



A BALATONI SUDÁR PONTY (*CYPRINUS CARPIO MORPHA ACCUMINATUS*) ÉS A HÉVÍZI TÖRPEŰMAGYAR VADPONTY (*CYPRINUS CARPIO MORPHA HUNGARICUS*) SPERMAMÉLYHÚTÉSÉNEK ÉS INTENZÍV RENDSZERBEN TÖRTÉNŐ SZAPORÍTÁSÁNAK VIZSGÁLATA, VALAMINT *IN VITRO* SPERMABANKJÁNAK MEGALAPOZÁSA

Doktori értekezés

DOI: 10.54598/000860

Várkonyi Levente

Gödöllő

2021

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, MTA rendes tagja

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezető: Dr. Bernáth Gergely

tudományos munkatárs

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Urbányi Béla

egyetemi tanár, MTA doktora

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

.....
A programvezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Jelölések, rövidítések jegyzéke	5
1. BEVEZETÉS	7
1.1. Célkitűzések.....	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. A ponty taxonómiai besorolása	11
2.2. A ponty eredete és elterjedése	11
2.3. A ponty morfológiája, életmódja	14
2.4. Magyarországi ponty tájfajták	16
2.4.1. A balatoni sudár ponty bemutatása	18
2.4.2. A hévízi törpenövésű magyar vadponty bemutatása	19
2.5. A ponty szaporodásbiológiája	21
2.5.1. A petefészek felépítése	22
2.5.2. A petesejt kialakulása és fejlődése	22
2.5.3. A here felépítése	23
2.5.4. Az hímvarsejtek kialakulása és fejlődése.....	23
2.5.5. A termékenyülés folyamata.....	25
2.6. A ponty keltetőházi szaporítása	26
2.7. Intenzív rendszerben történő ikrakeltetés és lárvanevelés	27
2.8. A hímvarsejtmélyhűtés bemutatása	29
2.8.1. A spermamélyhűtés alapjai.....	30
2.8.2. A sperma kinyerése és rövidtávú tárolása	31
2.8.3. A spermaminősítés	31
2.8.4. A sperma motilitás vizsgálata	32
2.8.5. A hűtőmédium és az egyensúlyi idő	34
2.8.6. A sperma mélyhűtésének módszerei	35
2.8.7. A sperma tárolása	37
2.8.8. A sperma felolvasztása	37
2.9. A ponty hímvarsejt mélyhűtése.....	38
2.10. Spermabankok jelentősége.....	39
2.11. Nagy mennyiségben mélyhűtött hímvartermék felhasználása a szaporítás során	40
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	43

3.1.	A szaporodásbiológiai és ivarsejtmélyhütési vizsgálatok általános bemutatása balatoni sudár ponty és hévízi törpenövésű magyar vadponty esetében	43
3.1.1.	Kísérleti állomány kezelése	43
3.1.2.	Mintavétel.....	43
3.1.3.	Spermaminták minősítése	43
3.1.4.	Spermamélyhűtés.....	44
3.1.5.	Felolvasztás.....	46
3.1.6.	A kelési arány és a sejtkoncentráció meghatározása	47
3.1.7.	Az eredmények statisztikai elemzése.....	47
3.2.	A balatoni sudár ponty anyaállomány beszerzése	47
3.3.	A balatoni sudár ponty állomány tartása.....	48
3.4.	A balatoni sudár ponty állomány kezelése	50
3.5.	A balatoni sudár ponty állományon elvégzett vizsgálatok kísérleti terve	51
3.6.	A hévízi törpenövésű magyar vadponty anyaállomány beszerzése	60
3.7.	A hévízi törpenövésű magyar vadponty állomány tartása.....	60
3.7.	A hévízi törpenövésű magyar vadponty állomány kezelése.....	61
3.8.	A hévízi törpenövésű magyar vadponty állományon elvégzett vizsgálatok kísérleti terve	62
4.	EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE	67
4.1.	A balatoni sudár pontyon elvégzett vizsgálatok eredményei.....	67
4.2.	A hévízi törpenövésű magyar vadpontyon elvégzett vizsgálatok eredményei.....	86
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK	91
5.1.	Következtetések.....	91
5.1.1.	A balatoni sudár ponty esetében elért eredmények következtetései.....	91
5.1.2.	A hévízi törpenövésű magyar vadponty esetében elért eredmények következtetései	97
5.2.	Javaslatok	99
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	101
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	103
8.	SUMMARY	109
9.	MELLÉKLETEK	115
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	137

Jelölések, rövidítések jegyzéke

1. táblázat. Doktori munkában megtalálható rövidítések jegyzéke.

Szövegben használt rövidítés	Teljes elnevezés
°C	Celsius-fok
BSA	Bovine Serum Albumin (szarvasmarha szérum albumin)
CASA	Computer-assisted Sperm Analysis (számítógépes spermavizsgáló berendezés)
CO ₂	Széndioxid
CRF	Controlled-Rate Freezer (programozható fagyasztó berendezés)
DNS	Dezoxiribonukleinsav
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Élelmiszerügyi és Mezőgazdasági Világszervezet)
fe	fejhossz
fn	faroknyélhossz
fsz	fejszélesség
FVM	Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium
g	gramm
IUCN	International Union for Conservation on Nature and Natural Resources (Nemzetközi Természetvédelmi Unió)
Kft.	Korlátolt felelősségű társaság
l	liter
LIN	Linearity (az útvonal egyenestől számított eltérése)
MA-HAL	Magyar Akvakultúra és Halászati Szakmaközi Szervezet
MATE, AKI	Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
MATE, AKI HAKI	Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halászati Kutatóintézet
mg	milligramm
ml	milliliter
mm	milliméter
mp	másodperc
msec	Millisecond (milliszekundum)
N. A.	Nincs adat
NAIK-HAKI	Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Halászati Kutatóintézet
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
(NH ₂) ₂ CO	Karbamid
NH ₃	Ammónia
NH ₄ ⁺	Ammónium
OMMI	Országos Mezőgazdasági Minőségvizsgáló Intézet
PLC	Programmable Logic Controller (programozható logikai vezérlő)
pMOT	Progressive motility (progresszív motilitás)
RAS	Recirculating Aquaculture Systems (Recirkulációs akvakultúra rendszerek)
rpm	Revolutions per minute (percenkénti fordulatszám)
T	hőmérséklet
tm	testmagasság

tsz	testszélesség
tkg	testtömeg kilogramm
µl	mikroliter
UV	Ultraviolet (ultraibolya)
V	Volt
VCL	Curvilinear velocity (a megtett, teljes mozgási útvonalra számolt sebesség)
Zrt.	Zártkörűen működő részvénytársaság

1. BEVEZETÉS

A ponty (*Cyprinus carpio*) a világ és hazánk egyik legfontosabb édesvízi tenyésztett halfaja (ALIKHUNI 1966; FAO 1996, 2020). A Földön 89 ország tenyészt, illetve állít elő pontyot, 39 országnál pedig kimagasló jelentőséggel bír. Hazánkban a 17 ezer tonna az előállítás, ami a piaci haltermelésünk 79,5 %-át jelenti. Magyarország, Lengyelországgal és Csehországgal közösen az éves Európai Unió termelés közel 68 %-át teszi ki (FAO 2020; MA-HAL 2019; URBÁNYI & STASZNY 2018). A gazdasági haltermeléssel szemben az élőhelyek folyamatos beszűkülése és a nemesített pontyfajtákkal való hibridizáció következménye, hogy a vadponty (*Cyprinus carpio carpio*) populációk lassú, de folyamatos csökkenése mutatkozik. Napjainkra a jelenség oly méretet öltött, hogy az IUCN Vörös Listáján is szerepel a dunai alpopuláció, mint "critically endangered" (fokozottan védett) állomány (KOTTELAT 1996). Az említett természetvédelmi szempont miatt, rendkívül fontos a genetikailag tiszta állományok felkutatása és megóvása. Az egy vízgyűjtő területen élő sudár és a hévízi vadponty genetikai háttere mind gazdasági, mind pedig természetvédelmi vonatkozásban kiemelkedő jelentőséggel bír hazánkban (UDVARI 2017).

A Hévízi-tó Európa legnagyobb természetes medrű, gyógyhatású tőzegtava (KÖRMENDI et al. 2008). A számos idegenhonos halfaj mellett, mindössze egy őshonos található benne. Az említett hal egy specializálódott pontyfajta, mely rendkívül jól alkalmazkodott a nagyon sajátos tavi körülményekhez (SPECIÁR 2004). Az említett morfológiailag elkülönülő változat kizárólag itt fordul elő és önfenntartó állományt alkot. Alkalmazkodásának következménye, hogy a populáció törpenövésű egyedekből áll és nagyon sajátos, egyedi genetikai tulajdonságokkal rendelkezik. Elviseli a tartósan magas hőmérsékletet, melyet más hazai ponty tájfajtáink nem tolerálnak (HORVÁTH & URBÁNYI 2004). Származását tekintve a dunai vadpontyból eredeztethető, melyet genetikai vizsgálatok is alátámasztanak, azonban az IUCN Vörös Listáján nem szerepel. Ezen oknál fogva természetvédelmileg sebezhető állományt alkot (KOTTELAT 1996; LEHOCZKY et al. 2005a, b; 2007).

A sudár ponty gazdasági szempontból képvisel nagy értéket hazánkban. Az államilag hivatalosan elismert tájfajta tulajdonosa és fenntartója a Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt. (UDVARI 2017). Az állami szervezet célja a balatoni halállomány megőrzése és növelése. A társaság fő feladata a természetes populációk fenntartása, illetve az évről évre történő szaporítás és telepítés. A sudár ponty

horgászturisztikai értéket is képvisel, hiszen igen közkedvelt (első számú) zsákmányhal a tóban és vízgyűjtőjén. Genetikai állományának megőrzése mind gazdasági, mind pedig ökológiai szempontból lényeges (NÉBIH 2011).

A ponty, mint más gazdasági halfajaink, hímivartermékének mélyhűtése évről évre növekvő jelentőséggel bír. Számos mélyhűtési módszer született már gazdaságilag, valamint a természetvédelmi szempontból jelentős halfajok esetében (BLAXTER 1953; CABRITA et al. 2010; MOCZARSKI 1977). Gazdasági hasznán túl a mélyhűtött sperma szerepet játszhat a génmegőrzésben, hiszen a konzervációbiológiai akciótervek nélkülözhetetlen része (CABRITA et al. 2010). A pontysperma fagyasztásának kidolgozása több évtizedes múltra tekint vissza (MOCZARSKI 1977). Az eljárásoknak köszönhetően a fagyasztott minták ellenőrzött minőségűek és a szaporítás során, pontosan adagolhatók, akár nagy mennyiségű ikra termékenyítéséhez. Az eljárások a haltermelési gyakorlatba történő bevonása azonban nem valósult meg (URBÁNYI 2011). A pontyféléknél a felolvasztás után jelentkező agglutináció miatt fontos lenne egy egységes és fajspecifikus módszer teljes körű kidolgozása, amely megbízhatóan alkalmazható keltetőházi körülmények között (MARTÍNEZ-PASTOR et al. 2017).

1.1. Célkitűzések

Doktori munkám során a következő kísérletek megvalósítását tűztem ki célul:

Balatoni sudár ponty

1. Az ökonómiai jelentőséggel bíró sudár ponty esetében a pontyfélékre kidolgozott spermamélyhűtési eljárás gazdaságosabbá tétele. A nagy mennyiségű spermamélyhűtési eljárás kidolgozása (5 ml-es műszalma és az 5-10 ml-es kriocső), polisztirol doboz és programozható mélyhűtő berendezése alkalmazása során.
2. A ponty ivartermékére jellemző, felolvasztás után jelentkező agglutináció megszüntetése egy újonnan alkalmazott csuka hígító alkalmazásával.
3. Az 5 és 10 ml-es kriocső vízfürdőben végzett felolvasztási idejének optimalizálása pér és csuka hígító használatát követően.
4. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő szaporítás natív és mélyhűtött ivartermék felhasználásával.
5. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő ponty szaporítás és lárvanevelés elvégzése, nyomon követve az egyedek növekedését, megmaradását és morfológiai elváltozásait.
6. A gazdasági jelentőséggel bíró tájfajta *in vitro* spermabankjának megalapozásával, hozzájárulhatok az állomány genetikai értékének megőrzéséhez, valamint a tó természetes populációjának megóvásához.

Hévízi törpenövésű magyar vadponty

1. Vadon befogott tejesek közvetlen tóparton történő, illetve zárt intenzív recirkulációs rendszerben tartott egyedek spermiációjának hormonális indukálása.
2. A sebezhető természetvédelmi besorolású pontyfélé ivartermékének polisztirol dobozban és programozható mélyhűtő berendezésben történő fagyasztása pér és csuka hígító használata során (agglutináció kiküszöbölése).
3. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő szaporítását natív ivartermékkel, nyomon követve az egyedek növekedését, megmaradását és morfológiai elváltozásait.
4. A hévízi vadponty *in vitro* spermabankjának megalapozása, hozzájárulva a faj konzervációbiológiai értékének megőrzéséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A ponty taxonómiai besorolása

PINTÉR (2015) nyomán a ponty rendszertani besorolása:

Ország: Állatok (*Animalia*)

Törzs: Gerinchúrosok (*Chordata*)

Főosztály: Csontos halak (*Osteichthyes*)

Osztály: Sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*)

Rend: Pontyalakúak (*Cypriniformes*)

Család: Pontyfélék (*Cyprinidae*)

Alcsalád: Valódi pontyok (*Cyprininae*)

Nem: *Cyprinus* (Linnaeus, 1758)

Faj: Ponty (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758)

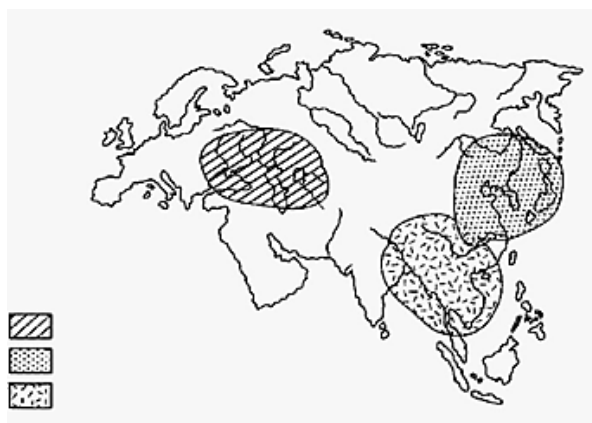
A ponty a pontyfélék családjának névadója. Az alfajokat külső morfológiai bélyegeik (hát- valamint lágy úszósugaraik száma, pikkelyképleteik, bajuszszálak számával) alapján különítjük el egymástól (PINTÉR 2015).

2.2. A ponty eredete és elterjedése

A ponty a pontyfélék családjának (*Cyprinidae*) legelterjedtebb tagja. Két alfaja a *Cyprinus carpio carpio* azaz az európai, illetve a *Cyprinus carpio haematopterus* másnéven az ázsiai törzsalakja a természetes, illetve a részben tudatos emberi tevékenységnek köszönheti az elterjedését. Az elmúlt évtizedekben mindkét ősi formát háziasították, valamint hibrideket hoztak létre a különböző vonalokból és számos visszakeresztezésben használták őket (VANDEPUTTE 2003). A bolygónk legészakibb területei kivételével gyakorlatilag mindenhol megtalálható. Eredetét tekintve számos elmélet látott napvilágot, ugyanis az őslénytani leletek nagyon hiányosak (GORDA 2004). KOMEN (1990) szerint keveset tudunk a vadponty eredetéről és annak elterjedéséről, ami annak köszönhető, hogy nemesített változatok gyakran kijutottak a természetes vizekbe. Egyes elméletek szerint a faj már a földtörténeti harmadkorban elterjedt volt az Eurázsiai kontinens vizeiben, de a jégkorszakok miatt az előfordulási területe keleti és nyugati részre szakadhatott (KIRPITCHNIKOV 1999). Egyes kutatók ellentmondanak ezen elméletnek, miszerint a faj Ázsiából származik (FROUFE et al. 2002). Nem kizárható az az elmélet sem, miszerint a Duna vízrendszerében már korábban is őshonos volt (LEHOCZKY 2006).

BALON 1974-ben, valamint 1995-ben megjelent értekezése alapján a ponty eredeti őshazája Közép-Ázsia, ahonnan természetes úton terjedt el Kínáig, illetve a Duna vízrendszeréig. Kutatásában kizárta a jégkorszak előtti európai előfordulását. Az elméletét alátámasztja, hogy nem tudott elterjedni Skandináviában, a Brit-szigeteken, továbbá nem jutott el természetes úton Amerikába (MCCRIMMON 1968). A keleti kontinensekre kizárólag azok szétválása után volt képes eljutni (LEHOCZKY 2006). A ponty őse a Kaszpi-tenger térségében alakulhatott ki a pleisztocén korszakban, majd a jégkorszak utáni hőmérséklet emelkedésével az egyes pontytörzsek terjedhettek el Kelet-Ázsiában, az Aral-tó vízrendszerében és a Fekete-tenger környékén (HARKA 1997; KOVÁCS et al. 2018). A korai tanulmányok, morfológiai bélyegek alapján [hátúszó lágy úszósugarai, a pikkelyek, valamint a csigolyák száma alapján (SVETOVIDOV 1933)] két alfajt, egy ázsiai és egy európai eredetűt (KOVÁCS et al. 2018). Később négy-öt különböző alfaj elkülönítését hagyták jóvá (KIRPICHNIKOV 1967; LEHOCZKY 2006; PINTÉR 1989), majd ezt az álláspontot felülbírálták, és modern genetikai vizsgálatok alapján a jelenleg létező pontyformákat három alfajba sorolják (GROSS et al. 2002; KOHLMANN et al. 2003, 2005; KOHLMANN & KERSTEN 1999; VANDEPUTTE 2003; ZHOU et al. 2004):

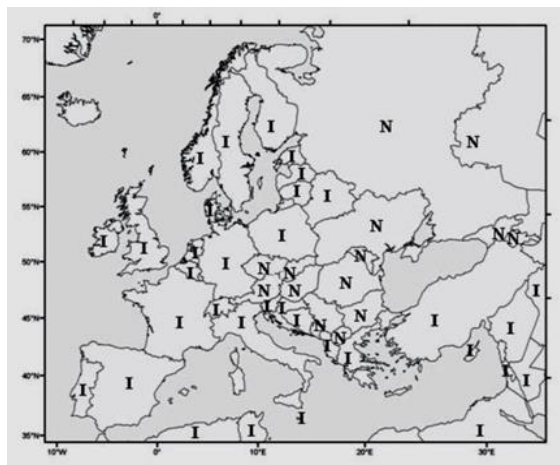
- európai-transzkaukázusi ponty (*C. c. carpio*)
- távol-keleti (amuri) ponty (*C. c. haematopterus*)
- délkelet-ázsiai (észak-vietnami) ponty (*C. c. viridiviolaceus* / *C. c. rubrofuscus*) (KOVÁCS et al. 2018) (1. ábra).



1. ábra. Az eurázsiai vad ponty populációk elterjedése (Fotó: KIRPICHNIKOV 1999).

A különböző pontyváltozatok számos hatás következtében alakultak ki (HULATA 1995). A közép- és kelet-európai régióban több pontyváltozat is található (BÁRTFAI et al. 2003). A legrégebben és étkezési céllal házasított halfaj a ponty (STEFFENS 1980). Tenyésztésének története a Kr. e. 12. századnál korábbi időkre tehető Kínában (BALON 1995, 2004; ORBÁN & WU 2008). Tényleges tavi tartása a

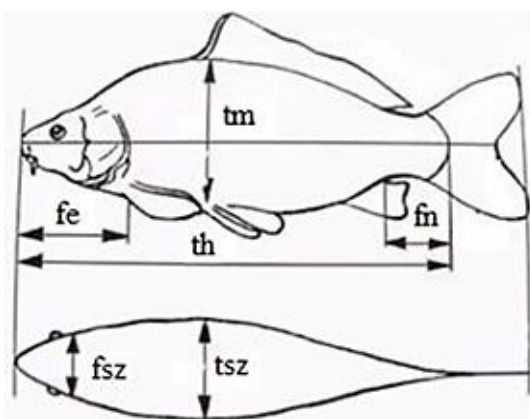
Shang dinasztia ideje alatt kezdődött meg a Kr. e. 20. században. Az első írásos emléket a tenyésztéséről FAN LI könyve tesz említést Kr. e. 460-ban. Tenyésztésének virágzása a Han dinasztia uralkodása idejére (Kr. e. 206–Kr.u. 220) datálódik. Ekkor a halakat már elsődleges, célzott fajként tenyésztették. A fő álláspont szerint az európai házasított ponty elődje az ázsiai ponty volt, melyet az ókori görögök és rómaiak idejében hoztak be Európába (CHIBA et al. 1966; GÜNTHER 1868; VOOREN 1972; ZHOU et al. 2003). A kontinensen történető házasítása az ókori Római Birodalom és a kereszténység európai elterjedésének idején történt (BALON 2006; FLAJŠHANS & HULATA 2006; HORVATH et al. 1984). DAY (1880) leírta, hogy az első feljegyzések Európából a 6. századból származnak. A 13. századtól egyes kolostorok a Dunából vadon befogott halakat tartották kis méretű tavaikban. A 15. századtól a halételek népszerűségének köszönhetően robbanásszerűen elterjedt egész Európában. A pontytenyésztés központja a Bohemia hegyvidék (Dél-Csehország) és környéke lett. Az 1500-as évekre a dunai ponty eljutott Hollandiába, Dániába, sőt Angliába is. Svédországba hajón szállították be (BERCSÉNYI & TAHY 1997). Kaliforniába 1872-ben, míg Kanadába 1877-ben jutott el (LACHNER et al. 1970; MOYLE 1976; SARIG 1966). A ponty csak néhány Európában, kizárólag a Duna vízgyűjtő területén található országban őshonos (CSERVENI-SZÚCS 2013) (2. ábra).



