology*, 61(2), 174–181.
- Cabrera E., Horváth Á., Marinović Z., Asturiano J. F. (2022). Technologies and strategies for ex situ conservation of aquatic organisms: The role of cryopreservation in long-term management. In: *Cellular and Molecular Approaches in Fish Biology*, Szerk.: Ignacio Fernández M. és Jorge M.O. F. pp. 1-48., Academic Press, London.
- Cabrera E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S., Herráez M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 623–635.
- Cabrera 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. *Animal Reproduction Science* 125: 189–195.

- Caetano Da Silva C., Kollár T., Csenki-Bakos Z., Fernandes B. H. V., Horváth Á., Carvalho, L. R. (2019). An Easy Method for Cryopreservation of Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *Zebrafish*. Jun;16(3):321-323.
- Chargaff E. (1971). Preface to a Grammar of Biology. *Science*, 172(3984), 637–642.
- Christensen P., Stryhn H., Hansen C. (2005). Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Toma and Makler counting chambers. *Teriogenology* 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., Kucharczyk D., Dobosz S., Goryczko K., Glogowski J. (1999). The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*. Volume 21, 313–315.
- Ciereszko A., Dabrowski K., Mims S. D., Glogowski J. (2000). Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125(2), 197–203.
- Ciereszko A., Glogowski J., Dabrowski K. (2011). Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fish and the relation to semen biology, quality and cryopreservation. In: Tiersch T.R. and Green CC (eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 46–79.
- Cognie P. F., Billard R., Chao N. H. (1989). La cryoconservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*. *Journal of applied ichthyology*, 5(4), pp.165-176.
- Conget P., Fernández M., Herrera G., Minguell J. (1996). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture*. 143(3-4):319-29.
- Cosson M. P., Billard R., Gatti J. L., Christen R. (1985). Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*. 46(1):71-5.
- Cosson J., Groison A. L., Suquet M., Fauvel C., Dreanno C., Billard R. (2008). Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. *Journal of Applied Ichthyology*. 24:460–486.
- Cosson J. (2010). Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology*.76:240-279.
- Cosson J. (2013). ATP: The sperm movement energizer. In: *Adenosine Triphosphate: Chemical Properties, Biosynthesis and Functions in Cells*. Szerk.: Kuester E. és Traugott G. New York: Nova Publisher Inc; p. 1–46.
- Cosson J. (2019). *Fish Sperm Physiology: Structure, Factors Regulating Motility, and Motility Evaluation*. *Biological Research in Aquatic Science*.
- Cuevas-Uribe R., Tiersch T. R., (2011). Estimation of Fish Sperm Concentration by Use of Spectrophotometry. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd edition World Aquaculture Society. Szerk.: Tiersch T.R. és Green, C.C. Baton Rouge, Louisiana, pp. 162–200.

- da Costa B. B., de Oliveira D. L., Rodrigues R. B., Gomes I. C., Streit D. P. Jr. (2020). Morphological abnormalities in zebrafish cryopreserved sperm. *Cryobiology*. 97:235-237.
- Dadras H., Dzyuba B., Cosson J., Golpour A., (2016a). Siddique MAM, Linhart O. Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. *Aquaculture Research*. Dadras H., Dzyuba V., Cosson J., Golpour A., Dzyuba B. (2016b). The in vitro effect of temperature on motility and antioxidant response of common carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. *Journal of Thermal Biology*. 59:64–68.
- Darvas Zs., László V. (2011). *Sejtbológia*. Semmelweis Kiadó. Budapest. 233 p.
- De La Cruz-Agüero, J., Vergara-Solana, F. J., García-Rodríguez, F. J. (2014). Geometric morphometrics support the proposed molecular taxonomy for three *Eucinostomus* species (Perciformes: *Gerreidae*) along the coasts of Mexico. *Zoomorphology*, 134(1), 125–134.
- DeLuca S.Z., O'Farrell P.H. (2012). Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Developmental Cell*. 22:660–668.
- Denniston R. S., Michelet S., Godke R.A. (2000). Principles of Cryopreservation. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*. Szerk: Tiersch T. R. és Mazik P. M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. pp 59-74.
