



A HALSPERMA MÉLYHÚTHETŐSÉGÉNEK ÖRÖKLŐDÉSE

DOI: 10.54598/003990

Doktori értekezés (PhD) tézisei

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

1 A munka előzményei, kitűzött célok

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.

Nem véletlen tehát, hogy szarvasmarha esetében a mesterséges termékenyítés önálló iparággá nőtte ki magát. Halaknál is sok fajban fejlesztettek ki különböző spermamélyhűtési módszereket. 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, equilibrációs idő, stb.

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 feno-, illetve genotípusának megnyilvánulását.

Babiak 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 Anyag és módszer

2.1 Halak tartási körülményei

2.1.1 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 különíttem 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). A halakat 10 literes akváriumokban keltem, majd generációtól függően egészen 3-4 hónapos korukig ebben neveltem őket. Ezután 3 m³-es műanyag medencékbe helyeztem át őket, külön ketrecekben, a csoportjuknak megfelelően. Erre azért volt szükség, mert ekkor még nem tudtam egyedileg megjelölni őket. 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. Mindegyik hal más azonosító számot kapott, így a csoportok megkülönböztethetővé váltak.

A vízparaméterek mindkét recirkulációs rendszerben 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 mg l⁻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 etettem (Aqua start; Aqua Uni, Aqua Garant, Pöchlarn, Ausztria).

2.1.2 Zebradánió

A zebradániókat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének ZebTEC[®] recirkulációs rendszerében tartottam (Tecniplast, Olaszország). 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) etettem. 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 etettem.

2.2 Halak kezelése a vizsgálatok előtt

A pontyokat a termékenyítési, illetve spermavizsgálatok előtt Ovopellel (GnRH analóg; D-Ala⁶, Pro⁹ Net-mGnRH /18-20 μ g/) kezeltem. 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). 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.

2.3 Generációk létrehozása

2.3.1 Pontyok szülői nemzedékének (P) kialakítása

A szülői nemzedék 2016-ban, egynyarasan került a Dinnyési Halgazdaság Kft.-ből és a Jászkíséri 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 egyrésről ki akartam választani azokat az egyedeket, amelyeknek a spermája kevésbé mélyhűthető, másrésről pedig azokat, amelyek spermájának progresszív motilitása felolvasztás után 40% felett van, hiszen szakirodalmi adatok alapján ez az érték jónak számít. 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.

2.3.2 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 lefejttem az ikrát. 12 darab, egyenként 10 grammos ikratételt különítettem el. Ezeket 6 darab tejes frissen fejt, illetve előzőleg mélyhűtött spermájával termékenyítettem, így összesen 12 csoportot létrehozva. A termékenyítéshez felhasznált sperma mennyisége ikratételenként 50 μ L volt. A sperma minőségét fagyasztás előtt, majd azt követően CASA segítségével mértem meg. A spermát az ikrához adagoltam, majd 100 μ L rendszervíz hozzáadása után spatulával 1 percig kevergettem. 1 perc után Woynárovich-féle oldatot (10 liter rendszervíz, 40 g konyhasó, 30 g karbamid) adtam hozzá, annak érdekében, hogy az ikraszemek ne tapadjanak össze. Folyamatos kevergetés közben adagoltam további

Woynarovich-féle oldatot a duzzadó ikratételekhez. 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.

2.3.3 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. Ezekről a pontyokról a hormonkezelés után vett spermát számítógépes spermavizsgáló rendszer (CASA) segítségével vizsgáltam meg. A mintákat Horváth és munkatársai (2003) által kidolgozott módszer szerint mélyhűtöttem. A mintákat felhasználásig folyékony nitrogénben tároltam. A felolvasztás utáni motilitás méréséhez szintén CASA-t használtam (ld. 3.4 Sperma gyűjtése, vizsgálata, mélyhűtése, termékenyítés).

Egy darab P ponty ikráját használtam fel az összes csoport létrehozásához, még hozzá ahogy 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 ikratételenként 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 ikratételeket ezúttal is Woynarovich-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.

2.3.4 Szülői (P0) zebradániók kiválogatása

50 darab zebradánió hím spermájának minőségét vizsgáltam meg CASA segítségével. 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.

2.3.5 Zebradániók első (F1) generációjának 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.

2.3.6 Zebradániók második (F2) generációjának 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.

2.3.7 Zebradániók harmadik (F3) generációjának 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.

2.4 Sperma gyűjtése, vizsgálata, mélyhűtése, termékenyítés

2.4.1 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: $8,0 \pm 0,2$) 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.

2.4.2 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. 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) 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.

2.5 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.

2.6 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. 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.

2.7 CASA-val mért sejtdenzitás

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 cseppentettem a Makler-kamrára, ezután a CASA segítségével mértem meg a sejtkoncentrációt. 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.