2. ábra. A ponty európai előfordulása (N=őshonos, I=betelepített) (Fotó: FLAJŠHANS & HULATA 2006).

2.3. A ponty morfológiája, életmódja

Testalkatának kialakulását számos tényező befolyásolhatja, mely egyedenként eltérő és nagyszámú változékonyságot mutathat. Befolyásolhatják örökletes alapon kapott tulajdonságok, de a külső környezeti tényezők egyaránt. Testük szélességének, magasságának, hosszának jellemzésére, mérésére a nemesítői munkák során számos mutatót használnak (3. ábra) (PINTÉR 2002).



3. ábra. A ponty jellemzésére használt mutatók és paraméterek (Fotó: PINTÉR 2002).

A vizeinkben élő vadpontynak két formáját különböztetjük meg a nyurga ponty (*Cyprinus carpio morpha hungaricus*, HECKEL_1836), valamint a tőponty (*Cyprinus carpio m. acuminatus*) (GORDA 2004; HECKEL & KNER 1858; SCHAPERCLAUS 1963) a profilindex és a fejindex eltérő értéke alapján (2. táblázat). A nyurga ponty teste nyújtott, hengeres, míg a tőponty egy magasabb hátú, rövidebb testű, oldalról viszonylag lapítottabb formájú. A vadpontyok feje viszonylag nagy, szemük a testhez viszonyítva kicsi (PINTÉR 2002).

2. táblázat. A ponty morfológiai megkülönböztetésére használt paraméterek (PINTÉR 2002).

Megkülönböztető jegyek	Vadponty		Tógazdasági pontyfajták	
	nyurga	tő	egyenes hátívű	hirtelen hátívű
profilindex	3,5-4,5	2,8-3,5	2,6-3,0	2,0-2,6
keresztmetszetindex	1,4-1,8	1,5-2,0	1,5-1,8	1,8-2,2
fejindex	3,8-4,3	3,6-4,1	N. A.	N. A.
faroknyélindex	1,4-2,0	1,6-2,2	N. A.	N. A.

A pontyok fog nélküli állkapoccsal, garatban lévő garatfoggal rendelkeznek, mely ideális határozó bélyeg (ORBÁN & WU 2008). A ponty hátúszójának első úszósugara a kemény csontú, kissé ívesen hajló, belső felületén fogazott bognártüske található (PINTÉR 2015). Egyes kutatók szerint a faj rendszertani bélyegei következőképpen meghatározhatók (BERINKEY 1966; CZUCZKA 2002):

- Úszósugárképlet: D (hátúszó) III (IV) / (15)16-21(22), A (farokalatti úszó) III 5 (6), P (mellúszó) I 16-18, C (farokúszó) II 8-9.
- Csigolyaszám: 34-39.
- Pikkelyképlet: 33-40 vagy 32-41 (HARKA & SALLAI 2007).
- Kopoltyútüskék: 21-29.
- Garatfogképlet: 1.1.3-3.1.1 = a fogak 3 sorban állnak, a belső sorban 3-3, a többiben 1-1 fog van vagy 1.2.3-3.2.1 (HARKA & SALLAI 2007).
- Haploid kromoszóma szám: 50 (n) (BERINKEY 1966).

A száj végállású - csúcsba nyíló és harmonikaszerűen kitolható. A felső ajkán két rövidebb, a száj két szegleténél 1-1 hosszabb bajuszszál található. Orra hosszú, tompán lekerekített, homloka széles és erősen domború. A farokúszó nagy felületű és erősen kivágott. Cycloid pikkelyei nagyok. Testalkatához hasonlóan színe is rendkívül változatos. A különböző kultúrváltozatok között gyakran akadnak albínó, fekete és aransárga példányok. A hát általában sötétzöld vagy olajzöld színezetű lehet, az testoldala zöldes- aransárga, míg a hasa sárgás, vagy teljesen fehér (PINTÉR 2015). Életterük az álló és lassú áramlású folyóvizek, holtágak. Kitűnően alkalmazkodtak a víz viszonylag magasabb sótartalmához is (HARKA & SALLAI 2007). Gyorsan növekedő halfaj. A ponty színezete jelentősen függ az élőhelyétől. Jól tolerálja az alacsony oldott oxigén szintet (0,5 mg/l), azonban az optimális számára a 3-4 mg/l. A hőmérsékleti tényezőre nézve is tágtűrűsű faj, képes életben maradni akár a 0 °C-os környezetben, valamint képes a 30 °C-ot rövid ideig tolerálni. Életkörülményei fenntartásához az optimális hőmérséklet 20-25 °C között alakul (HORVÁTH & URBÁNYI 2004). A hőmérséklet csökkenésével egyenes arányban mérséklődik a hal táplálkozása is, ami 8 °C alatt teljesen megáll. Fagyponthoz közeli hőmérsékleten az egyedek hibernált állapotba kerülnek. Mindenevő halfaj, mely tulajdonsága a tenyésztés során nagy gazdasági előnnyel bír (KOVÁCS et al. 2018). Természetes környezetben változatos táplálkozást mutatnak, elsősorban apróállat fogyasztók (HORVÁTH et al. 2009).

2.4. Magyarországi ponty tájfajták

Magyarországon a fajtaelismerést az állattenyésztésről szóló 1993. évi CXIV törvény és a végrehajtásáról kiadott a fajtaelismerés rendjéről szóló 123/2005.(XII. 27.) FVM rendelet szabályozza. A 2019. augusztus 1-jén hatályba lépett rendelet szerint az államilag elismert pontyfajták teljesítményvizsgálati rendszerének szervezése a tenyésztőszervezetek feladata. A határozat alapján 2020-tól a NAIK-HAKI (jelenleg MATE-AKI-HAKI), koordinálja a fajtaelismerésére irányuló teljesítményvizsgálatokat, míg a Magyar Akvakultúra és Halászati Szakmaközi Szervezet (MA-HAL) kizárólag segíti a tenyésztők munkáját (MA-HAL Pontytenyésztő Tagozat, 4./2021.(02.18.) sz. határozat). A vizsgálat során nyolc tulajdonságot vesznek alapul (életképesség, megmaradási arány, növekedőképesség, takarmányértékesítő-képesség, vágóérték, testméret-index, zsírtartalom, örökletes testi hibák). Hazánkban 21 tenyésztői szervezetnél összesen 33 államilag elismert hivatalos pontytájfajtát tartanak számon (3. táblázat) (UDVARI 2017).

3. táblázat. Magyarországon hivatalosan elismert pontytájfajták listája (UDVARI 2017).

Nyilvántartási szám	Fajta	Tenyésztő szervezet neve
388/2013	Apaji pikkelyesponty	Szomor Dezső
204/98	Attalai tükrös ponty	Attalai Haltermelő és Értékesítő Kft.
189/96	Balatoni sudár ponty	Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt.
234/99	Biharugrai tükrösponty	Biharugrai Halgazdaság Mg. Term. Ért. és Természetvédelmi Kft.
217/98	Bikali tükrös ponty	Halász Kft.
185/96	Dinnyési tükrös ponty	Dinnyési Halgazdaság Kft.
208/98	Dunai vadponty	Sporthorgász Egyesületek Bács-Kiskun megyei Szövetsége
267/01	Geleji nyurga ponty	Dél-borsodi Agrár Kft.
167/95	Hajdú P1 pikkelyes ponty	Balogh Szerviz Trans Kft.
168/95	Hajdú T1 tükrös ponty	Balogh Szerviz Trans Kft.
192/97	Hajdúszoboszlói tükrös ponty	Bocskai Halászati Termelő és Szolgáltató Kft.
305/04	Hortobágyi nyurga ponty	Hortobágyi Halgazdaság Zrt.
187/96	Hortobágyi pikkelyes ponty	Hortobágyi Halgazdaság Zrt.
188/96	Hortobágyi tükrös ponty	Hortobágyi Halgazdaság Zrt.
249/00	Mórichelyi tükrös ponty	Tóth István
247/99	Nagyatádi tükrös ponty	V-95 Általános Vállalkozási Kft.
273/02	Ráckevei pikkelyes ponty	Ráckevei Dunaági Horgász Szövetség
337/07	Szabolcsi nyurga ponty	Szabolcsi Halászati Kft.
336/07	Szabolcsi tükrös ponty	Szabolcsi Halászati Kft.
338/07	Szajoli tő ponty	Fish-Coop Kft.
205/98	Szajoli tükrös ponty	Fish-Coop Kft.
131/95	Szarvasi 215. tükrös hibrid ponty	NAIK-HAKI
130/95	Szarvasi P31 pikkelyes hibrid ponty	NAIK-HAKI
129/95	Szarvasi P34 pikkelyes ponty	NAIK-HAKI
124/95	Szegedi tükrös ponty	Szegedfish Kft.
211/98	Tatai acélos nyurga ponty	Tatai Mezőgazdasági Zrt. (FA)
210/98	Tatai aranyárga pikkelyes ponty	Tatai Mezőgazdasági Zrt. (FA)
212/98	Tatai hátpikkelyes tükrös ponty	Tatai Mezőgazdasági Zrt. (FA)
213/98	Tatai palaszürke pikkelyes ponty	Tatai Mezőgazdasági Zrt. (FA)
238/99	Tiszai nyurga ponty	Magyar Országos Horgász Szövetség
387/2013	Tisza-Körösközi vadponty	Fish-Coop Kft.
190/96	Varászlói tükrös ponty	Antalfi Győző
373/2011	Velencei-tavi vadponty	Magyar Országos Horgász Szövetség

2.4.1. A balatoni sudár ponty bemutatása

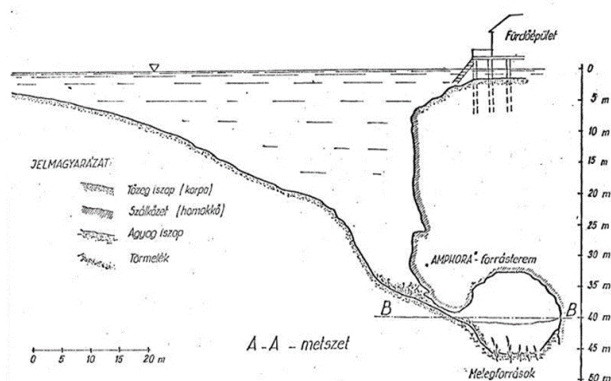
A sudár ponty (4. ábra) a Balaton vízgyűjtő területén élő őshonos államilag hivatalosan is elismert tájfajtánk (UDVARI 2017). Tulajdonosa és fenntartója a Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt., teljesítményvizsgálatát 2011-ben végezték el elsőként (NÉBIH 2011). A program célja a fajta kereskedelmi tevékenységének fellendítése volt, mivel haltermelésben kevésbé voltak közkedveltek a nyurga pontyfélék. Ezeknek a változatoknak jellemzően gyengébb a növekedési erélye, illetve értékesítés nehézségei vannak. Jellemző a tájfajtára a gyengébb húskihozatal és a kisebb hozam (TREMNER 2012). A fenntartásához kiválasztott tőegység Siófoktól 70 km-re D-Ny-ra helyezkedik el, Buzsák, Lengyeltóti és Öreglak községek által határolt külterületeken (NÉBIH 2011). A 2017-es évben újabb teljesítményvizsgálatot végeztek a tájfajtán. A vizsgálat óta a fajtafenntartó már másik telephelyén, Irmapusztán is elismert állományt tart fent. A tőgazdaság Siófoktól nyugatra 35 km-re helyezkedik el, Balatonlellétől déli irányban (GORDA 2017). A sudár ponty testformája hengeres, nyújtott, szép pikkelyzettségű. Színe sárgásbarna a háton, hasi részén világos színű árnyalattal. Élénk, narancsos színű úszókkal rendelkezik, kedvelt sporthal. Húsának minősége kiváló, nem zsíros, gasztronómiai értéke ezáltal magas (MA-HAL 2017).



4 ábra. Balatoni sudár ponty egyed (Fotó: Láng Levente Zete).

2.4.2. A hévízi törpenövésű magyar vadponty bemutatása

A Hévízi-tó egy természetes termálkarszt-forrás, mely mindösszesen 4,4 ha-os kiterjedésű. A meder alapanyaga agyag. A tóban a 38,5 m mélyről feltörő karsztvizet két különálló egymástól hőmérsékletileg eltérő, egy hideg és egy meleg forrás táplálja (5. ábra). Az Európában egyedülálló tavi környezet befolyással bír a környék mikroklímájára sajátos növény-és állatvilágot kialakítva (KÖRMENDI et al. 2008).



5. ábra. A Hévízi-tó forráskráterének és forrástermének függőleges metszeti képe (Fotó: PLÓZER 1977).

Az évek alatt számos kutató vizsgálta a tó halállományának összetételét (BÍRÓ et al. 2002; HARKA et al. 2014; TAKÁCS et al. 2015). Kutatásaikban 6-10 különféle halfajt említenek. SPECIÁR (2004) leírja, hogy a rögzített fajokból mindössze 4 alkot jelentősen, öfenntartó állományt. A négyből 2 adventív (betelepített) halfaj, ilyen a szivárványsügér (*Herotilapia multispinosa*) valamint a szúnyogirtó fogasponty (*Gambusia affinis*). Továbbá egy 1 invazív (idegenhonos) halfaj, mely az ezüstkárász (*Carassius auratus gibelio*). Kimutatta, hogy a tóban kizárólag egy őshonos halfaj található, mely a hévízi vadponty (6. ábra). Már Herman Ottó polihisztorunk is megemlíti 1887-ben megjelent művében, miszerint a ponty egy változata él a tóban, mely összehasonlítva a korabeli változatokkal növekedését tekintve elkorcsosult, törpenövésű egyedekből álló állomány (HERMAN 1887). Az elmúlt években számos kutató foglalkozott az eredetével.



6. ábra. Hévízi törpenövésű magyar vadponty egyed (Fotó: Saját felvétel).

LEHOCZKY et al. (2005a, b; 2007) leírták, hogy a hazai tenyésztett pontytájfajták genetikai bázisa közel áll egymáshoz. Eredményeikben bemutatják, hogy genetikailag jól elkülönül a nemesített tájfajtaétól. A hévízi tóban élő pontyok sajátos genetikai bázissal rendelkeznek. Azonban a törpenövés nem feltétlenül örökléstani meghatározottsággal bír, hanem nagyobb részben a környezeti tényezők összességének eredménye (korlátozott táplálékbázis, szuboptimális hőmérsékletviszonyok stb.). A hévízi vadponty eredetének három lehetséges magyarázata létezik VARGA et al. (2011, 2013) munkái alapján:

- 1.- Az állomány viszonylag hosszú ideje más populációktól elzárva fejlődik, ezért genetikai bázisa (egyedi allélek) különbözhet a szomszédos természetes vizekben élő állományokétól, elsősorban a sudár pontyétól.
- 2.- A véletlenszerűen bevándorolt vadponty ivadékok alkalmazkodása és szelektálódása a sajátos környezeti tényezőkhez, így szűkebb örökléstani változatosságú állományt, de nem új genetikai változatot alkotnak.
- 3.- A sajátos környezeti hatások nem gyakorolnak szelektációs hatást a bekerült pontyokra. A szaporodásbiológiájuk sajátosságaival és a szabályozó feltételekkel, illetve a faj megőrzésével csak évekkel később kezdtek foglalkozni a magyarországi kutatók.

A Nemzetközi Természetvédelmi Unió Vörös listáján a vadponty „vulnerable” (sebezhető) veszélyeztetettségi kategóriába tartozik (KOTTELAT & FREYHOF 2008). Ezzel szemben a vadponty dunai szubpopulációja a „critically endangered” (fokozottan veszélyeztetett) természetvédelmi státuszt viseli (KOTTELAT 1996). Azonban a hévízi vadponty jelenleg nem szerepel az IUCN vörös listán. A sajátos természetes körülményeknek köszönhető a szaporodása eltér a többi hazai pontyféletől (VÁRKONYI 2015). A tó folyamatos magas hőmérséklete hatásal van az

egyedek ivarsejt fejlődésére (DADRAS et al. 2016). Más éghajlati övön a pontyok évente többször is képesek szaporodni (VALENTI et al. 2021). Az elmúlt években számos megfigyelés is született arra vonatkozóan, hogy az unikális élőhelynek köszönhetően a hévízi vadpontyok egész évben szaporodóképesek (VÁRKONYI 2015).

2.5. A ponty szaporodásbiológiája

A szaporodás a halak egyik legsajátosabb életjelensége. A folyamat nagy mennyiségű ivartermék-termelést eredményez. Okai az egyedfejlődés korai fázisában jelenlévő különböző fizikai, kémiai és biológiai hatások, melyek hatalmas veszteségeket okozhatnak az ivadék állományokban. A pontyféléknél ez szülői védelem nélküli folyamat, melyet nagyfokú szaporaságukkal kompenzálnak. A szaporodásba minden olyan életfolyamat beletartozik, mely az utódok kialakulásához elengedhetetlen. A szülői ivarszervek termelik az ivarsejteket (gamétákat), melyekből az egyesülés után a következő generáció (zigóta) kifejlődik. A női gonádot petefészkeknek (ovarium), a hím gonádot pedig herének (testis) nevezik. A szaporítási szervek működésén túl, a megfelelő gaméta termeléshez az egész szervezet zavartalan működése is szükséges. A szaporítási folyamatokat a szakirodalom kétféleképpen taglalja. Szűkebb értelmezésben az ivarsejtek beérését, az ikra megtermékenyülését és korai egyedfejlődést foglalja magába, egészen, az önálló táplálkozásra való áttérésig. Tágabb értelemben beletartozik a reproduktív szervek fejlődése, illetve a táplálkozó lárvaszakasz is. A hazai halak változó testhőmérsékletű (poikilotherm) állatok, tehát az életműködésük sebességét a környezeti hőmérséklet befolyásolja. Az ivartermék (pete, hímivarsejt) szinkronizált fejlődését a hőmérsékleten kívül sok más környezeti feltétel befolyásolja (HORVÁTH 2018; SZABÓ et al. 2000). A ponty gamétái a szakaszos fejlődési típusba tartoznak, mivel az egyes életszakaszok között a változás gyors és látványos átmenettel megy végbe (BALON 1984). A lárva kikelését követően a gonád kezdeményekben jelen van a testi (szomatikus) eredetű sejtek, valamint az elsődleges (primordiális) őssejtekből álló gaméta kezdemények, azaz a germinális sejtek. Később ezekből fejlődnek ki egy többszakaszos fejlődés végén a haploid petesejtek (ovum) és a szintén haploid hímivarsejtek (spermium). Rögzítésüket és táplálásukat a kötőszöveti eredetű szomatikus sejtek látják el (HORVÁTH 2018).

2.5.1. A petefészek felépítése

A női ivarszerv a csontos halaknál így a pontyféléknél is páros szerv, mely alapvetően két különálló csoportra különíthető el. Ilyen a cystovarium típus, melynél a petefészek redőkön található petesejteket kívülről egy zárt hártályos tok burkolja. Ennek a típusnak a petezsákja egy rövid tölcsérszerű vezetéken át nyílik a külvilágra. A zárt tokban, a hasüreg háti részén függeszkedik és a redőzött lamelláin rögzülnek a petesejtek. Az érett petesejtek ezekről a redőkről válnak le az ovuláció során és a petevezetéken (oviductus) keresztül jutnak ki a szabadba. A másik ovárium típus a gymovarium, mely sokkal ősbibb. A különbség ennél a típusnál, hogy a petefészek a szeptumok és a rajtuk rögzült petesejtek szabadon nyúlnak be a hasüregbe (KAGAWA 2013). A csontos halak osztályába tartozó fajok jelentős részénél a petevezető a petefészek elkeskenyedő részéből alakul ki. A kitágult része az úgynevezett uterus, mely egyes elevenszülő fajok esetében azonban az utódok fejlődésének helyéül szolgál. A petevezető a húgynyílás után nyílik a külvilágra, de egyes fajok esetén előfordul a húgyszemölcs is (KISS 2000; BERNÁTH 2016).