- Depincé A., Gabory A., Dziewulska K., Le Bail P., Jammes H., Labbé C. (2019). DNA methylation stability in fish spermatozoa upon external constraint: Impact of fish hormonal stimulation and sperm cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, 87(1), 124–134.
- Devita A., Abinawanto, Lestari, R. (2021). The effect of coconut milk in various concentrations on spermatozoa motility of Koi fish (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) 48 hours post-cryopreservation. *Journal of Physics: Conference Series*, 1725, 012061.
- Dietrich M. A., Żmijewski D., Karol H., Hejmej A., Bilińska B., Jurecka P., Irnazarow I., Slowinska M., Hliwa P., Ciereszko A. (2010). Isolation and characterization of transferrin from common carp (*Cyprinus carpio* L) seminal plasma. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1), 66–74.
- Diogo P., Martins G., Nogueira R., Marreiros A., Gavaia P. J., Cabrita E. (2019). Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring skeletogenesis. *Cryobiology*. 91, 115-127.
- Diwan A. D., Ayyappan S., Lal K. K., Lakra W. S. (2010). Cryopreservation of fish gametes and embryos. *The Indian Journal of Animal Sciences*. 80(4):109-24.
- Draper B. W., McCallum C. M., Scout J. L., Slade A. J., Moens C. B. (2004). A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. In: *The zebrafish genomics, and informatics*. Szerk.: Detrich III H.W., Westerfield M., Zon L.I. Volume 77 of methods in Cell Biology. San Diego: Elsevier Press; p. 91–112.
- Drokin S. I., Kopeika E. F., Grischenko V. I. (1989). Differences in cryopreservation resistance and specificity of lipid properties of spermatozoa of marine and fresh water fish species. In: *Report of USSR Academy of Science* 304. N 6: 1493-1496.
- Dzyuba V., Cosson J., Dzyuba B., Rodina M. (2015). Oxidative stress and motility in tench *Tinca tinca* spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*. 60:250–255.

- Eisenbach M., Giojalas L. C. (2006). Sperm guidance in mammals — an unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7:276– 285.
- El Hajj N., Zechner U., Schneider E., Tresch A., Gromoll J., Hahn T., Schorsch M., Haaf T. (2011). Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sexual Development* 5 60–69.
- Erikson E. (1956). "The problem of ego identity". *Journal of the American Psychoanalytic Association* 4: 56–121.
- Fahy G. M. (1986). The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. *Cryobiology* 23, 1-13.
- FAO (2012). Cryoconservation of Animal Genetic Resources; FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12; FAO: Rome, Italy, 2012.
- Fauvel C., Savoye O., Dreanno C., Cosson J., Suquet M., 1999. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*. 54, 356–369.
- Fauvel C., Suquet M., Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 636–643.
- Fehér Gy. és Kovács Gy. (1973). Fejlődéstan. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. 495 p.
- Figuerola E., Valdebenito I., Merino O., Ubilla A., Risopatrón J., Farias J. G. (2016). Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *Journal of Fish Biology* 89: 1537–1550.
- Figuerola E., Farias J. G., Lee-Estevez M., Valdebenito I., Risopatrón J., Magnotti C. (2018). Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 493: 1–8.
- Figuerola E., Lee-Estevez M., Valdebenito I., Watanabe I., Oliveira R. P. S., Romero J. (2019). Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. *Aquaculture* 511: 634190.
- Firman R. C., Gasparini C., Manier M. K., Pizzari T. (2017). Postmating female control: 20 years of cryptic female choice. *Trends in Ecology & Evolution*. 32:368–382.
- Fulton H. C. (1906). Descriptions of new Australian Pupinæ and Pupinellæ, with a note on *Pupina pineticola*, Cox. *Annals and Magazine of Natural History*. ser. 7, 17: 243-246.
- Gazo I., Linhartova P., Shaliutina A., Hulak M. (2013): Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on sperm quality, DNA integrity, and antioxidant responses in sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa. *Chemico-Biological Interactions*, 203, 377–385.