2.8 Sejtdenzitás és a mélyhűtés eredményessége közötti összefüggés

A későbbi mélyhűtési 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 $1,2\text{--}2,1 \times 10^9$ 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.

2.9 Morfológiai és testhossz 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. Ezekhez a pontokhoz igazítva mértem a csoportok közötti különbségeket.

2.10 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, tpsDig2 és MorphoJ szoftverek segítségével, kanonikus variancia-analízissel értékeltem ki.

3 Eredmények

3.1 Ponty

3.1.1 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 ($p < 0,0001$, $r^2 = 0,8289$, $1,849 \times 10^{10} \pm 3,853 \times 10^9$).

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. Fontos azonban megemlíteni, hogy a vizsgálatokhoz immobilizált spermát használtam. CASA-val vizsgálva a mozgó spermiumok fals értéket adhatnak a sejtdenzitásról.

További vizsgálataimhoz a CASA-t használtam sejtdenzitás mérésére is. Ez azért volt praktikus, hiszen a számítógépes spermavizsgáló rendszer elengedhetetlen 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 ($0,74 \pm 0,08$).

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

3.1.2 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 ($p = 0,024$), szignifikánsan befolyásolták a felolvasztás utáni progresszív motilitást. Az eredet, tehát hogy az, hogy az egyedek mélyhűtött vagy friss spermával történő termékenyítésből származtak, nem volt hatással a VCL-re, ahogyan a többi sperma minőségét leíró paraméterre (VAP, VSL, STR, LIN) sem. 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 termékenyítőképessége statisztikailag igazolhatóan nem tért el ($p = 0,86$) egymástól.

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

3.1.4 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. A mélyhűtött spermából született egyedekről elmondható, hogy átlagosan kisebb fejjel, alacsonyabb háttal és keskenyebb faroknyéllel rendelkeztek. 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.

3.2 Zebradánió

3.2.1 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 ($p < 0,001$).

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 (33. ábra). Fontos azonban megemlíteni, hogy a vizsgálatokhoz immobilizált spermát használtam. CASA-val vizsgálva a mozgó spermiumok fals értéket adhatnak a sejtdenzitásról.

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.

A Bürker-Türk kamrával mért spermakoncentráció 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 termékenyítőképességben 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.

3.2.2 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. Ez alátámasztja azt a megfigyelést, miszerint a mélyhűtésnek hatása van a sperma minőségére. 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. 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.

3.2.3 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.

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 zebradánióban. További vizsgálataimban a pontyra koncentráltam.

4 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 egyes szakirodalmi eredményekkel. Saját kísérleteimben a következő sejtkoncentrációkat alkalmazva: $0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 2×10^9 , 4×10^9 sejt/ml és standard 1:9 arányú hígítás, szignifikáns különbséget ($p = 0,0121$) kaptam a 4×10^9 ml⁻¹ ($66 \pm 6\%$) és a kontroll, vagyis az 1:9 hígítású ($1,2-2,1 \times 10^9$ 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 ($0,74 \pm 0,08$).

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. 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. 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, illetve a termékenyülésnél a spermium és az ikra közötti kémiai kommunikáció is közrejátszhat a termékenyülésben.

A vizsgált zebradániók esetében nem találtam statisztikailag igazolható különbséget ($p > 0,05$) sem a termékenyítőképességben, sem pedig a sperma motilitási eredményeiben a friss spermából és a mélyhűtött spermából született egyedek spermájának termékenyítőképessége 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.

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, azonban sikerült igazolnom.

Egyes kutatások eredményei azt mutatják, hogy a spermamélyhűtés pozitívan befolyásolja a növekedést, mások pedig ennek az ellentétét találták. A mélyhűtés azonban nem csak testméretbeli eltéréseket, hanem deformációkat is okozhat az egyedekben. 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 ($p > 0,05$).

5 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 egyed vizsgálatánál 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 testparaméterei 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 morfológiájára. Ez esetben a mélyhűtés kisebb fejet, alacsonyabb hátat és keskenyebb faroknyelet eredményezett. Megállapítható tehát, hogy a mélyhűtés egyfajta sejtselekciónal 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 fenotípusára, 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 testalakbéli 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.

6 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 termékenyítőképességre. A mélyhűtésnél alkalmazott magasabb

koncentrációjú spermával történő termékenyítés nagyobb termékenyülést eredményez.