2.5.2. A petesejt kialakulása és fejlődése

A pontyfélék esetében a szaporodásra kész gaméták sok éven át jutnak el a megfelelő fejlettségi állapotba. A folyamatnak 4 fő szakaszát különítjük el. A női ivar esetén a diploid őspetesejtek (oogóniumok) mitotikus osztódással sokszorozódnak, majd megkezdődik a számfelező (meiozis) osztódás. A germinális oogóniumok multipotens sejtjei körül nőnek az őspetesejteket és összefüggő egyrétegű réteget (granulosa) alkotnak. A folyamat során kialakul a bazális membrán, melyből a későbbiekben az ikrahéj fog keletkezni. A petesejt és az azt körülölvő sejtréteg együttes neve primer folliculus. A külső réteg neve theca externa és interna lesz, míg a belső réteget granulosanak hívjuk. Kromoszóma szinten megkezdődik a meiotikus osztódás, mely csak az ovuláció, illetve a spermium behatolása idején fejeződik be (KAGAWA 2013). A szaporodás az elsődleges tüszők (primer folliculusok) kialakulásával fejeződik be. Ezt követően kezdődik meg a sejtek tápanyagokkal való ellátását szolgáló folyamat. Az aktív szintézis során a sejtmagvak (nucleus) a petesejtek sejtmagvaihoz tapadnak és végbemegy a kis növekedésű (protoplazmatikus) szakasz. Ennek során a nucleolusok összekapcsolják a centromera sejtservecskéket (SZUVOROV 1948). A petesejtek nagymértékű növekedését trophoplazmatikus szakasznak nevezzük, mely során a táplálóanyagok halmozódnak fel (szikképződés azaz vitellogenezis). A kikelést követően a fejlődő embrió ezeket a

makromolekulákat szintetizálva szerzi a fejlődéséhez és a működéséhez szükséges kezdeti energiát. Az oocita citoplazmájába vakuolumok képződnek. Ezek végén megindul a szikgranulák berakódása és felhalmozódása, azaz a szikképződés. A folyamat során a sejt térfogata gyorsan növekszik. A folyamat végén a peteburok megvastagodik (oolemma), kialakul a radiális csatorna (zona radiata), azaz az ikrahéj. A folyamat végén a petesejt eléri a végső méretét, befejeződik a tápanyagok felhalmozódása. Ezt követi a kromoszómák kétlépéses redukciója és a petefészek redőiről történő leválás, a folliculáris tok feloldása, valamint az ovulációra való felkészülés meggy végbe. A növekedési fázis befejeződik és az ikra termékenyítésre alkalmas lesz. A szervezet ettől fogva kizárólag a külső környezet felől érkező ingerekre vár, melyek hatnak a hormontermelő szervekre (HORVÁTH 2018).

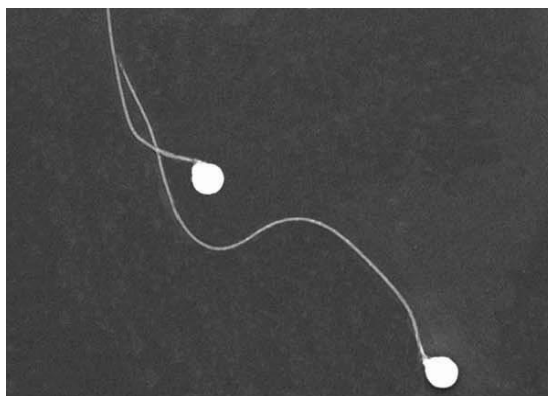
2.5.3. A here felépítése

A halak spermiumának képződési helye a here, mely egy két lebenyből álló hosszúkas, páros szerv. A hasüreg háti részén helyezkedik el. A pontyféléknél a lebenyek teljesen különállóak (HORVÁTH 2001). A here kivezető csatornája (vas deferens) a végbélnyílás és a húgycső között elhelyezkedő ivarnyílásig, az ivari papilláig tart. A csontoshalak heréjének két fő típusát ismerjük: a csöves, vagy tubuláris here, illetve a lebenyes, vagy lobuláris here (BILLARD et al. 1982). A tubuláris here az elevenesülők fogasponty fajokra (*Poeciliidae* család) jellemző, míg a gazdasági jelentőséggel bíró fajok -így a pontyfélék is- mind lobuláris herével rendelkeznek. A két fő típus eltér egymástól morfológiájában és a spermiogenezis folyamatában. A fejlődő ivarsejteken kívül két fontosabb sejtípus található a herében. Az interlobuláris térben a fibroblasztok között elszórt sejtszövetekben intersticiális myoid sejtek, valamint a szexuálszteroid kiválasztó sejtek találhatóak, melyek a fejlettebb gerincesek Leydig sejtjeivel azonosak (BILLARD 1972; HORVÁTH 2001; ROOSEN-RUNGE 1977). A halak spermatogenezise ezekbe a sejtekbe ágyazottan történik, a csirahámban. Itt helyezkednek el továbbá a spermiumképződésben szerepet játszó Sertoli sejtek is. Feladatuk a képződő sejtek tárolása, továbbá a tápanyagtranszport a fejlődés során, illetve a spermiogenezis végén visszamaradt spermiumok fagocitózisa (BERNÁTH 2016; SZABÓ et al. 2000).

2.5.4. Az hímvarsejtek kialakulása és fejlődése

A csontos halak hímvarsejtjei a spermiumok, melyek a hím egyedek ivarszerveiben a herében termelődnek. Feladatuk a hím örökítőanyag bejuttatása a

passzív női gamétába, aktív helyváltoztatással. A csontos halak jellegzetes spermium típusának tekinthetjük a pontyfélék hímivarsejtjeit. A feji része tartalmazza a sejtmagot, mely oldalra eltolódva kissé excentrikusan helyezkedik el a fark tengelyéhez képest. Fejének átmérője 1,5-2,5 μm között változik. A sejtmag és a fark közötti összeköttetést a két centriólum (proximális és distális) biztosítja. A pontyfélék spermiuma nem rendelkezik középdarabbal. A farki részt (flagellum) gyűrűszerűen körülvevő citoplazmatikus kitüremkedés jellemzi, mely 2-10 db mitokondriumot tartalmaz (7. ábra) (HORVÁTH 2018).



7. ábra. A ponty hímivarsejtjéről készült elektronmikroszkópos felvétel (Fotó: MASSAR et al. 2011).

A hímivarsejtek kialakulása, azaz a spermatogenezis a csírahám szöveti részében megy végbe. Ezeket a gyöngysorszerűen az ivari redőbe felfűződő elsődleges diploid (primordiális csírasejtek, ős-csírasejtek) ivarsejtek alkotják (PARMENTIER & TIMMERMANS 1985). A folyamat első lépése az A-típusú spermatogóniumok differenciálódása. Ezek a primordiális ivarsejtből létrejövő A-típusú sejtek (állandóan jelen vannak, nagyobbak és magányosan állnak). Újabb osztódás útján kialakulnak a B-típusú spermatogóniumok (kisebb méret, csoportokba vannak rendeződve), melyek osztódás és átalakulás révén spermatocytákat képeznek (nagy sejtmag és cisztaméret). Ezt követően kialakulnak a másodlagos spermatocyták, melyek tovább osztódva létrehozzák a haploid spermatidákat (gömbölyűek). Átalakulásukkal elkezdődik a spermioenezis folyamata, mely során a centriolumok a sejt perifériájára vándorolnak a későbbi flagellum kialakulása végett. A nyúlás hatására a sejtmag alakja és kromatin állaga megváltozik és a mitokondriumok elvándorolnak a flagellum proximális végéhez. Végezetül a Sertoli-sejtek fagocitálják a sejten kívülre löködtött spermatida citoplazmát (BERNÁTH 2016; GRIER & NEIDIG 2011; SZABÓ et al. 2000). Ponty esetében a spermiohistogenezis (differenciálódási folyamat, mely során a kerek, mozgásképtelen sejtekből aktív mozgásra képes spermiumok lesznek (LÁSZLÓ et al. 2013) egyszerű és rövid: a sejtmag és így a spermium feje gömbölyű marad, és a fark

a módosulatlan centrioláris komplexumon keresztül csatlakozik a fejhez. A lobuláris heretípussal rendelkező halak esetében ciklikusság a jellemző, mely alapján elkülönítjük őket pisztráng- és ponty típusúra. Az előbbi esetében kizárólag A-típusú spermatogóniumok találhatóak a herében, míg utóbbinál a két egymást követő ciklus nem különül el élesen egymástól. Itt az „A” és „B” típusú spermogóniumok, valamint spermiumok folyamatosan jelen vannak a herében. A spermiogenezis időszakos, de a ciklusok átfedik egymást. A folyamatosan 10 °C feletti hőmérsékleten élő halfajok bármely évszakban képesek termékenyítőképes spermát termelni. Azonban ennek feltétele a gonadotrop stimulus (HORVÁTH 2018).

2.5.5. A termékenyülés folyamata

A halakon belül megkülönböztetnek belső és külső megtermékenyítésű fajokat. Gazdaságilag fontos halainkra, így a pontyfélékre is a külső megtermékenyítésű szaporodás jellemző. Az ikrahéj szorosan rásimul a petesejtre, és ilyenkor a spermiumok behatolására szolgáló petenyílás (mikropüle) még nyitott állapotban van. Ponty esetében 40-60 másodpercig marad nyitva a csatorna az aktiváció után, majd a mikropüle bezáródik. Ezt követően az ikrahéj és a petesejt közé folyadék diffundál és duzzadni kezd, majd bezárul. Az így képződött helyet perivitellináris térnek nevezzük. Az ikra inkubációja során ez a tér növekedik az ozmotikus nyomása kiegyenlítődés miatt (KUDO 1980). A szik körüli folyadéktérben a csíra kiegyensúlyozott közegben fejlődik (HORVÁTH 2018). A termékenyülés folyamán az eredetileg haploid női és hím gaméták (n) egyesülésével létrejön a diploid zigóta (2n). A spermium petesejtbe jutását követően (impregnáció) megkezdődik az összeolvadás (BERNÁTH 2016). A kétféle sejtmagból létrejönnek az előmagvak (pronukleuszok), melyek ezután tovább osztódnak. Ezt követően kialakul a mitotikus orsó. A centriólumok az orsó két végébe tolódnak és megkezdődik a barázdálódás. A ponty részleges, azaz parciális osztódású, melynek oka a szikanyag egyenetlen (anizolecitális) eloszlása. A csíra pólusa osztódással kétsejtes formát vesz fel, melyet korongszerű (discoidális) osztódásnak neveznek. A szabályosan osztódó sejtek e lépés hatására szedericsíra (morula), majd hólyagcsíra (blasztula), ezt követően bélcsíra (gastula) és idegcsíra (neurula) állapotba kerülnek (HORVÁTH 2018). Az involúció (funkcionális visszaalakulás) során fokozatosan körülnövi a vegetatív pólus szikállományát. A csírapajzs egy bizonyos helyén létrejövő sejttömörülést agydudornak, amíg az ellentétes felén létrejövőt farkbimbónak nevezzük. Az embrió szája a körülnövés végére bezáródik és megjelennek a gerincoszlop szelvényei, azaz

a szomiták. Ezt követően kialakulnak a lárvakori belső szervek, a szemek pigmentálódnak, a keringés beindul, majd a folyamat végén az embrió kelésre éretté válik (BERNÁTH 2016; HORVÁTH 2018; KISS 2000). A valódi csontoshalaknál a termékenyítés folyamata monospermias (BERNÁTH 2016; HORVÁTH & URBÁNYI 2000).

2.6. A ponty keltetőházi szaporítása

Tavasszal a megfelelő ivási hőmérséklet elérésével a halak szaporodóképessé válnak. A vadívást elkerülve az állományt 10-12 °C –os vízhőmérsékleten szét kell válogatni ivar szerint, majd 18 °C felett a szaporítási eljárás elkezdhető (SZABÓ et al. 1998). Az anyahalak kezelése előtt altatás (bódítás) szükséges. Az ovuláció kiváltásához az ikrások esetében 3,5-4,5 mg/ttkg száraz hipofízissel számolnak. Pontyok esetében a teljes testtömegre kiszámított hormonmennyiség 10 %-át oltják be előadagként a hasüregbe, a hasúszó tövéhez. A második döntő adagot az első kezelést követően 12 órával injektálják a halak szervezetébe. Hatásukra az érett petesejtek leválnak és bekövetkezik az ovuláció. Az oltás előtt az ovulált ikra elszórásának megakadályozása érdekében az ivarnyílás bevarrása szükséges. Ezzel szemben a tejes egyedeket egy alkalommal kezelik 2 mg/ttkg hipofízissel. Egyes gazdaságok az agyalapi miriggyel megegyező hatású hormonkészítményt részesítik előnyben (Chorionic gonadotropin, Ovopel, Motilium) (URBÁNYI 2011). A termékek térnyerésének oka, a hipofízis gyűjtésének és kereskedelmének szabályozása, valamint a jól kiszámolható és pontosan adagolható hormonmennyiség. A hormonkezelés hatására az ikra és a tej (sperma) fejhetővé válik. Az ivarnyílás szárazra törölve a hasfal enyhe nyomásával a petefészekből a folyós ikrát száraz tálba fejjik (HORVÁTH_2000; PINTÉR 1992). A tejet kis üvegpoharakba vagy fecskendőbe gyűjtik. Fontos, hogy az hímivartermék kinyerésénél kerülni kell az előaktivációt okozó szennyeződések (vizelet, bélsár, víz, vér) (BERNÁTH 2016). A legoptimálisabb keverési arány a következő: 1 liter ikrához 10 ml hím ivarterméket juttatunk szárazon, melyet összekeverés után a 100 ml termékenyítő oldattal aktiválják (SZABÓ et al. 2000). Ezt követően az ikratételek duzzasztását és egyben ragadóságának elvételét Woynárovich-féle oldattal végezzük, melynek összetétele; 10 liter víz, 40 g konyhasó és 30 g karbamid (WOYNÁROVICH 1962). A tételeken rendszeres vizet kell cserélni. A folyamat hozzávetőlegesen 1-1,5 óráig tart, folyamatos keverés mellett. Ezt követően ikrát csersavas oldattal rövid ideig, többször (10 liter vízbe 5 g por állagú csersavat keverünk) kezelik és átmoszák

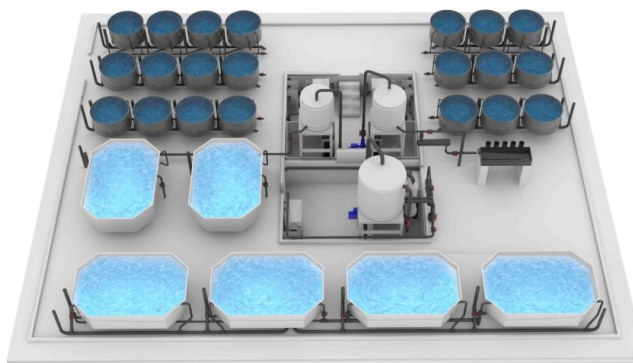
(WOYNÁROVICH & WOYNÁROVICH 1980). A lépésnek köszönhetően végleg megszüntethető a ragadósság. Ezt követően a tétéleket 7-9 literes Zuger-üvegekbe helyezik, amelyben egészen a kelés pillanatáig fejlődnek. Edényenként 1-1,5 liter duzzadt ikrát kell helyezni. Az üvegeken kezdetben enyhe vízátfolyást biztosítanak, melyet a fejlődés során növelnek. Az embriogenezis 21-22 °C-on 3 napig tart, melyet 60-70 napokban határoznak meg (az eltelt napok száma szorozva a napi átlagos vízhőmérséklettel) (HORVÁTH & URBÁNYI 2004). A keltetés során a nem termékenyült, illetve bomló ikraszemeket el kell távolítani és meg kell akadályozni a különféle vízi penészgombák felszaporodását. A kelést a lárva belső mozgása (mechanikai koptatás), valamint egy kelési enzim [koriolitikus enzim (YAMAGAMI 1972)] termelődése együttesen segíti elő. Az asszinkron fejlődés miatt az egyes ikratételeket mesterségesen szokták lekelteni. Egy nagyméretű edényben oxigénhiányos állapotot hoznak létre, mely hatására a folyamat felgyorsul. Az úszásra képtelen lárvákat lárvatartó edényekbe helyezik, ahol megkezdik függeszkedő életmódjukat. Az úszóhólyag feltöltődése 3-4 nap elteltével történik meg, amikor képessé válnak a vízszintes úszásra. Emellett megkezdik aktív táplálkozásukat, mely a keltetőházi folyamat végét jelenti (HORVÁTH 2018).

2.7. Intenzív rendszerben történő ikrakeltetés és lárwanevelés

Az intenzív nevelést az akvakultúrában az 1960 évek óta folyamatos fejlődés jellemzi (SHEPHERD & BROMAGE 1992). Térnyerésének két oka van: az egyik a piaci igények (ellenőrzött körülmények között előállított, azonos minőségű piaci alapanyag), a másik pedig a technológia fejlődése (új, komplex takarmányok megjelenése, betegségek kezelésének új eszközei, haltartó rendszer alapanyagainak fejlődése) volt. Azonban mind a mai napig az egyes stresszfactorok okozzák a legnagyobb problémát az intenzív haltenyésztésben (SHEPHERD & BROMAGE 1992; URBÁNYI 2015). A világ precíziós haltenyésztése három, egymástól jól elkülönülő halnevelési rendszerre tagolható, melyeket mind a mai napig a folyamatos fejlődés jellemez. Ilyen a ketreces, az átfolyóvízes és a recirkulációs (RAS) halnevelés (8. ábra). Mind a három típusra jellemző a kis helyigény, a komplex és teljesértékű takarmányok alkalmazása, a nagy tartási sűrűség és a termelési lépések teljeskörű megtervezése és kontrollálása. A rendszerek kategorizálása általánosan termelési intenzitásuk (félintenzív, intenzív és szuperintenzív) alapján történik (URBÁNYI 2015). A kontrollált körülmények között történő ikrainkubálás és lárwanevelés jelenti a haltenyésztés alapját (TÖLG & TASNÁDI 1996). Magyarországon a keltetőházak

többsége hagyományosan átfolyóvízes rendszerű. A recirkulációs rendszerekben történő keltetés és korai ivadéknevelés térnyerése még a mai napig várat magára. Ennek fő oka az egyedfejlődés során leadott nagy mennyiségű anyagcseretermék, a szerves és szervetlen vegyületek és azok esetleges felhalmozódása. Az ikrá a fejlődés során oxigént használ el a környezetéből és széndioxidot (CO_2) illetve különböző nitrogénformákat ad le, mint az ammónia/ammónium ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), illetve a baktériumok ureáz enzim aktivitásának köszönhetően áttételesen ammóniává alakuló karbamid [$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$]. Ezek a vegyületek az átfolyóvízes rendszerekből felhalmozódás nélkül ki tudnak mosódni, azonban a vízvisszaforgatásos rendszerekben az ikrára nézve toxikussá válhatnak (MARTINS et al. 2009; RANDELL & TSUI 2002). Az ikrá anyagcseréje összefügg a fehérje-szintézissel, a szik bontásával, illetve az energiatermeléssel. A legnagyobb gondot a recirkulációs rendszerekben történő keltetés során a nitrogén kibocsátás és annak dinamikájának meghatározása jelenti, ugyanis még a 100%-ban termékenyült ikrá nitrogén kiválasztása is nehezen jósolható (életszakaszonként és fajonként eltérhet), melyet már a rendszer tervezésénél figyelembe kell venni (ZIMMER et al. 2017). A már korábban bemutatott, hagyományos keltetőházi pontysaporításról szóló fejezetben foglaltak szerint az átfolyó vízes keltetőházakban a kikelt és függeszkedő lárvák gondozása csupán a vízátfolyás szabályozásából és a szűrőfelület óvatos tisztításából áll. Az emésztőcsatornájuk alkalmassá válását követően (vízszintes úszás) külső eredetű táplálék befogadására és emésztésére is képesek az ivadékok. Ez az időpont jelenti a keltetőházi folyamat végét (HORVÁTH 2018). A fent leírtak ellenére ma már létezik alternatíva, melyet előkísérletek is bizonyítanak, miszerint egy zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő ikrakeltetés és lárvanevelés reális, hatékony és üzembiztosan kivitelezhető. Lényege, hogy egy fizikai szűrést követően, jól felépített és kellő hatékonyságú, nagyméretű biológiai szűrő segítségével, valamint napi 10 %-os pótvíz mennyiséggel üzembiztosan megvalósítható (CSORBAI et al. 2020; MOTTA et al. 2019). A táplálkozásra alkalmassá vált zsenge ivadék igényli a külső táplálékot. Ez keltetőházi körülmények között többnyire főtt tojásból készült finom turmixot vagy *Artemia salina* (sórák) lárváját jelentheti (HORVÁTH et al. 1982; JELKIĆ et al. 2012; MOTTA et al. 2019; USANDI et al. 2019; ŻARSKI et al. 2011). Kezdetben étvágy szerinti (*ad libitum*) takarmányt kell biztosítani a fejlődő lárvák számára (SZLAMINIŃSKA 1986). A nevelés előrehaladtával a takarmány mérete és összetétele, a napi takarmányadag, az etetések száma és módszere, a növekedés és takarmányértékesítő képesség függvényében folyamatosan változik. A fentieket

tovább módosítja a víz hőmérsékletet, mivel hatással van az anyagcsere intenzitására, valamint a tápanyag értékesülésre. A takarmányadag mennyiségének meghatározásánál továbbá figyelembe kell még venni a mozgást (energiaigényes tevékenység), a telepítési sűrűség pozitív (kevesebb mozgás), illetve negatív (szociális stressz) hatását, és a takarmány energiakonzentrációját (GONÇALVES JR. et al. 2014; HORVÁTH et al. 1982; JELKIC et al. 2012; JOAQUIM et al. 2016; MÉZES 2018; MÉZES & BÓDIS 2015). A zárt, intenzív haltartás során a halak takarmányozását teljes értékű száraz haltáppal biztosítják. A téma szakirodalmi feldolgozása azonban hiányos. Számos tanulmány taglalja a faj mesterséges tápon történő tartásának lehetőségeit, azonban a teljes tenyészciklusára vonatkozó összefoglaló takarmányozásikísérlés napjainkig nem született (CSORBAI szóbeli közlése alapján 2020).