- Gibbons B. H., Baccetti B., Gibbons I. R. (1985). Live and reactivated motility in the 9 + 0 flagellum of *Anguilla* sperm. *Cell Motility* 5:333–350
- Gorin N. C. (1992). Cryopreservation and storage of stem cell. *Bone Marrow and Stem Cell Processing*. pp.292-308.
- Graybill J. R., Horton H. F. (1969). Limited fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 26(5):1400-4.

- Hagedorn M., Kleinhans F. W. (2000). Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: Cryopreservation in aquatic species. Szerk.: Tiersch, T.R. és Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA pp. 161-178.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312–322.
- Hammit D. G., Hade D. K., Williamson R. A. (1989). Survival of human sperm following controlled- and noncontrolled-rate cryopreservation. *Andrologia* 21:311–7.
- Hart N. H. (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *International Review of Cytology*. 121:1–66.
- Harvey B. (1983). Cryopreservation of *Sharoterodon mossambicus* spermatozoa, *Aquaculture* 32, 313–320.
- Harvey B. (1998). An overview of action before extinction. In: An International Conference on Conservation of Fish Genetic Diversity, Szerk.: Tiersch, T.R. és Manzik P.M. pp. 49-58. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Harvey B., Kelley R. N., Ashwood-Smith M. J. (1982). Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *Canadian Journal of Zoology*. 60(8):1867-70.
- Hayes M. C., Rubin S. P., Hensleigh J. E., Reisenbichler R. R., Wetzel L. A. (2005). Performance of juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced from untreated and cryopreserved milt. *Aquaculture*. 249, 291–302
- Hossen S., Sukhan P.Z., Cho Y., Kho H. K. (2021). Effects of Cryopreservation on Gene Expression and Post Thaw Sperm Quality of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Frontiers in Marine Science*. 13 April 2021.
- Horváth Á., Jesenšek D., Csorbai B., Bokor Z., Raboczki É., Kaczkó D., Bernáth G., Hoitsy G., Urbányi B., Bajec S. 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., Miskolczi E., Urbányi B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*. 16: 457–460.
- Szabó T., Horváth L., Urbányi B. (2000). A halak szaporodásbiológiája. In: Halbiológia és haltenyésztés. Szerk.: Horváth L. Budapest, Mezőgazda Kiadó, 168-205 p.
- Hubbs C. I. (1992). Variations in the Number of Vertebrae and Other Meristic Characters of Fishes Correlated with the Temperature of Water during Development. *The American Naturalist* 56: 360-372.
- Huxley J. S., Teissier G. (1936). Terminology of relative growth. *Nature*. 137: 780-781.
- Immler S., Hotzy C., Alavioon G., Petersson E., Arnqvist G. (2014). Sperm variation within a single ejaculate affects offspring development in Atlantic salmon. *Biology Letters*. 10, 20131040.
- Irawan H., Vuthiphandchai V., Nimrat S. (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 236–243.

- Islam M. S., Akhter T. (2012). Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences*. 2012;1(1):11–19.
- Kamaruding N. A., Embong W. K., Abdullan R. B. (2012). Frozen-thawed sperm motility characteristics of African catfish (*Clarias gariepinus*) by using glycerol or DMSO based extender. *International Journal of Environmental Science and Development*. 3(1):49.
- Kekäläinen J., Evans J. P. (2018). Gamete-mediated mate choice: towards a more inclusive view of sexual selection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 285:20180836.
- Kerby J. H., Bayless J. D., Harrell R. M. (1985). Growth, Survival, and Harvest of Striped Bass Produced with Cryopreserved Spermatozoa. *Transactions of the American Fisheries Society*, 114(5), 761–765.
- Klaiwattana P., Srisook K., Srisook E., Vuthiphandchai V., Neumvonk J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 15: 157–169.
- Klingenberg C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357
- Koppers A. J., Garg M. L., Aitken R. J. (2010): Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 48, 112–119.