7 Az értekezés témakörében megjelent közlemények

7.1 Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

2019: **Bernadett Pataki**, Tímea Kollár, Zoran Marinović, Jelena Lujčić, Gyöngyi Gazsi, Roberta Izabella Berta, Béla Urbányi, Ákos Horváth. Zebrafish (*Danio rerio*) sperm cryopreservation. 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture, Vodice-Croatia, February 17 - 22, 2019

2019: **Bernadett Pataki**, Tímea Kollár, Zoran Marinović, Jelena Lujčić, Gyöngyi Gazsi, Roberta Izabella Berta, Béla Urbányi, Ákos Horváth. Inheritance of sperm cryoresistance in zebrafish (*Danio rerio*). 7th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Rennes-France, September 2- 6, 2019

2019: **Bernadett Pataki**, Logan Andrew Goddard, Béla Urbányi, Tímea Kollár, Ákos Horváth. Investigation of sperm agglutination and a new method for measuring sperm concentration in common carp (*Cyprinus Carpio*). Aquaculture Europe 2019. Berlin-Germany, October 7-10, 2019

2019: **Pataki Bernadett**, Berta Izabella Roberta, Gazsi Gyöngyi, Goddard Andrew Logan, Marinović Zoran, Lujčić Jelena, Urbányi Béla, Kollár Tímea, Horváth Ákos. Mélyhűthetőség öröklődésének vizsgálata zebradánióban (*Danio rerio*). 25. Szaporodásbiológiai Találkozó. Balatonkenese, November 08-09.

2020: **Pataki Bernadett**, Urbányi Béla, Kollár Tímea, Horváth Ákos. Három különböző módszer összehasonlítása a pontysperma (*Cyprinus carpio*) koncentrációjának méréséhez. XLIV. Halászati Tudományos Tanácskozás. Szarvas, Szeptember 23-24.

2021: **Bernadett Pataki**, Tímea Kollár, Roberta Izabella Berta, Béla Urbányi, Ákos Horváth. Inheritance of sperm cryoresistance in zebrafish (*Danio rerio*). The 56th Croatian & 16th International Symposium on Agriculture. Vodice, Horvátország, Szeptember 20-25.

2021: **Bernadett Pataki**, Béla Urbányi, Tímea Kollár, Ákos Horváth. Inheritance of sperm cryoresistance in common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Europe 2021. Funchal, Madeira, Október 4-7.

2021: **Pataki Bernadett**, Urbányi Béla, Kollár Tímea, Horváth Ákos. Mélyhűthetőség öröklődésének vizsgálata pontyban (*Cyprinus carpio*). 26. Szaporodásbiológiai Találkozó. Balatonkenese, November 5-6.

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

2022: **Bernadett Pataki**, Ádám Staszny, Gergely Mészáros, Nevena Kitanović, András Ács, Árpád Hegyi, József Molnár, Balázs Csorbai, Béla Urbányi, Ákos Horváth. Morphological changes in common carp (*Cyprinus carpio*) progeny induced by the use of cryopreserved sperm. 57th Croatian & 17th International Symposium on Agriculture. Horvátország, Vodice, Június 19 – 24

7.2 Impakt faktoros, idegen nyelvű közlemények

Uros Ljubobratovic, Géza Péter, Ferenc Zoltán Demény, Nándor Kugyela, Akos Horvath, **Bernadett Pataki**, Zoltán Horváth, Zsuzsanna J. Sandor, Andras Rónyai. Evaluation of the optimal oocyte diameter for artificial reproduction in virgin pikeperch (*Sander lucioperca* L.) in fully controlled conditions relating to the different dietary levels of arachidonic acid. Aquaculture Reports, Volume 18, November 2020. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100430

Bernadett Pataki, Ákos Horváth, Gergely Mészáros, Nevena Kitanović, András Ács, Árpád Hegyi, József Molnár, Balázs Csorbai, Béla Urbányi. Adjustment of common carp sperm concentration prior to cryopreservation: Does it matter? Aquaculture Reports, Volume 24, June 2022. DOI: 10.1016/j.aqrep.2022.101109

8 Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

8.1 Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent közlemények

2020: Nguyen Quyen, **Pataki Bernadett**, Nevena Kitanović, Horváth Ákos, Havasi Máté Keszte Szilvia, Urbányi Béla, Harmut Greven, Müller Tamás. Kísérletek az afrikai harcsa természetes ívási viselkedésének részletes feltárására In: Biró Janka (Bíró Janka Haltakormányozás) (szerk.) Halászatfejlesztés 37: A XLIV. Halászati Tudományos Tanácskozás kiadványa. Konferencia helye, ideje: Szarvas, Magyarország 2020.09.23. - 2020.09.25.

8.2 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Bernadett Pataki, Berta Izabella Roberta, Gyöngyi Gazsi, Béla Urbányi, Tímea Kollár & Ákos Horváth. Effect of age on the mercury sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY Volume 46 Issue 5, October 2020. DOI: 10.1007/s10695-020-00875-9

Uros Ljubobratović, Ferenc Zoltán Demény, Géza Peter, Oleksandr Malinovskyi, Maciej Kwiatkowski, **Bernadett Pataki**, Ákos Horváth. Can artificial reproduction strategies (hormonal type and dose/thermal regime) affect gamete quality in indoor-reared pikeperch (*Sander lucioperca*)? Aquaculture Reports, Volume 23, April 2022. DOI: 10.1016/j.aqrep.2022.101032