© AquaBioTech Group

8. ábra. Kísérlési RAS intenzív haltenyésztési rendszer (Fotó: AQUABIOTECH GROUP 2020).

2.8. A hímivar-sejtmélyhűtés bemutatása

A spermamélyhűtés során a hím egyedek genetikai örökítő anyagát őrzik meg (ASHWOOD-SMITH 1980; BERNÁTH et al. 2017; CABRITA et al. 2010; CLOUD & PATTON 2009; STOSS 1983; WHITTINGHAM 1980). Az eljárás kiválóan alkalmazható a gazdaságilag, illetve a természetvédelmi jelentőséggel bíró halfajok esetén egyaránt. A módszerrel az örökítőanyag tértől és időtől függetlenül korlátlanul megőrizhető és felhasználható (BODÓ et al. 2004; CLOUD & PATTON 2009). Az ivarsejtmélyhűtés POLGE et al. (1949) kísérletének köszönhetően tudott új fejezetet nyitni a kriobiológiában, megalapozva az élő sejtek reverzibilis fagyasztását. Napjainkra egyes fajokban már egy jól bevált, kiválóan alkalmazható módszer és az állattenyésztés szerves részét képezi (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2017). A halak hímivartermékének első sikeres mélyhűtését BLAXTER írta le 1953-ban.

Mérföldkőnek számító kísérletében életképes hering spermiumokat olvasztott fel szárazjég (-78,5 °C) hőmérsékletéről.

2.8.1. A spermamélyhűtés alapjai

Az élő anyagok hűlésének és fagyásának tulajdonságai megegyeznek a vizes oldatoknál általánosan tapasztaltakkal. A folyamat során a víz megfagy, és jégkristályok keletkeznek. Az egyre jobban besűrűsödő oldat fagyáspontja csökken, majd átlépve az úgynevezett eutektikus pontot, jegesedik. A fagyást azonban számos tényező befolyásolhatja, ebből kifolyólag meghatározásában az irodalomban nincs egyetértés (BAUMLI 2015). A tiszta víz fagyáspontja sem 0 °C-on megy pontosan végbe, hanem elsőként az oldat túlhűl és a kristályosodási magok körül kezd megindulni a jégképződés (DENNISTON et al. 2000; HORVÁTH 2001). Az élő sejtek mélyhűtése során számos más tényezőt is figyelembe kell venni. Az eljárást a sejtekben lévő ozmotikus egyensúlyt fenntartó sejtmembrán befolyásolja. Feladatát tekintve félig átteresztő hártvaként működik, a víz és a kisebb, valamint nagyobb molekulák áramoltatása révén. Az ozmózis elve alapján mindig a hígabb oldatból a töményebb felé történik az áramlás. A folyamatot ozmolalításban számszerűsítik, melynek mértékegysége mosmol/kg (DENNISTON et al. 2000). Ez az érték a ponty esetében 260-300 mosmol/kg (BILLARD et al. 1993; MORISAWA et al. 1983; PERCHEC et al. 1995; REDONDO-MÜLLER et al. 1991; SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ et al. 2016). A mélyhűtés egyik legfontosabb tényezője a folyamat időtartama (HORVÁTH 2001; LEIBO 1980; MAZUR 1963). Ebből kifolyólag a mélyhűtési eljárást 4 fő szakaszra tagoljuk. Az első a kristályképződést megelőző hűtési folyamat. A második maga a kristályok képződésének szakasza, mely a sejteket körülvevő vizes közeg fagyását jelenti. A harmadik elkülönített fő szakasz a -10 °C-tól -40 °C-ig tartó hűlés. Ez a mélyhűtés a legkritikusabb periódusa, hiszen a membrán két oldala között ozmotikus különbség alakul ki és ez vízkiáramlást eredményez a sejtben. A folyamat mindaddig zajlik, amíg a nyomás ki nem egyenlítődig a két oldal között. A túl gyors hőmérséklet-csökkenés sejtben belüli jégkristály képződést eredményez, míg a túl lassú fagyasztás azonban membránon belüli anyagkoncentráció felhalmozódását váltja ki, mely dehidratációt eredményez (GILMORE et al. 2000). A kedvezőtlen folyamatok hatására a sejtek szerkezet- és funkcióbeli károsodást is szenvedhetnek (GARDEA et al. 2004; SCHÜFFNER et al. 2008). A végső periódusban a sejtek hőmérséklete eléri a mélyhűtésre használt közegét, mely a későbbi tárolás hőmérsékletét is jelentheti egyben (CLOUD & PATTON 2009).

2.8.2. A sperma kinyerése és rövidtávú tárolása

A spermamintát a halak fejésével, egyes fajok esetében a here hasüregből való kioperálásával, majd lepréselésével lehet kinyerni. A csontos halak többségénél, mint a pontynál is a spermát ki lehet fejni a hasfal enyhe nyomásával (PINTÉR 1992). A sperma kinyerését követően fontos elkerülnünk a minták szennyeződését. Az ivartermék vízzel, vizelettel, bélsárral vagy vérrel való érintkezése aktiválhatja a spermiumokat, rontva azok termékenyítőképességét (AGARWAL 2011; BERNÁTH 2016; BOZKURT et al. 2011; CLOUD & PATTON 2009; HORVÁTH 2001). A különféle szennyeződések beindíthatnak enzimatis folyamatokat, melyek bontó hatásuk révén szintén tovább ronthatják a minta minőségét (BEIRÃO et al. 2019; KOWALSKI & CEJKO 2019). A spermát felhasználásig oxigéndús környezetben, 0-4 °C-on kell tárolni (CLOUD & PATTON 2009; LAHNSTEINER et al. 2002; MARQUES & GODINHO 2004; SAROSIEK et al. 2012; YAO et al. 1999).

2.8.3. A spermaminősítés

A ponty esetén az ivarsejtek érése is évenkénti periodikusságot mutat (ALIX et al. 2020; DUNCAN et al. 2008; TAKEMURA et al. 2004; WANG et al. 2010). A halak ivartermékének minősítése során számos tulajdonságot vizsgálhatunk (sperma mozgására és sebességre utaló paraméterek, sejtsűrűség, morfológia, a spermium energiakészlete, a sejtmagi DNS fragmentáltsága stb.) (FAUVEL et al. 2010). Mind a mai napig nem tisztázott, hogy pontosan mely tulajdonságok határozzák meg a sperma termékenyítőképességét, továbbá az sem, hogy ezek a tulajdonságok külön-külön vagy együttesen fejtik ki hatásukat (ALAVI et al. 2008; BOBE & LABBÉ 2010; BROWNE et al. 2015; CABRITA et al. 2009; DZYUBA & COSSON 2014; FAUVEL et al. 1999; FAUVEL et al. 2010; LAHNSTEINER et al. 1996; SCHULZ et al. 2010; SMITH & WOOTTON 2016; YOSHIDA et al. 2008). Azonban számos irodalomban leírták, hogy az ikra termékenyülése összefügg a sperma minőségével (BERNÁTH 2016; BOZKURT et al. 2009; FAUVEL et al. 2010; SZABÓ et al. 2000). Pontynál bizonyították továbbá, hogy a sperma sebessége befolyásolja az eredményes termékenyítést (KASPAR et al. 2008). A sperma minőség ellenőrzése során kulcsfontosságú a precíz és gyors munkavégzés a minták leromlásának elkerülése végett (HORVÁTH 2001).

2.8.4. A sperma motilitás vizsgálata

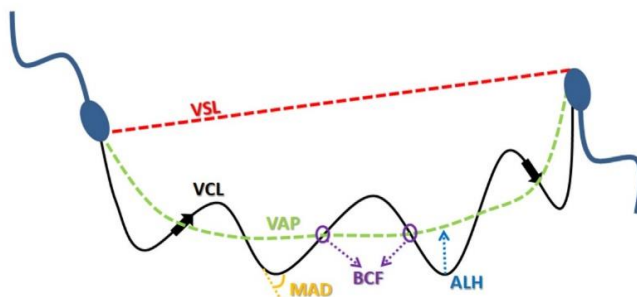
A csontoshalak többségénél a szaporodás külső megtermékenyítéssel történik. Testüregben belül a hímivarsejtek immobilis állapotban vannak, mivel szeminális plazma veszi körül őket (SADEGHI et al. 2017). A sejtek aktivációjához vizes közegre vagy fajspecifikus aktiváló oldatra van szükség. Az aktiváló oldat hatására a spermiumok körül ozmotikus nyomáskülönbség alakul ki (ALAVI & COSSON 2006; KRASZNAI et al. 2003; MORISAWA 2008; MORISAWA & SUZUKI 1980; WILSON-LEEDY et al. 2009). A tengeri fajoknál az ozmolalitás növekedése, míg az édesvízi fajoknál az ozmolalitás csökkenése váltja ki a sejtek mozgását (COSSON et al. 1989). Az aktivációt követően a spermiumok mozgása azonnal megkezdődik (COSSON 2004, 2008). Egyes fajok esetében a motilitás időtartama az aktivációt követően néhány perc is lehet (tokfélénél: 5-9,5 perc), azonban gyakran kevesebb, mint 60 másodperc (keszegfélénél: 20 másodperc) (ALAVI & COSSON 2005). A spermiumok mozgásának intenzitása kezdetben nagyon magas majd ez az idő múlásával csökken (BORYSHPOLETS et al. 2013; COSSON 2008). A ponty esetében átlagosan 90 másodperc a mozgás időtartama (BROWNE et al. 2015).

A sperma, illetve a spermiumok mozgásának meghatározására több módszer is a rendelkezésre áll. A fénymikroszkópos (szabadszemmel történő) becslés gyors és azonnali eredményt ad, azonban pontatlan és szubjektív. Sokkal precízebb és objektívebb eredményt lehet kapni a mikroszkóphoz rögzített kamera segítségével, mely során felvételt készítünk, ami utólag kielemezhető. Azonban, a módszer időigényes és nem biztosít valós idejű eredményt. Jól alkalmazható továbbá egy költséges, de megbízható, pontos és „real-time” (valós idejű) képet adó módszer: amikor is a sperma motilitás mérése egy számítógépes spermavizsgáló berendezés (CASA) használatával történik (AMAN & WABERSKI 2014; BERNÁTH 2016; FAUVEL et al. 2010; KALBASSI et al. 2013; KÁSA 2017; KIME et al. 1996; KIME et al. 2001). A rendszer, egy mikroszkóp és kamera segítségével videófelvételt készít a mozgó spermiumokról, majd megvizsgálja az egyes spermiumok fejének elmozdulását és annak útvonalát, majd ezeket automatikusan egymásba fűzi (9. ábra). A gép egyszerre több mozgási paramétert képes rögzíteni (4. táblázat), melyeket azonnal kielemez egy számítógépes program segítségével (10. ábra). A rendszert a humán orvostudományban fejlesztették ki még az 1980-as években, majd később kezdték el alkalmazni gazdasági haszonállatainkra (szarvasmarha, ló, nyúl, baromfi), valamint idővel az akvakultúrában. Az elmúlt évtizedekben folyamatos fejlesztések

törtétek kifejezetten a halsperma vizsgálatára vonatkozóan (AMANN & WABERSKI 2014; KIME et al. 2001; WILSON-LEEDY & INGERMANN 2007). Előnye a nagy mennyiségű sejt elemzése, valamint, hogy a felvételeknél nincs szükség utómunkára. Hátránya azonban, hogy sok esetben szükséges faj- vagy taxonspecifikus programbeállítás. További fontos tényező, hogy a megfelelő és precíz alkalmazáshoz a szakképzett személyzet elengedhetetlen (gyors és akkurátus előkészítés, megfelelő hígítás kiválasztása stb.) (CAFFEY & TIERSCH 2000; KIME et al. 2001). A halsperma minősítése során egyedi aktiváló oldattal vagy vízzel keverik össze a spermamintát egy speciális tárgylemezen (pl. Leja tárgylemez v. kamra, Leja, Luzernestraat, Hollandia), vagy sejtvizsgáló kamrában (pl. Spermtrack, Proiser R+D, S. L., Paterna, Spanyolország; Makler, Sefi Medical Instruments, Izrael, MAKLER 1978). Következő lépésként a mintát mikroszkóp objektív alá helyezik. A gép kezelője által megszabott időpontban készíti és menti el a felvételt, mely utólagosan kielemezhető.

4. táblázat. A CASA rendszer által vizsgált és rögzített paraméterek (RURANGWA et al. 2004).

Paraméter jelölése	Paraméterek magyar meghatározása	Mértékegysége
ALH	A fej oldalirányú kitérésének átlagos nagysága	μm
BCF	A fej kilengésének frekvenciája	Hz
DAP	A ténylegesen megtett útvonalának átlagolt hosszúsága	μm
DCL	A ténylegesen megtett út hosszúsága	μm
DSL	A megtett egyenes útvonal	μm
LIN	Az útvonal egyenestől számított eltérése	%
MAD	Átlagos mozgásfok	%
MOT	Motilitás	%
pMOT	Progresszív motilitás	%
STR	Az átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése	%
VAP	A sebesség a mozgásának átlagolt útvonalára számolva	μm/s
VCL	A sebesség a megtett, teljes mozgási útvonalra számolva	μm/s
VSL	A sebesség a kiindulás és végpont közötti távolságra számolva	μm/s
WOB	A teljes mozgási útvonalának az átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése	%



9. ábra. A CASA által mért egyes mozgási paraméterek ábrázolása (Fotó: KOWALSKI & CEJKO 2019).



10. ábra. Balatoni sudár ponty motilitási paramétereinek vizsgálata során készített CASA felvétel. A fehér pont a a mozgó-, a kék pont az egyhelyben mozgó, míg a piros pont a nem mozgó spermimot jelöli. Az eltérő színű vonalak a spermium által megtett utat jelölik. (Fotó: Saját felvétel).

2.8.5. A hűtőmedium és az egyensúlyi idő

A hűtőmedium az a közeg, mely körülveszi és megvédi a spermiumokat a mélyhűtés és felolvasztás során. Hatásukra a minta kihígított állapotba kerül ez által megnövelve a mennyiségét, melynek köszönhetően egy teljes ivarterméke a termékenyítés során akár többször is használható (AGARWAL 2011). Alapvetően két fő összetevő alkotja, az egyik a hígító, a másik pedig a védőanyag. Az elmúlt évtizedekben számos fajspecifikus hígító és védőanyag került kidolgozásra, összetételükre és alkalmazott arányukra vonatkozóan egyaránt (BABIÁK et al. 1998; CABRITA et al. 2010; FIGUEROA et al. 2015; GWO 2011; MAGNOTTI et al. 2016; MARIA & CARNEIRO 2012; SCOTT ÉS BAYNES 1980; SUQUET et al. 2000; TIERSCH et al. 2007; YAVAŞ 2013). A hígító cukrokat és/vagy sókat tartalmaz. Legfontosabb tulajdonsága a spermiumok aktivációjának reverzibilis gátlása. A benne oldott anyagok extracelluláris (sejten kívüli) védőanyagként fejtik ki hatásukat (CABRITA et al. 2001a; AHN et al 2018). Két fontos biológiai folyamat biztosításában van: a megfelelő, izoozmotikus nyomás viszonyuknak köszönhetően meggátolják a sejtek aktiválódását, míg a megfelelő pufferkapacitásnak köszönhetően a hűtés és felolvasztás során biztosítják az oldat pH-értékét (CLOUD & PATTON 2009; HORVÁTH 2001; LEUNG 1991; MUCHLISIN 2010). A mélyhűtés és az olvasztás hatására megváltozik az oldat pH-értéke, mely akár a sejtek funkciójának elvesztéséhez, illetve denaturációhoz is vezethet (MISKOLCZI 2007). A védőanyagokat az oldatban, mint intracelluláris anyagokként használjuk a sejtek megőrzése érdekében (BAYNES & SCOTT 1987; STOSS 1983; STOSS & HOLTZ 1981). Hatásuknak köszönhetően a spermiumok képesek jobban megőrizni a termékenyítőképességüket (BERNÁTH 2016; CLOUD & PATTON 2009). Ezek

általánosságban nagy vízzoldhatóságú alacsony molekulatömegű anyagok, melyek bejutnak a sejt belsejébe és megakadályozzák a jégkristályok képződését. Hatással vannak a sejtek vízleadására, felhasználásuk elengedhetetlen, mivel csökkentik az oldatok fagyáspontját (CHRISTENSEN & TIERSCH 1996; DENNISTON et al. 2000; HORVÁTH 2001; JAMIESON 1991). Alkalmazásuk optimális esetben 5-15 % hozzáadott mennyiség között változhat fajspecifikusan. Amennyiben az optimális mennyiség fölött van jelen a sejtekben, károsító, toxikus hatást fejt ki a mélyhűtést megelőzően, valamint végzetes térfogatváltozást okozhatnak a sejtekben (FAHY 1986; GILMORE et al. 1997; HARVEY et al. 1983). További fontos alkotórésze a védőanyagoknak a különféle membránstabilizálók. Szerepük a sejtek hártájának védelmében van (CLOUD & PATTON 2009). Halak esetében általánosságban különféle fehérje tartalmú anyagokkal (tojássárgája, BSA-szarvasmarha szérum albumin, szemínális plazma felhasználásával stb.) érik el (BAYNES & SCOTT 1987; STOSS & HOLTZ 1981). A sperma hűtőmediummal való hígítását 1:1-1:9 arány között szokták alkalmazni, mely fajspecifikus (CABRITA et al. 2010).

Az egyensúly az az idő, mely alatt a védőanyag-koncentráció kiegyenlítődik az extra- és intracelluláris tér között. Az egyensúly optimális ideje függ az adott védőanyag molekulaméretétől, így a sejten belüli térbe jutási képességétől, valamint az adott faj spermájának egyediségétől, illetve a tárolási hőmérséklettől (AKCAY 2004; HARVEY 1983; HUANG et al. 2004; LAHNSTEINER et al. 1996; LI et al. 2010; STEIN & BAYRLE 1978; ZHANG & LIU 1991).

2.8.6. A sperma mélyhűtésének módszerei

Az elmúlt években számtalan fagyasztási módszert dolgoztak ki melyekről alapvetően elmondható, hogy a minta adagolása, illetve mennyisége meghatározza a hűtés módszerét. A mélyhűtés történhet cseppek formájában közvetlenül a hűtőközegbe vagy műszalmákba, kriocsővekbe, illetve ampullákba töltve. A hűtőegységek töltőkapacitásának mérete rendkívül változó lehet (0,25-5 ml műszalma, 2-10 ml kriocső) (BOKOR et al. 2019; CABRITA et al. 2001b; CABRITA et al. 2005; CIERESZKO et al. 2014; HORVÁTH et al. 2003; HORVÁTH et al. 2007; LIU et al. 2015; MISKOLCZI et al. 2005; MOLNÁR et al. 2020; VELASCO-SANTAMARÍA et al. 2006; VIVEIROS et al. 2000). A sikeres mélyhűtés módszertanára több eljárást is kidolgoztak az évek alatt.