- Krasznai Z., Márián T., Balkay L., Gasper R. J., Tron L. (1995). Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of Common Carp, *Cyprinus carpio*, sperm. *Aquaculture* 129:123-128
- Krasznai Z., Márián T., Izumi H., Damjanovich S., Balkay L., Trón L. (2000). Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:2052-2057
- Kumar J. S. S., Betsy C. J. (2015). Cryopreservation of fish gametes and its role in enhancing aquaculture production. In: *Advances in Marine and Brackish water Aquaculture*. Szerk.: Santhanam P., Thirunavukkarasar A. R., Perumal P. India: Springer Publishers; p. 241-246.
- Kurokura H., Hirano R., Tomita M., Iwahashi M. (1984). Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37(3), 267–273.
- Kovács B., Lehoczky I., Kovács Gy., Gorda S., Péteri A., Bakos J. (2018). A ponty genetikája és erőforrásai. In: *A ponty (Cyprinus carpio L) biológiája és tenyésztése*. Szerk.: Csorbai B. és Urbányi B. Vármédia Print Kft., Gödöllő, 9-30 p.
- Labbe C., Martoriati A., Devaux A., Maise G. (2001). Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60(3), 397–404.
- Lahnsteiner, F. (2002). The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the Salmonidae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1/2), 49–59.
- Lahnsteiner F., Berger B., Horváth Á., Urbányi B., Weismann T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*. 54(9):1477-98.

- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. (2003). Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*. 60(5):829-41.
- Lahnsteiner F., Mansour N., Berger B. (2004). Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*. 62(5):801-8.
- Lahnsteiner F., Mansour N., Kunz F. A. (2011). The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology* 76: 882–890.
- Lahnsteiner F., Patzner R. A., Weismann T. (1996). Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research*. 27(9):659-71.
- Leung L. K. P. (1991). Principles of biological cryopreservation. In: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Szerk.: Jamieson B. G. M. és Leung L. K. P. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lleonart J., Salat J., Torres G. J. (2000). Removing Allometric Effects of Body Size in Morphological Analysis. *Journal of Theoretical Biology*, Vol.205, pp. 85-93.
- Linhart O., Billard R., Proteau J. P. (1993). Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. *Aquaculture*. 115(3-4):347-59.
- Linhart O., Rodina M. (2000). Cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* and tench *Tinca tinca* sperm for gene resources conservation. In: International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Bergen, Department of Fish. & Marine Biology, P.O. Box 7800 Bergen N-5020 Norway, 2000, pp. 402-404.
- Linhart O., Rodina M., Cosson J. (2000). Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. *Cryobiology*, 41(3), 241–250.
- Li P., Li Z.H., Dzyuba B., Hulak M., Rodina M., Linhart O. (2010). Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm caused by cryopreservation techniques. *Biology of Reproduction*, 83, 852–858.
- Li P., Xi M. D., Du H., Qiao X. M., Liu Z. G., Wei Q. W. (2018). Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoan function in three sturgeon species. *Reproduction in Domestic Animals* 53: 287–295.
- Loir M., Sourdain P. S., Mendis-Handagama M. L. C., Jégou B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs., 32(6), 533–552.
- 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(1-4), 13–30.
- Magyary I., Urbányi B., Horváth L. (1996). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *Journal of Applied Ichthyology*, 12(2), 117–119.
- Marcus L. F., 1990 - Traditional morphometrics. In: Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Szerk.: Rohlf F. J., Bookstein F. L., Special Publication No. 2. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, pp. 77-122.

- Martinez-Paramo S., Diogo P., Dinis M. T., Herraes M. P., Sarasquete C., Cabrita E. (2012). Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, 77, 1129–1136.
- Mattei X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69(12), 3038–3055.
- Maxwell W. M. C., de Graaf S. P., El-Hajj Ghaoui R., Evans G. (2007): Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 13–38.
- Mazur P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *Journal of General Physiology*. 47: 347-369.
- Mazur P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*. 247, C125–C142.
- Mazur P. (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cellular Biophysics*. 17, 53–92.
- Márián T., Krasznai Z., Balkay L., Balazs M., Emri M., Trón L. (1997). Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis or regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Cytometry*. 27:374-382
- McCluskey B. M., Postlethwait J. H. (2014). Phylogeny of Zebrafish, a “Model Species,” within *Danio*, a “Model Genus.” *Molecular Biology and Evolution*, 32(3), 635–652.