A legegyszerűbb és legrégebb óta alkalmazott eljárás a szárazjégen (-78,5 °C) történő mélyhűtés. A jég felszínébe apró mélyedéseket marnak, majd ebbe cseppentik

bele a hűteni kívánt mintát. A módszer olcsó és egyszerűen alkalmazható, nem igényel sajátos eszközöket, azonban számos hátránya van. A pelletek nem egyforma méretűek ez által a hűlési sebesség nem ellenőrizhető. Szállításuk egyszerű, felolvasztásuk ellenben körülményes (CHE-ZULKIFLI et al. 2019; DICKERMAN & VILLA RAMIREZ 1964; FROESE 1998; MARTÍNEZ-PÁRAM & ADAMS 2009; YASUI et al. 2008). A második mélyhűtési eljárás esetében a műszalmába, hűthető ampullába, vagy kriocsőbe töltött ivartermék áramló 95 %-os és $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os alkoholban (metanol, etanol, izopropanol) hűl le egy hőszigetelt tároló edényben. A fagyasztás során felléphet hirtelen buborékképződés, mely a minták sérülésével és ez által a minőség romlásával járhat (TATENO et al. 1998; TIERSCH 2000, 2001). A következőkben bemutatásra kerülő eljárások hasonlósága, hogy a folyamatban cseppfolyós nitrogénre van szükség. A harmadik módszer során egy hőszigetelt tárolódobozba forrásban lévő nitrogén gőzében, vagy közvetlen belehelyezve hűlnek le a minták (műszalmába, hűthető ampulla, kriocsőben), mely $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os. A módszer előnye, hogy csekély a bekerülési költség, azonban a hűtési sebesség nehezen szabályozható és az intenzitás környezeti paramétereiktől függ (KOPEIKA et al. 2007; LAHNSTEINER et al. 1995; LAHNSTEINER et al. 2000; MAGYARY 1996). A negyedik mélyhűtési eljárás a programozható fagyasztó berendezés (CRF) használata. Hasonlóan az előzőben bemutatott módszerekhez a spermát műszalmákba vagy kriocsővekbe töltik mélyhűtés előtt. A mintákat a gép belső kamrájába helyezik, majd a berendezés egy előre megírt program alapján hűti le azokat a cseppfolyós nitrogén gőzét felhasználva (MARTÍNEZ-PASTOR & ADAMS 2009). Előnye a zárt, külső környezeti hatásoktól mentes kamra és a fajspecifikus hűtési programok használata (BUTLER & PEGG 2012). Hátránya, hogy a bekerülési költségek magasak és méretéből adódóan alkalmazása helyhez kötött lehet. További probléma lehet még az eszközök nagy áramfelvétele (BABIÁK et al. 1999; CONGET et al. 1996; YANG et al. 2007). Léteznek kizárólag elektromos erőforrást használó mélyhűtő berendezések. Lényegük, hogy cseppfolyós nitrogén felhasználása nélkül képesek a mintákat $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre lehűteni és azon tárolni. Hátrányuk a magas bekerülési és üzemeltetési költségek. Az eszközök a felhasználhatóságuk ellenére mind a mai napig nem terjedtek el a gyakorlatban (MARTÍNEZ-PASTOR & ADAMS 2009). Az ultragyors mélyhűtési módszer esetében (azaz a vitrifikáció folyamán), sok esetben csupán néhány mikroliter (μl) térfogatú sperma fagyasztása történik (SCHUSTER et al. 2003). A halaknál az elmúlt évek során számos kutató foglalkozott az eljárás fejlesztésével (ABED-ELMDOUST et al. 2015; ANDREEV et al. 2009; CUEVAS-URIBE &

TIERSCH 2011; CUEVAS-URIBE et al. 2013; FIGUEROA et al. 2015; MERINO et al. 2012, 2011; VARELA JR. et al. 2015). A módszer egy egyensúly nélküli (nonequilibrium) hűtés, melynek révén rendkívüli gyors fagyási folyamat megy végbe [10^6 - 10^{10} °C/másodperc (FRANKS 1982)], ami által a jégkristályok kialakulása gátolt. A mintát közvetlen a forrásban lévő cseppfolyós nitrogénbe merítik. A hűtés hatására a vízmolekulák nem rendeződnek kristályrácsba és egy üvegszerű, szilárd anyag jön létre (KÁSA 2017; KULESHOVA et al. 2007). Hátránya a módszernek a csekély mennyiségű mélyhűtési kapacitás, valamint a védőanyag nagyon magas koncentrációja, amely a sejtekre nézve toxikus lehet (FAHY et al. 1984).

2.8.7. A sperma tárolása

A mélyhűtött minták tárolása folyékony nitrogént tartalmazó (-196 °C) kaniszteres kannákban történik leggyakrabban. Az eszközök kifejezetten kriogén környezetben tárolt minták biztonságos szállítására és tárolására vannak tervezve. A tartály két fém fal között egyedi adszorbens anyaggal van kitöltve, mely addig képes kriogén hőmérsékleten (-190 °C) tartani a kamrában tárolt mintát, amíg a folyékony nitrogén el nem párolog. Számos kutatás számol be a modern ultramélyhűtő berendezések használatáról (-150 °C), mely kiváló alternatívát jelent a minták hosszútávú tárolására (DIOGO et al. 2018; DIOGO et al. 2019; HORVÁTH & URBÁNYI 2020). Az eszköznek köszönhetően cseppfolyós nitrogén adagolása és folyamatos pótlása nélkül tárolhatók a minták. A -130 °C-os hőmérsékletnél alacsonyabb tárolás során a molekuláknak kizárólag rezgő vagy rotációs mozgásra képesek, ez által a károsodás lehetősége elenyésző. Feltételezések szerint ilyen formában a minták korlátlan ideig tárolhatóak, mivel kizárólag a kozmikus sugárzás lehet hatással rájuk (HORVÁTH 2001; BERNÁTH 2016).

2.8.8. A sperma felolvasztása

A folyamat a minták -196 °C-ról történő felolvasztását jelenti. A lépés legfontosabb tényezője a megfelelő cseppfolyósítási sebesség, mely fajspecifikus és mennyiség függő (TIERSCH 2011). A műveletnek gyorsnak kell lennie, mivel a nem megfelelő sebességű olvadás hatására a sejten belüli kristályok mérete megnövekszik, ami intracelluláris károsodást idézhet elő (PIIRONEN 1993). A túl lassú felolvasztás dehidratációt okoz, mely sejtpusztulást eredményez (BEIRÃO et al. 2011). Az évek alatt számos módszert dolgoztak ki a különféle méretű műszalmák felolvasztására, melyek eredményesen alkalmazhatók [0,25 ml-es műszalma 40 °C-on 5 mp,

(AGARWAL 2011; BOZKURT 2017; SZABÓ et al. 2005); 0,5 ml-es műszalma 40°C-on 13 mp, (BOZKURT 2017; HORVÁTH et al. 2012); 5 ml-es műszalma 40 °C-on 35 mp, (BOKOR et al. 2010; CABRITA 2001b); 10 ml-es kriocső 40 °C-on, 3 per 30 másodperc (MOLNÁR et al. 2020)].

2.9. A ponty hímivarsejt mélyhűtése

Az első ponty sperma mélyhűtéssel kapcsolatos eredményeket MOCZARSKI 1977-ben írta le. Számos szakirodalmi forrás is bizonyítja a mélyhűtés folyamatos fejlődését, azonban a gyakorlat a mai napig nem vette át a kidolgozott módszereket (URBÁNYI 2011). Fejlesztették a mélyhűtés eredményességét közvetlenül befolyásoló tényezőket. Vizsgálták a hűtőmediumok összetételét, a védőanyag típusait és azok arányát, hűtési sebességet és módszereket, valamint a fagyasztásra szolgáló eszközöket (HORVÁTH et al. 1992; URBÁNYI 2011). BILLARD et al. 1995-ben részletesen írt a sperma általános tulajdonságairól (szeminális plazma összetétele, átlagos sejtsűrűség), valamint a motilitásról (időtartam, energiafelhasználás a mozgás során) és a mesterséges termékenyítés jellemzőiről. Az elmúlt években, több sikeres eljárást dolgoztak ki, melyek laboratóriumi körülmények között eredményesnek bizonyultak. Számos tanulmány írt átfogóan a kis mennyiségű sperma fagyasztását követően termékenyülésről (HORVÁTH et al. 2003: 74%; IRAWAN et al. 2010: 74%; LAHNSTEINER et al. 2003: 55-60%). HORVÁTH et al. (2007) eredményesen használtak a szaporítások során az 1,2, valamint 5 ml űrtartalmú műszalmákat ponty fajban. LAHNSTEINER et al. 2003-ban 60±2%-os termékenyülést értek el az 1,2 ml-es műszalma használatával. BERNÁTH et al. (2016) sikeresen fagyasztottak nagy mennyiségű (~5 ml) ponty spermát számos (104 db), 0,5 ml-es műszalmában, egy programozható berendezés segítségével. A felolvasztást követően termékenyítés szempontjából ideális motilitási értéket (47±5%) rögzítettek, valamint 32±6% termékenyülést írt le. A tesztekben felolvasztást követően agglutináció („zselésedés”) volt megfigyelhető. A jelenség hatására ugyan csökkenhet a sejtszám, melyről számos publikáció is beszámol (BERNÁTH et al. 2016a; DONG et al. 2007; IRAWAN et al. 2010; YANG et al. 2017). Egyes kutatások szerint azonban az agglutináció nincsen hatással a minták termékenyítő képességére (HORVÁTH et al. 2003). Meg kell említeni azonban, hogy számol be publikáció arról, hogy a jelenség negatív hatással van a felolvasztott minták termékenyítő képességére (BERNÁTH 2016). A jelenség feltételezett oka a hígító nem megfelelő só/cukor aránya, valamint pH-ja (JAMIESON 2009; LINHART et al. 2000). Pontysperma esetében azonban kulcsfontosságú a

hűtőmédiumban a cukor felhasználása (HORVÁTH et al 2003; BERNÁTH et al. 2016a; MARINOVIĆ et al. 2017). Az agglutináció hatására az effektív sperma-ikra arány a fagyasztott ponty hím ivartermék felhasználása során nem meghatározható. A számos kidolgozott mélyhűtési módszer ellenére a keltetőházi technológiába illesztése napjainkig nem, vagy csak részlegesen valósult meg (URBÁNYI 2011).

2.10. Spermabankok jelentősége

A halak esetében a petesejt, azaz az ikra és az embrió mélyhűtése egyelőre nem megoldott, mivel szervezetükben nagy mennyiségben van felhalmozódva a szikanyag (CHAO & LIAO 2001; GWO et al. 2009; ISAYEVA et al. 2004; STREIT JR. et al. 2014). Az *ex situ in vitro* génmegőrzés a tejesek esetében az ivarsejtek mélyhűtése révén azonban kivitelezhető (FAO 2012; WOELDERS et al. 2012). A világ különböző pontjain ennek érdekében számos spermabankot hoztak létre. Többek között ilyen létesítmények találhatóak a következő országokban: Ukrajna, Oroszország, Egyesült Királyság, Németország, Csehország, Franciaország, Egyesült Államok, Brazília és Ausztrália. A kriobankok elsődleges és alapvető célja a védett halfajok értékes genetikai anyagának hosszútávon történő megőrzése (CLOUD & PATTON 2009; MAZUR 1984; KÁSA 2017). Az elmúlt években a laboratóriumi körülmények között kidolgozott eljárások eredményesnek bizonyultak és számos alkalommal a gyakorlati alkalmazhatóság is bebizonyosodott. Elterjedésük azonban még várat magára (BOKOR et al. 2019; MOLNÁR et al. 2020). A fagyasztott ivartermék felhasználása a termelési gyakorlatba mindeztidáig nem igazán valósult meg (URBÁNYI 2011). Azonban évről-évre egyre növekvő jelentőséggel bír a gazdasági halfajaink hím ivartermékének mélyhűtése és azok felhasználása a tenyészetekben (BOKOR et al. 2019; HORVÁTH et al. 2012; MOLNÁR et al. 2020). A fagyasztott minták ellenőrzött minőségűek és a szaporítás során, pontosan adagolhatóak nagy mennyiségű ikra termékenyítéséhez (MYLONAS 2010). Hazánkban a volt NAIK-HAKI-ban (jelenleg: MATE-AKI-HAKI) található fagyasztott spermabank, mely egy közös együttműködés keretében jött létre a volt Szent István Egyetem, Halgazdálkodási Tanszékével (jelenleg: MATE, AKI Halgazdálkodási Tanszék). A munka során a NAIK-HAKI élő ponty génbankjának felhasználásával hoztak létre mélyhűtött spermabankot. Fennállása óta összesen 187 egyed (15 hazai tájfajta és 3 külföldi fajta) ivartermékét hűtötték 0,5 ml-es műszalmákban (MARTÍNEZ-PÁRAMO 2017; HORVÁTH 2007). Az élő génállomány frissítésére már alkalmazták az eltárolt sperma mintákból 2013 májusában (MARTÍNEZ-PÁRAMO 2017). Új felhasználási lehetőségnek számított

HORVÁTH et al. (2012) munkája, mely során a módszert, horgászati szempontból fontos halfajok esetében alkalmazták. Sikeresen mélyhűtöttek pér (*Thymallus thymallus*) hímivarterméket terepi körülmények között (Soča-folyó, Szlovénia). Az eltárolt mintákat a szaporítások során használták fel a Tolmini Horgászszövetséggel közösen. MARTÍNEZ-PARAMO et al. (2017) írnak összefoglaló munkájukban a tengeri, valamint az édesvízi fajok ivarsejtmélyhűtése utáni hosszútávú tárolásáról és az abban rejlő lehetőségekről. Munkájukban kiemeli, hogy számos nehézség ellenére a célzott génmegőrzés kulcsfontosságú, valamint a különféle mélyhűtési módszerek fejlesztése révén a módszerek átültethetőek a szaporítási eljárásokba, és beintegrálhatóak a szelekciós és tenyésztési programokba egyaránt.

2.11. Nagy mennyiségben mélyhűtött hímivartermék felhasználása a szaporítás során

Az elmúlt két évtizedben számos fajban megkezdtek a nagy mennyiségben történő sperma mélyhűtést, mely már képes a keltetőházi igények kiszolgálására. A kutatások mind tengeri, mind édesvízi, gazdaságilag jelentős fajok esetén folytak. JI et al. (2004) vizsgálták az 1,8 ml térfogatú kriocsőben történő sperma mélyhűtést japán tengeri sügér (*Lateolabrax japonicus*) fajban. Eredményeiket termékenyítési (kontroll: 81,0±2,3 %; mélyhűtött: 84,8%) és kelési aránnyal (kontroll: 87,2±3,1 %; mélyhűtött: 70,1%) egyaránt igazolták. CHEN et al. 2004-ben nagy rombuszhalon (*Scophthalmus maximus*) végzett 1,8 ml-es műszalmával történő mélyhűtést követő nem tapasztaltak szignifikáns eltérést a friss spermával történő csoporthoz képest. Tesztjeikben kisebb (2 ml) és nagyobb (40 ml) mennyiségű ikrát termékenyítettek meg fagyasztott ivartermékkel. A kisebb ikratétel esetén közel azonos termékenyülési (friss: 74,7±8,0%, mélyhűtött: 70,1±8,9 %) és kelési arányt (friss: 47,5±6,8%; mélyhűtött: 46,8±5,2%) értek el. Szaporítás alkalmával mélyhűtött ivartermékkel elvégzett termékenyítési vizsgálat során hasonló értékeket rögzítettek. Magas termékenyülést detektált a friss (76,2±5,7%), illetve a mélyhűtött (71,6±7,3%) csoport esetében. Kelési arány meghatározásánál közel azonos eredményeket kaptak (friss: 41,1±3,7%; mélyhűtött: 34,7±3,6%). Az eredményeik között nem volt statisztikailag kimutatható különbség. Aranydurbincson (*Sparus aurata*) végzett 5 ml-es kriocsőben történő mélyhűtést CABRITA et al. 2005-ben, mely során vizsgálták az eltérő hígítási arányokat (1:6; 1:10; 1:20). Minden esetben szignifikánsan alacsonyabb mozgási értékeket rögzítettek a kezelések hatására a friss mintával történő összehasonlítás során (friss: 95±5%; 1:6: 70±5%; 1:10: 64±2%; 1:20: 58±8%). Eredményeiket

termékenyítési tesztekben is igazolták (friss: $77\pm 1\%$; 1:6: $75\pm 6\%$) 200 g mennyiségű ikratételeknél. A vizsgálataik során kiemelték, hogy az 1:10-es, illetve az 1:20-as hígítási arány esetében nem tudták sikeresen végrehajtani a kísérletet. LIU et al. (2006) vörös tengeri sügér (*Pagrus major*) ivartermék fagyasztását végezték el 2 ml-es kriocsőben. A friss sperma $91,3\pm 4,8\%$ motilitásához viszonyítva $79,4\pm 4,7\%$ - $88,6\pm 8,0\%$ -os értékeket rögzítettek. Vizsgálataik kiértékelése után megállapították, hogy a sejtek életképessége nem csökkent szignifikánsan a mélyhűtés hatására, amit termékenyítési tesztekben is igazoltak. Termékenyülési arányuk $89,6\pm 2,9\%$ - $95,6\pm 1,9\%$, míg kelési értékeik $85,3\pm 5,1\%$ - $91,4\pm 4,3\%$ -ok voltak. DING et al. 2010-ben atlanti laposhal (*Hippoglossus hippoglossus*) ivartermékét mélyhűtötték 4 ml-es kriocsőben és értek el $52,2\pm 27,2\%$ - $65,8\pm 26,1\%$ -os termékenyülési arányt. LIU et al. (2015) vizsgálatában 2 és 5 ml kriocsőben történő mélyhűtést követően $78,0\pm 4,7\%$ és $76,60\pm 7,90\%$ motilitást, $95,7\pm 3,6\%$ és $79,4\pm 5,2\%$ termékenyülési, valamint $93,1\pm 4,0\%$ és $77,2\pm 2,9\%$ kelési arányt írtak le laposhalban (*Paralichthys dentatus*). CABRITA et al. (2001b) eredményesen mélyhűtöttek szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) ivarterméket 1:3 hígítási arány használata során. A műszalmák motilitásvizsgálata során szignifikáns különbségeket rögzítettek (0,5 ml: 58%; 1,8 ml: 43%; 5 ml: 61%). Ellenőrző vizsgálatukban 200 g-os ikratételek esetében magas (0,5 ml: 84%; 1,8 ml: 73%; 5 ml: 72%) termékenyülési arányt mértek. BOKOR et al. (2010) 5 ml-es műszalmával történő mélyhűtést követően keltetőházi szaporítás alkalmával 40-120 g-os ikratételeken 51% - 51% -os termékenyülést rögzített szürke harcsában (*Silurus glanis*). HU et al. 2011-es vizsgálataikban 0,5 ml szalmával történő szaporítás során mértek több mint 50%-os termékenyülési eredményeket kék harcsa (*Ictalurus furcatus*) fajban nagy mennyiségű műszalma (40 db) egyidejű mélyhűtését követően. BOKOR et al. (2015) 5 ml-es műszalmában végeztek el fagyasztást szürke harcsa fajban. A kontroll csoporthoz ($50\pm 6\%$) viszonyítva hasonlóan magas $50\pm 3\%$ -os termékenyülési arányt mértek mélyhűtött ivartermékkel. Továbbá a friss spermához (73%) viszonyítva kelési arányban is jobbnak mutatkozott a fagyasztott csoport (76%). BOKOR et al. (2019) ugyancsak eredményesen mélyhűtött harcsa ivarterméket polisztirol dobozban és programozható mélyhűtő berendezésben 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső alkalmazása mellett. A friss spermánál $89\pm 3\%$ progresszív motilitást mértek, mely a kezelések hatására szignifikánsan csökkent. Polisztirol dobozban 5 ml-es szalmával $50\pm 9\%$ -ot, mélyhűtő berendezésben a szalmával $57\pm 10\%$ -ot, míg a 10 ml-es kriocsőben történő mélyhűtés hatására $41\pm 10\%$ -os mozgási értékeket írtak le. Termékenyítési vizsgálataik során 200 g-os

ikratételeknél, keltetőházi körülmények között, a felolvasztott minták esetében hasonló eredményeket rögzítettek a mélyhűtési módszerek között (friss: $68\pm 4\%$; 5 ml műszalma polisztirol doboz: 75 ± 5 ; 5 ml műszalma CRF: 72 ± 3 ; 10 ml kriocső CRF: 66 ± 6).

Ponty fajban LAHNSTEINER et al. (2003) magas progresszív motilitási értékeket rögzítettek 0,5 ml ($87,6\pm 1,8\%$) és 1,2 ml ($88,5\pm 3,5\%$) műszalma mélyhűtése esetén laboratóriumi körülmények között, azonban a friss minta motilitásához ($96,4\pm 5,4\%$) viszonyítva szignifikánsan alacsonyabbak értékeket mértek. HORVÁTH et al. (2007) eredményesen használták a keltetőházi szaporítás során nagy méretű műszalmát ponty esetében. Kísérletük alkalmával magas kelési arányt rögzítettek (1,2 ml: $86\pm 12\%$, 5 ml: $65\pm 18\%$).

A kidolgozott eljárások sikerességét a magas termékenyítési és kelési eredmények jelzik a ponty faj esetében. A mélyhűtött ivartermék felhasználása a gyakorlatban a számtalan sikeres kísérlet ellenére mind a mai napig nem terjedt el. Azonban, egy jól alkalmazható és pontosan teljeskörűen leírt fajspecifikus mélyhűtési program lehetővé tenné a módszer eredményes átültetését a szaporítási eljárásba (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2017).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A szaporodásbiológiai és ivarsejtmélyhűtési vizsgálatok általános bemutatása balatoni sudár ponty és hévízi törpenövésű magyar vadponty esetében

3.1.1. Kísérleti állomány kezelése

A vizsgált két ponty típusnál a használt módszertan bizonyos részei azonosak voltak. A kísérleti anyaghalakat a Halgazdálkodási Tanszék infrastruktúrájához tartozó zárt intenzív recirkulációs rendszerben tartottam. Az egyedeket minden beavatkozás előtt 2-fenoxietanollal (99%, 0,30 ml/l) bódítottam (KAISE & VINE 1998; VELÍSEK & SVOBODOVÁ 2004). A tejesek esetében a spermiációt hormonálisan indukáltam (2 mg/ttkg pontyhipofízis). A porított hormon készítményt 1 ml sóoldatban (0,65%) oldottam fel és injektáltam a halak hasúszójának tövére a szervezetükbe. Az ikrások ovulációját szintén pontyhipofízissel indukáltam. Testtömeg kilogrammonként 4 mg hormont oldottam fel 1 ml halfiziológiás sóoldatban (HORVÁTH 2018).