- McPartlin L. A., Littell J., Mark E., Nelson J. L., Travis A. J., Bedford-Guaus S. J. (2008). A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology*. 69(5):639-50.
- Meryman H. T. (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology*. Apr 1;8(2):173-83.
- 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(1-4), 119–125.
- Mitteroecker P., Gunz P. (2009). Advances in Geometric Morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36(2), 235–247.
- Morisawa M. (1985). Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zoological Science*. 2:605–615.
- Morisawa M., Suzuki K. (1980). Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*. 210:1145e7
- Morisawa M., Suzuki K., Shimizu H., Morisawa S., Yasuda K. (1983). Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Zoology*. 107:95-103.
- Morisawa M., Tanimoto S., Ohtake H. (1992). Characterization and partial purification of sperm-activating substance from eggs of the herring, *Clupea pallasii*. *Journal of Experimental Zoology*, 264, 225-230.

- Nagahama Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In: Szerk.: Hoar W. S., Randall D. F. Donaldson E. M. Academic Press, Orlando, 223-264.
- Nanassy L., Carrell D. T. (2011a). Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*. 95 2310–2314.
- Nanassy L., Carrell D. T. (2011b). Analysis of the methylation pattern of six gene promoters in sperm of men with abnormal protamination. *Asian Journal of Andrology*. 13 342–346.
- Nascimento J. P., Horokhovatskyi Y., Kholodnyy V., Rodina M., Dzyuba V., Stechkina T., Boryshpolets S., Dzyuba B. (2021). Optimization of sterlet sperm concentration for cryopreservation. *Aquaculture*, 540, 736682.
- Niu J., Wang X., Liu P., Liu H., Li R., Li Z., He Y., Qi J. (2022). Effects of Cryopreservation on Sperm with Cryodiluent in Viviparous Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*). *International Journal of Molecular Sciences*. Mar 21;23(6):3392.
- Nusbaumer D., Marques da Cunha L., Wedekind C. (2019). Sperm cryopreservation reduces offspring growth. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 286 (1911), 20191644.
- Nynca J., Arnold G. J., Fröhlich T., Ciereszko A. (2015). Cryopreservation-induced alterations in protein composition of rainbow trout semen. *Proteomics*. 15: 2643–2654.
- Ohta H., Izawa T. (1996). Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*. 142(1-2):107-18
- Ohta H., Shimma H., Hirose K. (1995). Relationship between fertility and motility of cryopreserved spermatozoa of the amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fisheries science*. 61(5):886-7.
- Országgyűlés Hivatala (2020). Halgazdálkodás és akvakultúra. Infojegyzet 2020/71. (https://www.parlament.hu/documents/10181/4464848/Infojegyzet_2020_71_halgazdalkodas_es_akvakultura.pdf/62290a2f-9cec-6e7f-e91e-ff776fc7dc95?t=1605167533447)
- Öğretmen F., İnanan B. E., Kutluyer F., Kayim M. (2015). Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*. 83: 1548–1552.
- Perchec G., Jeulin C., Cosson J., Andre F., Billard R. (1995). Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 108:747–753.
- Pérez-Cerezales S., Martínez-Páramo S., Beirão J., Herráez M. P. (2010). Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology*. 74(2):282-9.
- Piironen J. (1985). Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. *Aquaculture*. 48(3-4):337-50.
- Piironen J. (1993). Cryopreservation of fish sperm and eggs. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 589 p.
- Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*. 164(4172), 666–666.

- Ponniah A. G., Lal K. K., Gopalakrishnan A., Srivastava S. K. (1998). Use of fertilisation protocols to enhance hatching percentage with cryopreserved milt of *Cyprinus carpio*. National Academy Science Letters. 21(7-8):256-60.
- Ponniah A. G., Sahoo P. K., Dayal R., Barat A. (1999). Cryopreservation of Tor putitora spermatozoa: Effect of extender composition, activating solution, cryoprotectant and equilibration time. Proceedings-national academy of sciences India section B. 69(1):53-60.