3.1.2. Mintavétel

A fejest nedvesített törölközőn végeztem el a hasfal enyhe nyomásával. A fejhető ikrát minden esetben száraz és cseppmentes tálakba fejtem és felhasználásig letakarva tároltam szobahőmérsékleten. Meggátoltam a tételek kiszáradását, illetve az esetleges vízcseppel való kontaminációját. A tejes egyedek fejése megegyezett a nőivarú egyednél bemutatott eljárással. A spermát a mintavétel során 2 vagy 5 ml-es fecskendővel gyűjtöttem össze, elkerülve azok vizelettel, vérrel vagy bélsárral történő szennyeződését. A tejet minden esetben 4 °C-on tároltam olvadó jégen (BOBE & LABBÉ 2008).

3.1.3. Spermaminták minősítése

A friss és felolvasztott spermaminták motilitását számítógépes spermavizsgáló berendezéssel (CASA) rögzítettem (KIME et al. 2001), melyen egy Sperm VisionTM v. 3.7.4. (Minitube of America, Venture Court Verona, Egyesült Államok) szoftverrel végeztem a kiértékelést. A sejtek aktivációjához egy, a ponty fajra korábban kidolgozott (45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, 0,01 g/ml BSA, pH: 8,0±0,2; ozmolalitás: 300 mmol/kg) oldatot használtam (SAAD et al. 1988) (11. ábra). Vizsgálataimban minden esetben mind a friss, mind a mélyhűtött minták esetében három általam kiválasztott mozgási paramétert vizsgáltam. A motilitási paraméterek a Sperm VisionTM 3.7.4. kritériuma szerint kerültek meghatározásra. A sejtek pMOT

(egyenes vonal távolsága > 5 μm , pixel/ μm arány: 151–100), VCL, és LIN értékeit rögzítettem. A méréseket legalább két ismétlésben végeztem el minden minta esetén.



11. ábra. Spermaminták minőségellenőrzése számítógépes spermavizsgáló rendszer (CASA) segítségével (Fotó: Nagy Borbála).



12. ábra. Oldatkeverés során használt mágneses keverő (HSC Heating Magnetic Stirrer, Labsystem Kft. Budapest, Magyarország) és pH-mérő (Five Easy FE20, Mettler Toledo, Budapest, Magyarország) Simex VF-1200-as elszívőfülke alatt (Labortrend Kft. Budapest, Magyarország (Fotó: Saját felvétel).

3.1.4. Spermamélyhűtés

Mélyhűtés során vizsgálataimban 2 különböző hígítót használtam. Egy korábban pontyfélék esetén sikeresen alkalmazott pér hígítót: 200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH: $8,0 \pm 0,2$ (ozmolalitás: 313 mmol/kg) (HORVÁTH et al. 2012; BERNÁTH et al. 2016a), valamint egy újonnan csuka fajra kidolgozott hígítót: 150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH: $8,0 \pm 0,2$ (ozmolalitás: 385 mmol/kg) (MOLNÁR et al. 2020) (12. ábra). Vizsgálattól függően 1:1, 1:4 és 1:9 hígítási arányokat (sperma: hígító+védőanyag) használtam (CABRITA et al. 2010). A fagyasztás során védőanyagként 10% metanolt alkalmaztam (CLOUD ÉS PATTON

2009; SULTANA et al. 2010). A kihígított mintákat a kísérleti beállítástól függően 0,5 és 5 ml kapacitású műszalmákba (Minitube GmbH, Tiefenbach, Németország), valamint 5 ml-es (Greiner Packaging Kft., Seregélyes, Magyarország) és 10 ml-es kriocsővekbe (Diagnosticum Zrt., Budapest, Magyarország) töltöttem (5. táblázat). A fagyás során bekövetkező térfogatváltozás miatt az 5 ml-es műszalmák és kriocsővek esetében 4 ml, míg a 10 ml-es kriocső esetében 8 ml volt a töltőkapacitás. A fagyasztást a vizsgálatoktól függően egy polisztirol dobozban (belső falmagasság: 22 cm, szélessége 25,5 cm, hossza: 36 cm, falvastagság: 2,5 cm), illetve egy programozható fagyasztó berendezésben végeztem (CRF, IceCube 14s, IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria) (13. ábra). A hűtési program, a műszalmák, vagy kriocsővek kapacitásától függően eltérő volt (6. táblázat). A felhasznált vegyszereket és műanyag eszközöket a Reanal (Budapest, Magyarország), Sigma-Aldrich-tól (Budapest, Magyarország), Diagnosticum Zrt. (Budapest, Magyarország) vállalatoktól szereztem be. Az oldatok osmolalitását egy Vapor Pressure 5600 típusú osmométerrel rögzítettem (Wescor, Logan, Egyesült Államok).



13. ábra. Programozható fagyasztó berendezés (Fotó: Saját felvétel).

5. táblázat. Különféle mélyhűtési módszereknél használt hígítási arányok összesítése.

Mélyhűtési kapacitás	Hígítási arányok (ml)		
	1:1	1:4	1:9
0,5 ml-es műszalma	N. A.	N. A.	metanol: 0,05 sperma: 0,05 hígító: 0,4
5 ml-es műszalma	N. A.	N. A.	metanol: 0,4 sperma: 0,4 hígító: 3,2
5 ml-es kriocső	N. A.	N. A.	metanol: 0,4 sperma: 0,4 hígító: 3,2
10 ml-es kriocső	metanol: 0,8 sperma: 4 hígító: 3,2	metanol: 0,8 sperma: 1,6 hígító: 5,6	metanol: 0,8 sperma: 0,8 hígító: 6,4

6. táblázat. Különféle mélyhűtési programok összesítése.

Mélyhűtési kapacitás	Mélyhűtési módszer és program leírása
0,5 ml-es műszalma	polisztirol doboz- 3 cm-en, 3 perc (HORVÁTH et al. 2012)
0,5 ml-es műszalma	CRF-kiindulási hőmérséklet: 7,5 °C, végpont: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc, (BERNÁTH et al. 2015)
5 ml-es műszalma	polisztirol doboz-3 cm-en, 7 perc (BOKOR et al. 2010)
5 ml-es műszalma	CRF-kiindulási hőmérséklet: 4 °C, végpont: -160 °C, hűtési sebesség: 15 °C/perc (BOKOR et al. 2019)
5 ml-es kriocső	polisztirol doboz- 3 cm-en, 7 perc (BOKOR et al. 2010 nyomán)
5 ml-es kriocső	CRF-kiindulási hőmérséklet: 4 °C, végpont: -160°C, hűtési sebesség: 15 °C/perc (BOKOR et al. 2019 nyomán)
10 ml-es kriocső	CRF-kiindulási hőmérséklet: 4 °C, végpont: -160°C, hűtési sebesség: 15 °C/perc (BOKOR et al. 2019)

A mélyhűtött mintákat egy 10 l kapacitású szállítható (Statebourne Cryogenics, Egyesült Királyság), és egy 48 l térfogatú tároló kaniszteres kannában (VWR XSS 48/10, VWR International Ltd., Debrecen, Magyarország) őriztem meg a Halgazdálkodási Tanszék laboratóriumában. A kannák folyékony nitrogén pótlását heti rendszerességgel végeztem.

3.1.5. Felolvasztás

Az eltárolt minták (műszalma, kriocső) felolvasztása egy vízfürdőben (Thermo Haake P5, Thermo Electron Corp, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) történt, 40 °C-on. A spermát a fagyasztó egység méretétől és a kísérleti beállítástól függően különböző időtartamig olvasztottam (7. táblázat).

7. táblázat. Különféle felolvasztási időtartamok összesítése.

Felolvasztási kapacitás	Felolvasztás időtartama
0,5 ml műszalma	40 °C-on 13 mp (BOZKURT 2017; HORVÁTH et al. 2012)
5 ml műszalma	40 °C-on 35 mp (BOKOR et al. 2010; CABRITA 2001b)
5 ml kriocső	Kísérletek során meghatározásra került.
10 ml kriocső	Kísérletek során meghatározásra került.

3.1.6. A kelési arány és a sejtkoncentráció meghatározása

A szaporítási vizsgálatok során a kelési arányt (kikelő lárva/nem termékenyült ikraszemek egymáshoz viszonyított aránya) az Image J szoftver (Image J for Windows, National Institutes of Health, Egyesült Államok) segítségével határoztam meg. A minták spermium koncentrációjának vizsgálata során szintén a már említett programot használtam.

3.1.7. Az eredmények statisztikai elemzése

A kísérletek során kapott eredményeket Microsoft Excel és Word (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok) programok segítségével dolgoztam fel. Az értékek statisztikai elemzés során az SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Egyesült Államok) és a GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, Egyesült Államok) szoftvereket alkalmaztam. Az adatok normál eloszlásának vizsgálatához Kolmogorov-Smirnov tesztet használtam (szignifikancia szint: $P < 0,05$). A nem normál eloszlást mutató adatsorokon arkusz-színusz négyzetgyök [pMOT (%); kelési arány (%); LIN (%) és logaritmikus transzformációt (VCL ($\mu\text{m/s}$), sejtkoncentráció (sejt/ml)] végeztem. A különböző vizsgált csoportokat Student féle egymintás, valamint független kétmintás t-próbával, egy- és több szempontos varianciaanalízissel (ANOVA), valamint Kruskal-Wallis teszttel (kiegészítve: Tukey, Bonferroni, Dunn és Dunnett T3 féle post-hoc teszt) hasonlítottam össze (szignifikancia szint: $P < 0,05$).

3.2. A balatoni sudár ponty anyaállomány beszerzése

Az egyedeket a fajtafenntartó Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt. Irmapusztai állományából szereztem be. A cég alkalmazottai kerítőhálós halászati módszerrel tanyát alakítottak ki. A halakat halválogató asztalon történő szelektálást követően szállítottam a Halgazdálkodási Tanszék kísérleti infrastruktúrájába (14. ábra).



14. ábra. Balatoni sudár pontyok válogatása (Fotó: Nagy Borbála).

3.3. A balatoni sudár ponty állomány tartása

A behozott állományt ivartól függően tartottam egy 3 m³-es (15. ábra) és egy 1 m³-es (16. ábra) vízvisszaforgatásos különálló rendszerben. A nagyobb kapacitású kísérleti egységben a halak tartómedencéjének elfolyó vizét elsőként egy szivattyúházba épített fizikai szűrő (AstralPool Victoria Plus Silent AC 230 V, Fluidra Magyarország Kft., Szigetszentmiklós, Magyarország) látja el. Feladata a nagy szennyeződések eltávolítása, ezáltal megakadályozva azok a motor forgólapátjai közé szorulást. Ezt követően egy újabb 200 liter befogadóképességű zárt gyöngyszűrő (EUROPA D200, Fluidra Magyarország Kft., Szigetszentmiklós, Magyarország) végzi a tisztítást. Nyomásos elv alapján a tisztított víz ezt követően a biológiai szűrőbe (RK Biomedica, Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) jut. A tartályból a gravitációs nyomás révén egy UV szűrőn (Aqua Medic Helix Max, 36W, Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) keresztül a haltartó medencében folyik a károsanyagaktól mentesített víz. Az oxigén egy kiépített csőhálózat révén jut el az egyes kísérleti terekbe. Az üzembiztos légszállítást két AXIS 202SG0.7T típusú SFP5/4” levegőszűrővel ellátott oldalcsatornás fűvő biztosítja. A számítógépes vezérlésnek köszönhetően a légfűvők 8 óránként váltása megtörténik, amelyet egy SV5/4” biztonsági szelep lát el (AXIS Mérnöki Kft., Budapest, Magyarország). A kisebb 1 m³-es rendszernél a fizikai szűrést egy TM 45/23133 sűrűségű szivacs szűrő (Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) látja el. A biológiai anyagoktól való mentesítést egy mozgóágyas biomedica szűrőegység végzi (RK Biomedica, Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország). Egy Pedrollo PQ 60 (Pedrollo S.p.A., San Bonifacio, Olaszország) típusú külső szivattyú juttatja a kiegyenlítő felső tartályba a vizet, amelyben a megemelt kivitelnek köszönhetően víznyomás keletkezik. A tartómedencébe egy UV szűrővel (Aqua Medic Helix Max, 36W, Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) és áramlásmérő érzékelővel ellátott ágon kerül vissza víz. Az oxigénellátás különbözik a zárt intenzív recirkulációs rendszer többi haltartó

egységétől, ugyanis azt, egy Resun ACO 006 típusú légpumpa (Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) biztosítja. A kísérleti terekben szobánkként és medencénkként állítható a vízhőmérséklet és folyamatosan működő szondarendszer (MIQ/TC 2020 XT, WTW, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Németország) méri a vízparamétereket. A teljes egység vezérlését egy PLC monitoron (Unitronics VS70, Velinor Kft., Budapest, Magyarország) keresztül lehet nyomon követni és szabályozni.



15. ábra. Zárt intenzív recirkulációs rendszer (kapacitás: 3 m³) (Fotó: Saját felvétel).



16. ábra. Zárt intenzív recirkulációs rendszer (kapacitás: 1 m³) (Fotó: Saját felvétel).

8. táblázat. A kísérleti állomány tartása során mért oxigén és hőmérsékleti adatok.

Alfejezet sorszáma	Ivar, vizsgálat	Oldott oxigén (mg/l)	Hőmérséklet (C°)
3.5.1.	Tejes	8±0	21±1
3.5.1.	Tejes	8±0	21±1
3.5.2.	Tejes	7±1	21±0
3.5.3.	Tejes	7±0	22±1
3.5.4.	Tejes	8±1	21±1
3.5.5.	Tejes	7±1	22±0
3.5.6.	Tejes	8±0	22±0
3.5.6.	Ikrás	8±1	22±1
3.5.6.	Ikrainkubáció	8±0	22±1
3.5.7.	Tejes	8±0	22±0
3.5.7.	Ikrás	8±1	22±0
3.5.7.	Ikrainkubáció	7±1	22±1
3.5.7.	Lárvanevelés	8±0	22±1

3.4. A balatoni sudár ponty állomány kezelése

Az anyaállományt minden esetben a ponty keltetőházi szaporításával megegyező módon kezeltem (lásd: 3.1. fejezet). Az ikrásokat a már leírt módon indukáltam. A teljes testtömegre kiszámított hormonmennyiség 10 %-át oltottam be előadagként. A második döntő adagot (90%) az első kezelést követően 12 órával injektáltam a halak szervezetébe. Közvetlen a kezelés után a még bódult ikrás halak ivarnyílását bevarrtam (Dafilon USP 3 típusú nem felszívódó sebészeti fonállal, B. Braun Magyarország Kft., Budapest, Magyarország). Ezzel megakadályozható volt az érett ikraszemek esetleges elszóródása a tervezett fejés előtt. A fejés az első oltást követően 24 órával történt (240-260 órafok) mindkét ivar esetében. (17. ábra).



17. ábra. Tejes egyed oltása és fejése (Fotó: Dr. Bokor Zoltán).

3.5. A balatoni sudár ponty állományon elvégzett vizsgálatok kísérleti terve

A 9. táblázat mutatja be a kísérleti állományon elvégzett vizsgálatokat.

9. táblázat. Balatoni sudárpontyon elvégzett vizsgálatok összesítése.

Alfejezet sorszáma	Mélyhűtési kapacitás	Hígító	Mélyhűtési módszer	Vizsgálat tárgya	Vizsgálat egyedszáma
3.5.1.	5 ml-es műszalma 10 ml-es kriocső	pér	polisztirol doboz, CRF berendezés	mélyhűthetőség, motilitás	N=6
3.5.1.	10 ml-es kriocső	pér	CRF berendezés	hígítási arány, motilitás	N=3
3.5.2.	5 ml-es műszalma 10 ml-es kriocső	pér, csuka	polisztirol doboz, CRF berendezés	motilitás	N=7
3.5.3.	5 ml-es műszalma 10 ml-es kriocső	pér, csuka	polisztirol doboz, CRF berendezés	sejtkoncentráció	N=5
3.5.4.	10 ml-es kriocső	pér, csuka	CRF berendezés	felolvasztási idő	N=5
3.5.5.	5 ml-es kriocső	pér, csuka	polisztirol doboz, CRF berendezés	felolvasztási idő	N=5
3.5.6.	10 ml-es kriocső	pér, csuka	CRF berendezés	motilitás, termékenyítés	♀: N=2 ♂: N=5
3.5.7.	N. A.	N. A.	N. A.	lárva-nevelés	♀: N=1 ♂: N=5

3.5.1. Az 5 ml-es műszalma és a 10 ml kriocső mélyhűtésének összehasonlítása, illetve a 10 ml-es kriocső optimális hígítási arányának kidolgozása

A kísérlet első fázisában nagy mennyiségű, 5 ml-es műszalmában és a 10 ml-es kriocsőben történő mélyhűtést vizsgáltam a sudár ponty tájfajtajában ($N=6$). A sejtek aktivációját a már korábban bemutatott aktiválóval végeztem (lásd: 3.1.3. fejezet). A vizsgálat során a hím egyedektől származó ivartermék fagyasztásnál 1:9-es hígítási arányt alkalmaztam (lásd: 3.1.4. fejezet; 5. táblázat) pér hígító használata során (lásd: 3.1.4. fejezet). A mélyhűtést polisztirol dobozban és CRF berendezésben egyaránt elvégeztem (lásd: 3.1.4. fejezet; 6. táblázat) (18. ábra). A műszalmák, valamint a kriocsövek felolvasztását vízfürdőben hajtottam végre (lásd: 3.1.5. fejezet; 7. táblázat). A kriocső esetében a minták teljes felolvadásáig tartott a folyamat, elkerülve az esetleges túlmelegedést. A kriocső esetében a kutatómunka későbbi vizsgálatában egységesítettem a felolvasztási időtartamot.



18. ábra. Az 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső mélyhűtése programozható fagyasztó berendezésben (Fotó: Saját felvétel).

Vizsgáltam továbbá ($N=3$) a 10 ml-es kriocsőben történő mélyhűtés során alkalmazható különböző hígítási arányokat (1:1, 1:4 és 1:9) (lásd: 3.1.4. fejezet; 5. táblázat). A fagyasztás során programozható fagyasztó berendezést alkalmaztam (lásd: 3.1.4. fejezet; 6. táblázat). A felolvasztás a kísérlet első fázisában bemutatott módszerrel történt.

3.5.2. Kétféle hígító és különböző mélyhűtési módszerek összehasonlítása (motilitás vizsgálat)

Kísérletemben vizsgáltam frissen fejt ivartermék ($N=7$) 5 ml-es műszalmában polisztirol dobozban, a CRF berendezésben történő mélyhűtését, valamint 10 ml-es kriocsőben történő fagyasztását. A mélyhűtést a 3.1.4. fejezet 6. táblázatban bemutatott fagyasztási programok szerint végeztem el. A kutatásban 1:9 hígítási arányt (lásd: 3.1.4. fejezet; 5. táblázat) alkalmaztam. Célom a pontyfélékre jellemző, felolvasztás után jelentkező spermaminták agglutináció mértékének csökkentése volt az eltérő összetételű hígítók (pér és csuka) használata során (lásd: 3.1.4. fejezet) (19. ábra).



19. ábra. Az agglutináció mértékének szabad szemmel történő meghatározása a két féle hígító összehasonlítása során 10 ml-es kriocső esetében (felső sor: csuka hígító; alsó sor: pér hígító, $N=7$) (Fotó: Saját felvétel).

3.5.3. Két féle hígító és különböző mélyhűtési módszerek összehasonlítása (sejtkoncentráció vizsgálata)

Vizsgálatomban összehasonlítottam a friss, az 5 ml műszalma, és a 10 ml kriocső polisztirol dobozban, valamint CRF berendezésben történő mélyhűtésének hatását a sejtsűrűség változására vonatkozóan ($N=5$). Munkámban összevettem a már korábban leírt pér, valamint csuka hígítót (lásd: 3.1.4. fejezet). Kutatásomban a friss és felolvasztott sejtszám meghatározásához Bürker kamrát alkalmaztam. Az eszköz egy két négyzethálós beosztású teret tartalmaz. Sejtszámlálás során az 1 milliliterben lévő sejtszámot (N) határoztam meg a kamrában számolt sejtek átlagából (X). A képlet a következő volt: $N=X*25*10*1000*1000$ (BOKOR 2009). A kamra egy négyzetének területe $1/25 \text{ mm}^2$, míg magassága $1/10 \text{ mm}$, így kaptam meg az $1 \mu\text{l}$ -ben lévő sejtek számát. Ezt megszoroztam 1000-rel, így kaptam meg a ml-enkénti sejtszámot. Az utolsó szám a hígítási arány, mely kísérletem során 5 és 1000-szeres között változott, a minták sűrűségétől függően. A kezelési egységekről készített felvételeket egy Nikon Eclipse E600 típusú sztereó mikroszkóppal végeztem, melyre egy QImaging microPublisher 3.3 RTV kamera volt erősítve (Apokromát Kft., Budapest, Magyarország). A képeket egy QCapture Pro (Teledyne Photometrics, Tucson, Egyesült Államok) szoftver segítségével rögzítettem (20. ábra).



20. ábra. Sudár ponty spermiumok (kék pontok) a Bürker-kamra kísérleti kvadrátjában (friss sperma, csuka hígító, 100x-os hígítási arány) (Fotó: Saját felvétel).

3.5.4. Egységes felolvasztási időtartam meghatározása a 10 ml-es kriocső, pér és csuka hígítók, valamint CRF alkalmazása esetén

Kutatásomban öt egyedtől ($N=5$) származó ivarterméket mélyhűtöttem 10 ml kapacitású kriocső felhasználásával. Célom, a felolvasztás időtartamának egységesítése volt. A fagyasztócső mélyhűtésénél 1:9 hígítási arányt alkalmaztam (lásd: 3.1.4. fejezet; 5. táblázat) csuka és pér hígító (lásd: 3.1.4. fejezet) felhasználása mellett. A fagyasztást CRF berendezésben végeztem el (lásd: 3.1.4. fejezet; 6. táblázat). Három különböző felolvasztási időt hatását hasonlítottam össze (3 perc 30 másodperc, 3 perc 45 másodperc, valamint 4 perc) (21. ábra).



21. ábra. A 10 ml-es kriocső vízfürdőben történő felolvasztása (Fotó: Dr. Bokor Zoltán).

3.5.5. Az 5 ml-es kriocső egységes felolvasztási idejének meghatározása 2 hígító és 2 fagyasztási módszer alkalmazása során

Kísérletemben a zárt intenzív recirkulációs rendszer rendszerben tartott öt tejes egyed ($N=5$) ivartermékét nyertem ki és használtam fel. Az 5 ml kapacitású fagyasztó cső mélyhűtésénél 1:9 hígítási arányt alkalmaztam (lásd: 3.1.4. fejezet; 5. táblázat) csuka és pér hígítót (lásd: 3.1.4. fejezet) használata során egyaránt. A fagyasztást polisztirol dobozban, valamint CRF berendezésben végeztem (lásd: 3.1.4. fejezet; 6. táblázat). A hígítók eltérő összetétele és a 2 féle mélyhűtési módszer okán, előkísérleteimben különböző időintervallumokat határoztam meg. Összehasonlítottam pér hígító esetében a 2 perc 45 másodperces, a 3 perc, valamint a 3 perc 15 másodperces, míg csuka hígító esetében a 2 perc 15 másodperc, 2 perc 30 másodperces, illetve a 2 perc 45 másodperces felolvasztási időintervallumokat (22. ábra).



22. ábra. Az 5 ml-es kriocsövek polisztirol dobozban történő mélyhűtése (Fotó: Dr. Bokor Zoltán).

3.5.6. A nagy mennyiségű (10 ml-es kriocső) mélyhűtött sperma keltetőházi szaporítás során történő alkalmazása

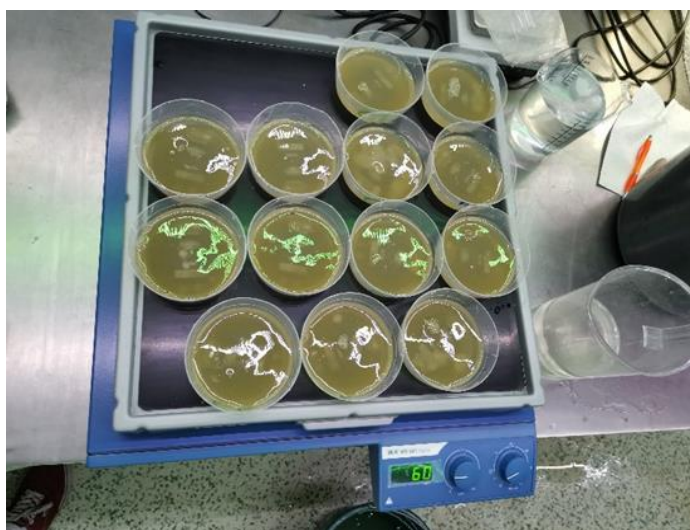
A ponty intenzív keltetőházi gyakorlatába kívántam integrálni a leggazdaságosabb módszer (10 ml-es kriocső) használatát. Vizsgáltam a pér, valamint a módosított csuka hígítóval (205 mM glükóz, 20 mM NaCl, 25 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH: $8,0 \pm 0,2$; ozmolalitás: 331 mmol/kg) történő fagyasztott ivartermék alkalmazhatóságát termékenyítési eljárás során. Korábbi vizsgálatok alkalmával használt csuka hígító esetében az ozmolalitás jóval meghaladta a kívánt értéket (~350-385 mmol/kg). Vizsgálatomban növeltem a cukor, valamint csökkentettem az oldott sók mennyiségét az oldatban. A módszerek eredményességét termékenyítés során kívántam igazolni meghatározva a lárvák kelési arányát. Vizsgálatomban tejesektől ($N=5$) fejt ivarterméket mélyhűtöttem 1:9 hígítási arány (lásd: 3.1.4. fejezet; 5. táblázat) mellett. A fagyasztás során CRF berendezést alkalmaztam (lásd: 3.1.4.

fejezet; 6. táblázat). Korábbi vizsgálataim alapján a minták felolvasztásához 3 perc 30 másodperces időtartamot alkalmaztam. A termékenyítéshez az ikrásoktól ($N=2$) sikeresen fejtem összesen 354 g ikrát. A szaporítás során követtem a ponty keltetőházi szaporítási eljárása során már kidolgozott gyakorlatot (3.1.1. fejezet) (23. ábra).



23. ábra. Ikrás egyed fejése (Fotó: Nagy Borbála).

A vizsgálatot a kontroll és két kezelt csoportok esetében mind az 5 tejes friss és felolvasztott spermájával elvégeztem. Minden egységbe 10 g ikrát mértem ki, majd ezt termékenyítettem meg egy előre meghatározott arány alapján (100 g ikrá; 10 ml rendszervíz; 1 ml sperma) (HORVÁTH szóbeli közlése alapján 2019). Natív hímivartermékből 100 μ l-t használtam fel, míg a mélyhűtött mintákból egységesen 1000 μ l-t pipettáztam ki az előre kimért ikratételekre. Ezt követően adtam hozzá az 10 ml rendszervizet (termékenyítés: 30 mp). Az ikratételek duzzasztása Woynárovich-féle oldattal (2.6. fejezet) történt síkágyas rázóasztalon (HS 501 Digital Plus Horizontal Shake, VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) 60 rpm fordulaton másfél órán keresztül, szobahőmérsékleten (SZABÓ 2013). Az ikratételek végső ragadóságának elvételét három ismétlésben (20 mp, 15 mp, 10 mp) csersavas kezeléssel végeztem (lásd: 2.6. fejezet). A vizsgálat során a rossz ikraszemek nem lettek eltávolítva (24. ábra).



24. ábra. Ikratételek rázóasztalon történő duzzasztása (Fotó: Saját felvétel).

A tételeket egyedi recirkulációs Rack rendszerbe helyeztem. A kísérleti tér teljes kapacitása 30 db egyenként 10 liter térfogatú medence, mely egy fizikai, biológiai és UV szűrővel ellátott teljesen automatizált, PLC vezérlésű egység. A kísérlet folyamán az ikrákon történő vízi penész megtapadását Szaprostop oldattal (Dr. Baska Ferenc állatorvos javaslatára Budapest, Magyarország) gátoltam. Az első kezelésnél 100 literenként 15 ml, míg a második alkalommal 10 ml oldatot használtam. A lárvák a termékenyítés pillanatától számított 3. napon keltek ki. A kelést megelőzően a rendszert recirkulációs nevelésről átváltottam vízfolyásosra elkerülve ezzel a károsanyag felhalmozódást (CSORBAI et al. 2020). A kelési arányt közvetlen a kelés pillanatában meghatároztam.

3.5.7. Intenzív lárvanevelés friss spermával történő szaporítást követően

Az érett tejes és ikrás anyahalakat a ponty hagyományos keltetőházi szaporítási eljárásával megegyező módon kezeltem, mind a hormonális indukció, mind pedig a termékenyítési eljárás során (lásd: 3.1.1., valamint 3.5.6. fejezet). Vizsgálatomban egy ikrástól származó 332 g ivarterméket kevertem össze öt tejestől ($N=5$) származó összesen 7,5 ml spermával. A termékenyítést rendszervízzel végeztem. Az ikratételek inkubációja, majd a keltetés folyamata is zárt recirkulációs Zuger rendszerben történt. A kelést megelőzően a recirkulációs egységben növeltem a vízfolyást (CSORBAI et al. 2020). A kikelt lárvákat a korábban leírt Rack rendszerbe helyeztem (25. ábra). A haltartó medencékbe literenként 50 egyedeket helyeztem ki. A táplálkozó lárvákat napi négy alkalommal étvágy szerinti (*ad libitum*) mennyiségben frissen kelt sörák lárvával ettettem. A kutatás során három fejlődési szakasz időpontjában (kelés, szikzacskó felszívódása, egy hetes táplálkozó lárva) rögzítettem medencénként 20-20 egyed általános testparamétereit és 10-10 egyed alaktani elváltozásait (BERNÁTH et al.

2018). Az egyedek sztenderd testhosszának mérése során a halakat egyesével egy milliméter beosztású mérőeszközre helyeztem és a leolvasott értéket rögzítettem. Az átlagos testtömeg mérés során Mettler Toledo AB204-S (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) típusú analitikai mérleget használtam (négy tizedesjegy pontosság). A leválogatott egyedeken a szabályos fejlődéstől eltérő rendellenességeket (görbült test, torz farokfejlődés, szikdeformitás, fejdeformitás, ödéma, úszóhólyag torzulás, aneurizmás bevérzés) rögzítettem (BERNÁTH et al. 2018). Vizsgálataimhoz Leica M205 FA típusú fluoreszcens sztereó mikroszkópot használtam, melyre Leica DFC 7000T kamera volt helyezve. A képek rögzítését a Leica Application Suite X szoftver segítségével végeztem (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Germany, Mo.-i forgalmazó: Biomarker Kft. Gödöllő, Magyarország). Minden esetben „dark field” (sötét háttér) beállítást használtam. Életszakaszhoz igazítottan a nagyítás és az expozíciós idő azonos volt (frissen kelt lárva: 20-szoros nagyítás, 80 msec záridő; táplálkozó lárvaszakasz kezdete: 15-szörös nagyítás, 80 msec záridő; egy hetes táplálkozó lárva: 7,8-szoros nagyítás, 80 msec záridő). Az egyedek altatásához 2-fenoxietanol (99%, 0,40 ml/l) oldatot alkalmaztam. Bódultnak tekintetem azt az állapotot mikor a lárvák kopulyúlemezeinek mozgása lelassult, azonban még élettevékenységet mutatott. A halak fixálásához 3%-os metilcellulóz oldatot használtam. A fényképezéshez az egyedeket az oldalukra fektettem és a testet az oldatban rögzítettem. A fotózást követően az állatokat nem helyeztem vissza a tartómedencébe. A morfológiai elváltozások értékelését vizuálisan végeztem.



25. ábra. A vizsgálat során alkalmazott lárvanevelő rendszer (Fotó: Dr. Csorbai Balázs).

3.6. A hévízi törpenövésű magyar vadponty anyaállomány beszerzése

A hévízi vadpontyokat az üzemeltető (Hévízgyógyfürdő és Szent András Reumakórház; H-8380 Hévíz, Dr. Schulhof Vilmos sétány 1.) által fenntartott Hévízi-tóról fogtam be, állított panelhálóval (36*1,5 m/12 panel/EN 14757), valamint horgászeszközökkel (26. ábra). A megfogott halakat szállításig a parton tartóhálón tároltam. Szállításukat a tóról hozott és temperált vízben (28 °C) végeztem csökkentve a halak stresszérzékenységét (27. ábra).



26. ábra. Állított panelhálók lehelyezése a Hévízi tavon (Fotó: Saját felvétel).



27. ábra. Megfogott hévízi vadponty egyed (Fotó: Dr. Müller Tamás).

3.7. A hévízi törpenövésű magyar vadponty állomány tartása

Az ivarokat szétválogatva tartottam a zárt intenzív recirkulációs rendszer egyik 3 m³-es medencéjében, melyet a belső falak berögzítésével elválasztottam 3 különálló 1 m³-es kisebb medencére (28. ábra) (10. táblázat). Az egység felépítése és működése megegyezett a korábban bemutatott recirkulációs rendszer leírásával (lásd 3.3. fejezet).



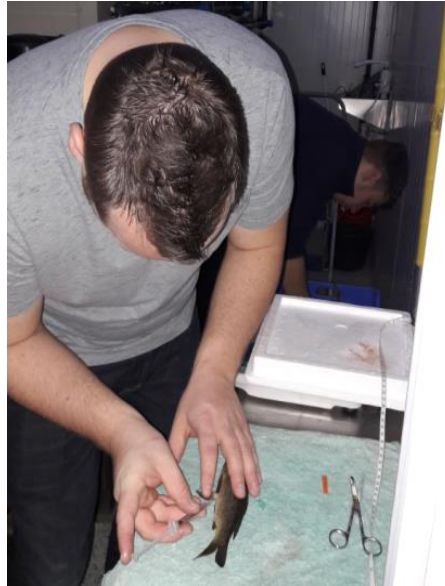
28. ábra. A kísérletek során használt recirkulációs egység (kapacitás: 3 m³) (Fotó: Saját felvétel).

10. táblázat. A kísérleti állomány tartása sor mért oxigén és hőmérsékleti adatok

Alfejezet sorszáma	Ivar, vizsgálat	Oldott oxigén (mg/l)	Hőmérséklet (C°)
3.8.1.	Tejes	6±1	28±1
3.8.2.	Tejes	7±1	26±1
3.8.3.	Tejes	8±0	22±1
3.8.4.	Tejes	7±1	22±1
3.8.5.	Tejes	8±0	24±1
3.8.5.	Ikrás	8±0	24±1
3.8.5.	Ikrainkubáció	8±1	24±1

3.7. A hévízi törpenövésű magyar vadponty állomány kezelése

A hévízi vadponty anyaállományt is minden esetben a ponty keltetőházi szaporításával megegyező módon kezeltem (lásd: 3.1.1. fejezet). Az ikrásokat, illetve a tejeseket minden esetben a korábban leírt módon bódítottam (lásd: 3.1.1. fejezet) (29. ábra). A termálvíznek köszönhetően az anyahalak folyamatos érésben voltak, ezáltal a hormondózist egy adagban oltottam be. Az ikrások és tejesek kezelése megegyezett a korábban bemutatott módszerrel (lásd: 3.1.1. fejezet). Oltást követően mind a két ivart 12 óra elteltével lefejtem (VÁRKONYI 2015).



29. ábra. Hévízi vadponty oltása a kísérleti rendszerben (Fotó: Dr. Bernáth Gergely).

3.8. A hévízi törpenövésű magyar vadponty állományon elvégzett vizsgálatok kísérleti terve

A 11. táblázat mutatja be a kísérleti állományon elvégzett vizsgálatokat.

11. táblázat. Hévízi vadpontyon elvégzett vizsgálatok összesítő táblázata.

Alfejezet sorszáma	Mélyhűtési kapacitás	Hígító(k)	Mélyhűtési módszer	Vizsgálat tárgya	Vizsgálat egyedszám
3.8.1.	N. A.	N. A.	N. A.	spermiáció, motilitás	$N=8$ $N=8$
3.8.2.	N. A.	N. A.	N. A.	spermiáció, motilitás	$N=7$ $N=7$
3.8.3.	0,5 ml-es műszalma	pér	polisztirol doboz	motilitás	$N=16$
3.8.4.	0,5 ml-es műszalma	pér, csuka	polisztirol doboz, CRF berendezés	motilitás	$N=5$
3.5.5.	N. A.	N. A.	N. A.	lárwanevelés	♀: $N=4$ ♂: $N=5$

3.8.1. A spermiáció terepi körülmények között történő indukciója

Vizsgálatomban a tavon befogott egyedekből két csoportot ($N=8-8$) alakítottam ki. Célom az a spermiáció kiváltása volt terepi körülmények között szállítás hatásának vizsgálata mellett. Közvetlen megfogás után kezeltem a csoportokat a tóparton (30. ábra). Az egyik csoportot hormonálisan indukáltam (lásd 3.7. fejezet), míg a másikat kizárólag hal fiziológiás NaCl oldattal (0,65%) oltottam (kontroll csoport) (CEJKO et al. 2018, 2019). A csoportokat különálló, egyenként 65 liter kapacitású hordókban a zárt intenzív recirkulációs rendszer rendszerbe szállítottam. Oxigénellátásukat egy 12 V-os autóban működtethető Resun MPQ 905 típusú légkompresszor (V-Bio Intézményüzemeltetési Kft., Dömsöd, Magyarország) látta el. A kísérleti térbe való

behelyezés a csoportok esetében elkülönítve került sor 30 perces hőmérséklet- és vízkiegyenlítést követően. Az oltást követően 12 órával a halak a 3.1.1. illetve a 3.7. fejezetben leírtak szerint kezeltem és fejtem.



30. ábra. A tejes egyedek terepi körülmények között végrehajtott oltása és a kísérleti infrastruktúrába történő szállítása (Fotó: Láng Levente Zete).

3.8.2. A spermiáció növekvő hormonadagú zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő indukciója

A tejeseket közvetlenül a kísérlet előtt fogtam be és helyeztem el a zárt intenzív recirkulációs rendszerben. Két csoportot alakítottam ki ($N=7-7$). Az egyik csoportban növekvő hormondózisú, egy hetes időtartamú oltási sorozatot alkalmaztam (1 kezelés: 1 mg/ttkg, 2. kezelés: 2 mg/ttkg, 3. kezelés: 2 mg/ttkg, 4. kezelés: 4 mg/ttkg) 2 napos időintervallumokban (SZABÓ szóbeli közlése alapján 2018). A másik csoport kizárólag halfiziológiás konyhasóoldatot (lásd: 3.8.1. fejezet) kapott, mint kontroll, a fent említett időrend szerint. A fejest az utolsó oltást követő 12 órával végeztem el.

3.8.3. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben tartott tejes egyedek spermiációjának hormonális indukciója és a kinyert ivartermék mélyhűtése

Kutatásomban a zárt intenzív recirkulációs rendszerben hosszabb ideje tartott egyedek ($N=16$) spermációjának hormonális indukálását végeztem el. Az előző fejezetben (3.8.2. fejezet) leírt oltási módszert alkalmaztam. A fejest a 3.8.2. fejezetben leírtak szerint hajtottam végre (31. ábra). A mélyhűtés során 1:9 hígítási arányt (lásd 3.1.4. fejezet, 5. táblázat) használtam 0,5 ml-es műszalma esetében. A fagyasztást polisztirol dobozban végeztem (lásd: 3.1.4. fejezet; 6. táblázat). Minden minta esetében két ismétlésben tudtam a mélyhűtést végrehajtani. Felolvasztást a 3.1.4. fejezetben leírtak (7. táblázat) szerint végeztem.



31. ábra. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben tartott hévízi vadponty tejes egyed fejése (Fotó: Dr. Bokor Zoltán).

3.8.4. Két féle hígító (pér, csuka) alkalmazásának összehasonlítása az agglutináció kiküszöbölésének érdekében a fagyasztás során

Vizsgálatomban összehasonlítottam a hévízi vadponty ($N=5$) ivartermékének fagyasztás utáni minőségét a korábban bemutatott pér és csuka hígító (lásd: 3.1.4. fejezet) használatát követően. A 0,5 ml-es műszalma fagyasztása során 1:9 hígítási arányt (lásd: 3.1.4. fejezet; 5. táblázat) használtam. A mélyhűtést polisztirol dobozban, valamint CRF berendezésben végeztem (lásd 3.1.4. fejezet; 6. táblázat) (32. ábra). A minták felolvasztását a 3.1.4. fejezet; 7. táblázatban bemutatott módszer szerint hajtottam végre.



26. ábra. A spermával töltött 0,5 ml-es műszalmák. A kép bal oldalán a programozható fagyasztó berendezésbe, míg a kép jobb oldalán a polisztirol dobozba előkészített minták láthatóak (Fotó: Saját felvétel).

3.8.5. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő szaporítás

Az egyedeket ($N=24$; 12 ikrás, 12 tejes) megfogásukat követően a tóparton hormonálisan indukáltam, majd ezt követően a Halgazdálkodási Tanszék infrastruktúrájához tartozó zárt intenzív recirkulációs rendszerbe szállítottam (lásd: 3.8.1. fejezet) (33. ábra).



33. ábra. A befogott egyed parton történő hormonális indukciója (Fotó: Izsák Tibor).

Az oltást követően 12 órával sikeresen fejtem ivarterméket ikrás ($N=4$) és tejes ($N=5$) egyedektől egyaránt. A termékenyítési eljárást a korábban bemutatott 3.7. fejezetben leírtak szerint végeztem. Összesen 14,63 g ikrát fejtem sikeresen 4 egyedtől, melyet 5 egyedtől származó 1,5 ml mennyiségű spermával termékenyítettem meg. Az ikratétel inkubációját a 3.5.6. fejezetben leírtak szerint hajtottam végre. A termékenyített ikratételt egy 7 liter kapacitású Zuger üvegbe helyeztem (34. ábra). Az ikrá kezelését a 2.6. fejezetben bemutatott módon végeztem. A kelést megelőzően a rendszert recirkulációs nevelésről átváltottam vízfolyásosra elkerülve ezzel a károsanyag felhalmozódást (CSORBAI et al. 2020). A vizsgálat során a rossz ikraszemek nem lettek eltávolítva. A kelési arányt a termékenyítéstől számított 3. napon határoztam meg.



34. ábra. Hévízi vadponty termékenyített ikratétel inkubációja (Fotó: Saját felvétel).