- Pšenička M., Rodina M., Linhart O., (2010). Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (Acipenser), function of acrosome and prevention of polyspermy. Animal Reproduction Science. 117, 147–154.
- Purdy P. H., Barbosa E. A., Praamsma C. J., Schisler G. J. (2016). Modification of trout sperm membranes associated with activation and cryopreservation. Implications for fertilizing potential. Cryobiology. 73: 73–79.
- Rahman F., Sarder M., Rouf M. (2009). Comparison of growth performance between cryopreserved and fresh sperm-originated fry of *Barbonymus gonionotus*. Journal of the Bangladesh Agricultural University, 7(1), 145–149.
- Rana K. J. (1995). Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 151-165.
- Rana K. J., McAndrew B. J. (1989). The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture. 76(3-4):335-45.
- Ratto M. H., Delbaere L. T. J., Leduc Y. A., Pierson R. A., Adams G. P. (2011). Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. Reproductive Biology and Endocrinology, 9, 1–8.
- Reyment R. A. (1991). Multidimensional paleobiology. Pergamon Press, New York.
- Richardson G. F., McNiven M. A., Mansour N. (2011). Effect of methanol concentration and thaw rate on the viability and fertility of cryopreserved Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. Aquaculture Research. 42(8):1096-100.
- Rieniets J. P., Millard J. L. (1987). Use of saline solutions to improve fertilization of northern pike eggs. The Progressive Fish-Culturist. 49(2):117-9.
- Riesco M. F., Robles V. (2013). Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges. PLoS One. 21;8(6):e67614.
- Rohlf F. J. (1990). Morphometrics. Annual Review of Ecology and Systematics. 21(1), 299–316.
- Rohlf F. J. (2005). tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.32. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf F. J. (2015). tpsUtil, file utility program. version 1.81. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Roosen-Runge E. C. (1977). The process of spermatogenesis in animals. Cambridge University. Press, Cambridge.
- Röhlich P. (2014). A sejt, mint a szövetek építőeleme. In: Szövettan. Szerk.: Röhlich P. Semmelweis Kiadó, Budapest, 27-109 p.

- Rurangwa E., Kime D. E., Ollevier F., Nash J. P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234(1-4):1-28.
- Schulz R. W., de França L. R., Lareyre J.-J., LeGac F., Chiarini-Garcia H., Nobrega R. H., Miura T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390–411.
- Schulz, R. W., Menting S., Bogerd J., Franca L. R., Vilela D. A. R., Godinho H. P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891–898.
- Shaliutina-Kolešová A., Cosson J., Lebeda I., Gazo I., Shaliutina O., Dzyuba B., Linhart O. (2015). The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 159:66-76.
- Shaliutina-Kolešová A., Xian M., Nian R. (2019). Antioxidant defence system in protein fractions of common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma. *Czech Journal of Animal Science* 64: 265–271.
- Shaw J. M., Oranratnachai A., Trounson A. O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53(1), 59–72.
- Siegfried K. R., Steinfeld J. S. (2021). Histological Analysis of Gonads in Zebrafish. In: Dosch, R. (eds) *Germline Development in the Zebrafish. Methods in Molecular Biology*, vol 2218. Humana, New York, NY. pp. 253-263.
- Sloter E., Schmid T. E., Marchett, F., Eskenazi B., Nath J., Wyrobek A. J. (2006). Quantitative effects of male age on sperm motion. *Human Reproduction*, 21(11), 2868–2875.
- Smith A. U., Polge C. (1950). Survival of Spermatozoa at Low Temperatures. *Nature*, 166(4225), 668–669.
- Sørensen S., Gallego V., Pérez L., Butts I., Tomkiewicz J., Asturiano J., (2013). Evaluation of Methods to Determine Sperm Density for the European eel, *Anguilla anguilla*. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 936–944.
- Specziár A., Bercsényi M., Müller T. (2009). Morphological characteristics of hybrid pikeperch (*Sander lucioperca* ♀ × *Sander volgensis* ♂) (Osteichthyes, *Percidae*). *Acta zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 55(1):39-54
- Staszny Á. (2016). A pikkelyalak vizsgálata halakon geometriai morfometriai módszerekkel. *Doktori Értekezés. Szent István Egyetem, Gödöllő.*
- Stoss J. (1983). 6 Fish Gamete Preservation and Spermatozoan Physiology. *Fish physiology*. 9:305-50.
- Sultana M., Nahiduzzaman M., Hassan M. M., Khanam M. U., Hossain M. A. (2009). Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *University Journal of Zoology, Rajshahi University*. 28:51-5.
- Szabó, G., Müller T., Bercsényi M., Urbányi B., Kucska B., Horváth Á. (2005). Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. *Acta Biologica Hungarica*, 56(1-2), 173–175.
- Taylor R., Adams G. D., Boardman C. F., Wallis R. G. (1974). Cryoprotection—Permeant vs nonpermeant additives. *Cryobiology*. 11(5):430-8.

- Tiersch, T. R. (2000). Preface. In: Cryopreservation in aquatic species. Szerk: Tiersch T. R. és Mazik P. M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp.15-16.
- Tiersch T. R. (2008). Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37, pp. 15-19
- 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. *Transactions of the American Fisheries Society*. 123, 580–586.
- Tiersch, T. R., Green C. C. (2011). *Cryopreservation in aquatic species 2nd Edition*. Baton Rouge, Louisiana, USA:World Aquaculture Society, 1003 p.
- Tiersch T. R., Yang H., Jenkins J. A., Dong Q. (2007). Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 65:493
- Várkonyi L., Bokor Z., Molnár J., Fodor F., Szári Z., Ferincz Á., Staszny Á., Láng L. Z., Csorbai B., Urbányi B., Bernáth G. (2018). 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), 639-645.
- 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(4), 803–810.
- Viveiros A. T. M., So N., Komen J. (2000). Sperm cryopreservation of African catfish: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. *Theriogenology*, 54(9), 1395–1408.
- Vuthiphandchai V., Wilairattanadilok K., Chomphuthawach S., Sooksawat T., Nimrat S. (2015). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research*. 46(10):2443-51.
- 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(1-4), 167–185.
- World Health Organization (2010). Part I. Semen analysis. In: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010:7-157.
- Willadsen I. (1977): In: The freezing of mammalian embryos, Szerk.: Elliott, K. és Whelan J. pp. 175-201. CIBA Foundation symposium. Elsevier, Amsterdam.
- Witschi E. (1948). Migration of germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contributions to embryology Carnegie Institution*. 209, 67-80.
- Woynarovich E. (1962). Hatching of carp eggs in zuger-glasses and breeding of carp larvae until and age age of 10 days. *Bamidgeh*, pp. 38-46
- Wyatt G. R. (1951). Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochemical Journal*, 48(5), 581–584.
- Wyatt G. R., Cohen, S. S. (1953). The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochemical Journal*, 55(5), 774–782.

- Yang H., Carmichael C., Varga Z. M., Tiersch T. R. (2007). Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology*, 68(2), 128–136.
- Yao Z., Crim L. W., Richardson G. F., Emerson C. F. (2000). Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation, *Aquaculture*. 181:361–375.
- 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(1-2), 13–18.
- Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D., Fink W. L. (2004a). Superimposition methods. *Geometric Morphometrics for Biologists*, 105–128.
- Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D., Fink W. L. (2004b). Introduction. *Geometric Morphometrics for Biologists*, 1–20.
- Zeng C., Peng W., Ding L., He L., Zhang Y., Fang D., Tang K. (2014). A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*. 69(1), 119–127.
- Zhang Y. Z., Zhang S. C., Liu X. Z., Xu Y. Y., Wang C. L., Sawant M. S., Li J., Chen S. L., Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology, *Theriogenology*. 60 (2003) 989–996.
- Zhao Y., Zheng X., Zhu X., Kuang Y., Sun X. (2020). Genetic variation of common carp *Cyprinus carpio* L. in China based on mitochondrial COII gene. *Aquaculture Reports*. 18, 100462.
- 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.