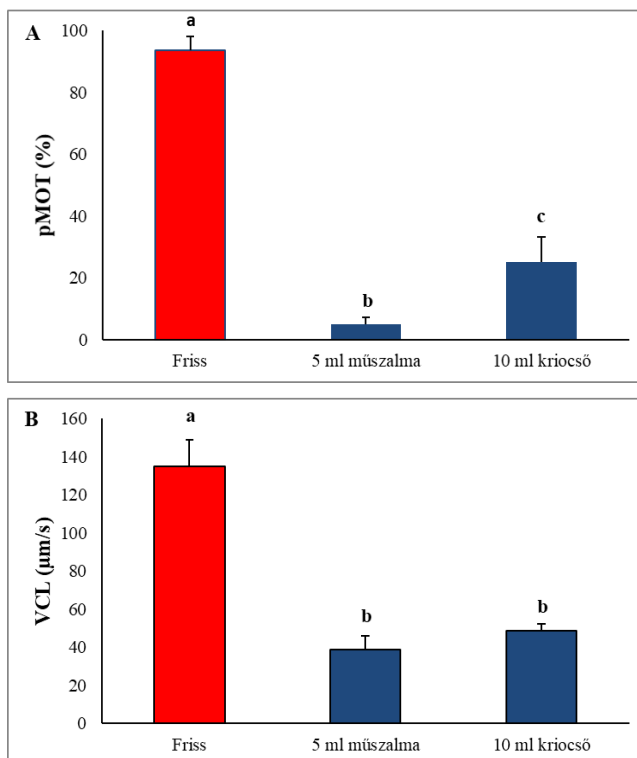
4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

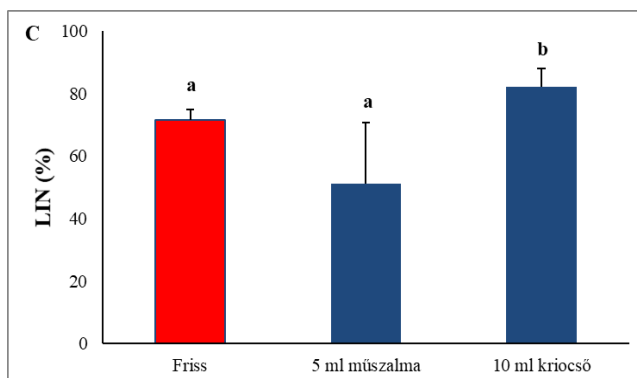
4.1. A balatoni sudár pontyon elvégzett vizsgálatok eredményei

4.1.1. Az 5 ml-es műszalma és a 10 ml kriocső mélyhűtésének összehasonlítása, illetve a 10 ml-es kriocső optimális hígítási arányának kidolgozása

Az 5 ml-es műszalma és a 10 ml-es kriocső összehasonlítása

Vizsgálatomban összehasonlítva az 5 ml-es műszalmában, illetve a 10 ml-es kriocsőben történő mélyhűtés hatását a friss kontrollhoz (pMOT: $94\pm 4\%$) képest szignifikánsan alacsonyabb motilitási értékeket rögzítettem mind a műszalma ($5\pm 2\%$), mind pedig a kriocső ($25\pm 8\%$) esetében. Továbbá a mélyhűtési módszerek között is igazolható eltérést mértem. A sebességre utaló VCL értékek között is statisztikailag igazolható volt a különbség a kontrollhoz ($135\pm 14 \mu\text{m/s}$) képest a fagyasztott csoportokban. A két mélyhűtési eljárás (műszalma: $39\pm 7 \mu\text{m/s}$, kriocső: $49\pm 4 \mu\text{m/s}$) összehasonlítás során azonban nem volt igazolható a különbség. Az egyenességre utaló LIN paraméter esetében a natív spermához ($72\pm 3\%$) képest nem volt szignifikáns különbség az 5 ml-es műszalma ($51\pm 19\%$) mélyhűtését követően. A 10 ml-es kriocső ($82\pm 6\%$) használata után azonban szignifikánsan magasabb értéket rögzítettem, összehasonlítva mind a natívval, mind a kisebb térfogatú eljárással (35. ábra A-C).

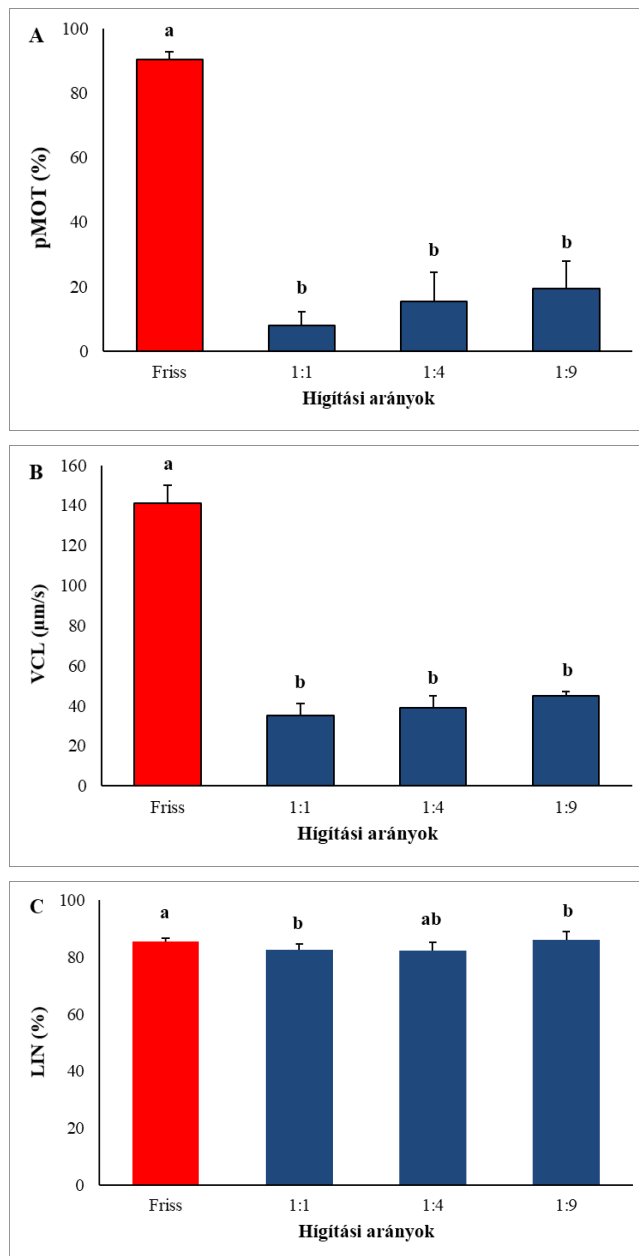




35. ábra (A-C). Az 5 ml-es műszalmában és 10 ml-es kriocsőben fagyasztott sperma pMOT, VCL, és LIN értékei ($N=6$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

A 10 ml-es kriocső optimális hígítási arányának vizsgálata

A 10 ml-es kriocsőben az optimális hígítási arány meghatározása során növekvő tendenciát mutató pMOT értékeket (friss: $90\pm 3\%$, 1:1: $8\pm 4\%$, 1:4: $15\pm 9\%$, 1:9: $19\pm 9\%$) rögzítettem felolvasztást követően. A mélyhűtési csoportok között azonban nem volt szignifikánsan igazolható különbség. Nem találtam továbbá statisztikailag igazolható eltérést a VCL (friss: $140\pm 10 \mu\text{m/s}$, 1:1: $35\pm 6 \mu\text{m/s}$, 1:4: $39\pm 6 \mu\text{m/s}$, 1:9: $45\pm 3 \mu\text{m/s}$), illetve a LIN (friss: $86\pm 1\%$, 1:1: $83\pm 1\%$, 1:4: $82\pm 3\%$, 1:9: $86\pm 3\%$) paraméterek között sem a hígítási arányokban (36. ábra. A-C). A friss kontroll csoporthoz képest a pMOT és VCL esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltam a felolvasztást követően. A LIN értékek esetében az említett tendencia csak az 1:1-es hígítás esetében jelentkezett.



36. ábra (A-C). A 10 ml-es kriocsőben fagyasztott sperma pMOT, VCL, és LIN értékei az eltérő hígítási arányok használatát követően ($N=6$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.1.2. Két féle hígító és különböző mélyhűtési módszerek összehasonlítása (motilitás vizsgálat)

A pontyfélék esetében már korábban eredményesen alkalmazott pér hígító egy esetet kivéve minden alkalommal agglutinációt eredményezett. Az újonnan alkalmazott csuka hígító esetében azonban egyetlen esetben sem tapasztaltam az ivarsejtek összetapadását.

Az 5 ml-es műszalma polisztirol dobozban történő mélyhűtése

Az 5 ml-es műszalmával végzett vizsgálatomban a friss ivartermékhez (94±2%) viszonyítva mind a pér (62±10%), mind pedig a csuka (64±8%) hígító esetében statisztikailag igazolható volt a különbség polisztirol dobozban a progresszív motilitásban. A VCL érték vizsgálata közben hasonló eredményt rögzítettem (friss: 117±16 µm/s, pér: 65±15 µm/s, csuka: 64±14 µm/s). A LIN paraméter esetében azonban nem volt igazolható a különbség (friss: 83±4%; pér: 85±2%; csuka: 85±2%). A mélyhűtési módszerek esetében egyik paraméter esetében sem találtam igazolható különbséget (12. táblázat).

12. táblázat. Az 5 ml-es műszalmában fagyasztott sperma pMOT, VCL, és LIN értékei pér és a csuka hígító használatát követően polisztirol dobozban (N=6). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik (P<0,05). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

CASA paraméterek	Friss	Pér hígító	Csuka hígító
pMOT (%)	94±2 ^a	62±10 ^b	64±8 ^b
VCL (µm/s)	117±16 ^a	65±15 ^b	64±14 ^b
LIN (%)	83±4 ^a	85±2 ^a	85±2 ^a

Az 5 ml-es műszalma fagyasztó berendezésben történő mélyhűtése

Az 5 ml-es műszalma CRF berendezésben történő mélyhűtés során a friss ivartermékhez (94±2%) viszonyítva mind a pér (54±8%), mind pedig a csuka (37±5%) hígító esetében statisztikailag igazolható volt a különbség. A két hígító között egyaránt igazolható volt az eltérés. A VCL érték vizsgálata során a friss mintához képest mindkét hígító szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott (friss: 117±16 µm/s, pér: 58±6 µm/s, csuka: 46±4 µm/s). A pér, valamint a csuka hígító alkalmazása mellett nem volt különbség. A LIN paraméter esetében szintén nem volt igazolható a különbség (friss: 83±4%; pér: 84±3%; csuka: 85±2%) (13. táblázat).

13. táblázat. Az 5 ml-es műszalmában fagyasztott sperma pMOT, VCL, és LIN értékei pér és a csuka hígító használatát követően CRF berendezésben (N=7). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik (P<0,05). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

CASA paraméterek	Friss	Pér hígító	Csuka hígító
pMOT (%)	94±2 ^a	54±8 ^b	37±5 ^c
VCL (µm/s)	117±16 ^a	58±6 ^b	46±4 ^b
LIN (%)	83±4 ^a	84±3 ^a	85±2 ^a

A 10 ml-es kriocsó fagyasztó berendezésben történő mélyhűtése

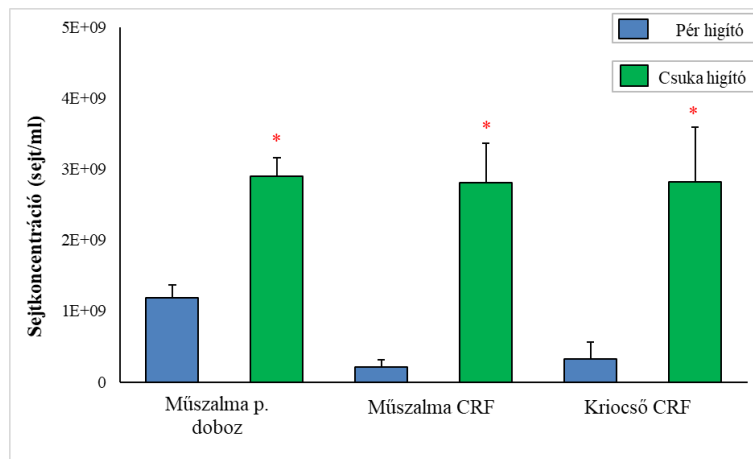
A 10 ml-es kriocsó programozható fagyasztó berendezésben történő mélyhűtés hatására a frisshez ($94\pm 2\%$) viszonyítva statisztikailag igazolhatóan alacsonyabb volt a sejtek motilitási értéke mind a pér ($25\pm 7\%$), mind a csuka ($27\pm 6\%$) hígító esetében. A két hígító között azonban nem volt szignifikáns különbség. Hasonló eredményt rögzítettem a sebességre utaló VCL paraméter mérésénél (friss: $117\pm 16 \mu\text{m/s}$; pér: $52\pm 3 \mu\text{m/s}$; csuka: $45\pm 3 \mu\text{m/s}$). A LIN értékek között nem tapasztaltam statisztikailag igazolható különbséget (friss: $83\pm 4\%$, pér: $86\pm 2\%$, csuka: $83\pm 3\%$) (14. táblázat).

14. táblázat. A 10 ml-es kriocsóban fagyasztott sperma pMOT, VCL, és LIN értékei pér és a csuka hígító használatát követően CRF berendezésben ($N=7$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

CASA paraméterek	Friss	Pér hígító	Csuka hígító
pMOT (%)	94 ± 2^a	25 ± 7^b	27 ± 6^b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	117 ± 16^a	52 ± 3^b	45 ± 3^b
LIN (%)	83 ± 4^a	86 ± 2^a	83 ± 3^a

4.1.3. Két féle hígító és különböző mélyhűtési módszerek összehasonlítása (sejtkoncentráció vizsgálata)

Kutatásomban nem volt szignifikáns különbség a frissen fejt ivartermék sejtkoncentrációjában a két hígító összehasonlítását követően. A friss ivartermék (pér: $2,54\cdot 10^{10}\pm 3,19\cdot 10^9$, csuka: $2,84\cdot 10^{10}\pm 6,79\cdot 10^8$) sejtkoncentrációjához viszonyítva alacsonyabb volt a mélyhűtés utáni sejtsűrűség. Pér hígító alkalmazásával minden mélyhűtési módszerrel alacsonyabb sejtszámot rögzítettem (5 ml műszalma polisztirol doboz: $1,18\cdot 10^9\pm 1,83\cdot 10^8$; 5 ml műszalma CRF: $2,15\cdot 10^8\pm 1,02\cdot 10^8$; 10 ml kriocsó CRF: $3,25\cdot 10^8\pm 2,39\cdot 10^8$), mint a csuka hígító használata során (5 ml műszalma polisztirol doboz: $2,9\cdot 10^9\pm 2,6\cdot 10^8$; 5 ml műszalma CRF: $2,81\cdot 10^9\pm 5,58\cdot 10^8$; 10 ml kriocsó CRF: $2,82\cdot 10^9\pm 7,74\cdot 10^8$) a különböző mélyhűtési módszerek alkalmazását követően (37. ábra).

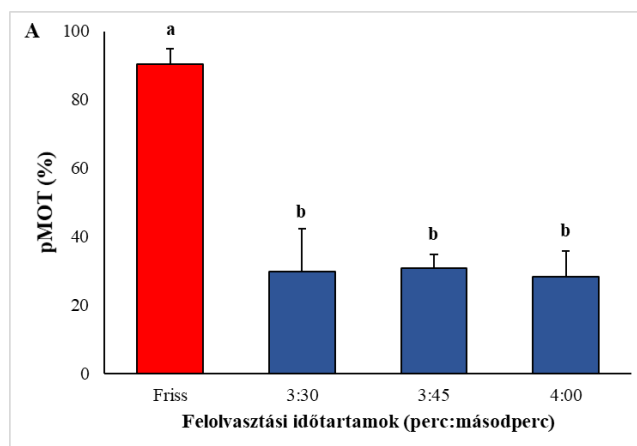


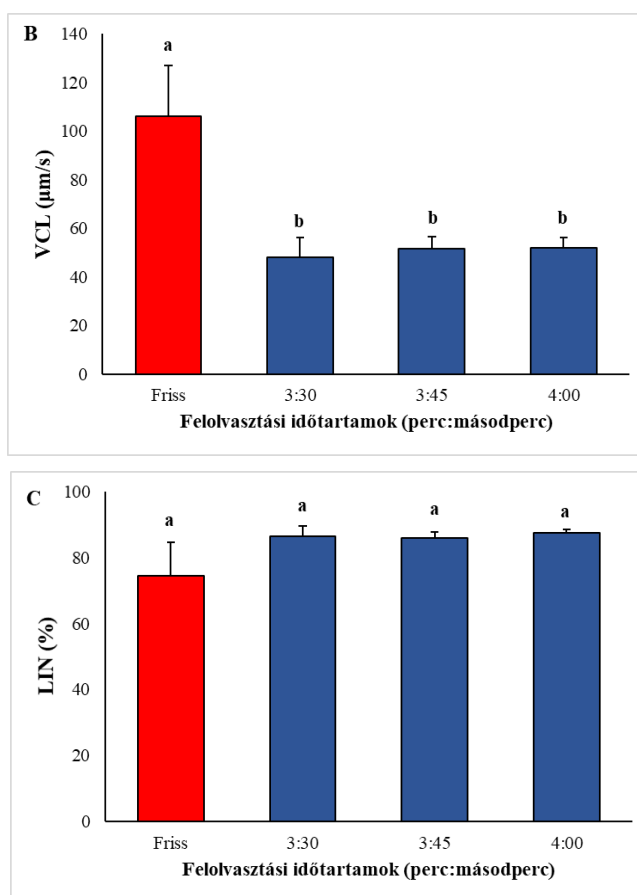
37. ábra. A sejtsűrűség összehasonlítása 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocsó fagyasztását követően polisztirol dobozban és CRF berendezésben, pér és csuka hígító alkalmazása mellett ($N=5$). A piros csillag szignifikáns eltérést jelöl a két hígító között adott mélyhűtési módszer alkalmazása során ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.1.4. Egységes felolvasztási időtartam meghatározása a 10 ml-es kriocsó, pér és csuka hígítók, valamint CRF alkalmazása esetén

A 10 ml-es kriocsó felolvasztási idejének meghatározása pér hígító használatát követően

A 10 ml-es kriocsó egységes felolvasztási idejének meghatározása során a friss ivartermékhez ($90\pm 5\%$) képest statisztikailag alacsonyabb motilitási értékeket rögzítettem. Nem tapasztaltam igazolható különbséget az időtartamok között a pMOT esetében a pér hígító használata során (3 perc 30 másodperc: $30\pm 12\%$, 3 perc 45 másodperc: $31\pm 4\%$, 4 perc: $28\pm 7\%$). A VCL értékeknél a friss csoporthoz képest szintén igazolható volt a különbség a mélyhűtést követően, azonban nem rögzítettem statisztikailag eltérő eredményt az időtartamok között (friss: $106\pm 21 \mu\text{m/s}$, 3 perc 30 másodperc: $48\pm 8 \mu\text{m/s}$, 3 perc 45 másodperc: $51\pm 5 \mu\text{m/s}$, 4 perc: $52\pm 4 \mu\text{m/s}$). A LIN értékeknél nem volt igazolható eltérés a csoportok esetében (friss: $75\pm 10\%$, 3 perc 30 másodperc: $86\pm 3\%$, 3 perc 45 másodperc: $86\pm 2\%$, 4 perc: $88\pm 1\%$) (38. ábra A-C).

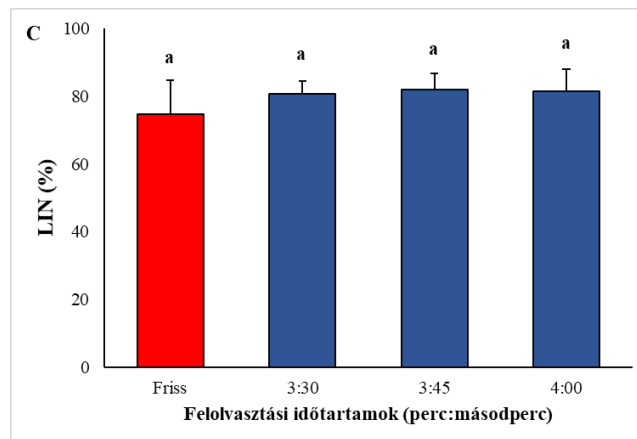
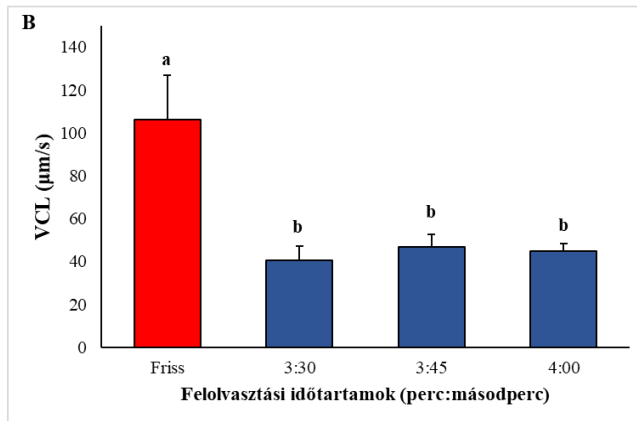
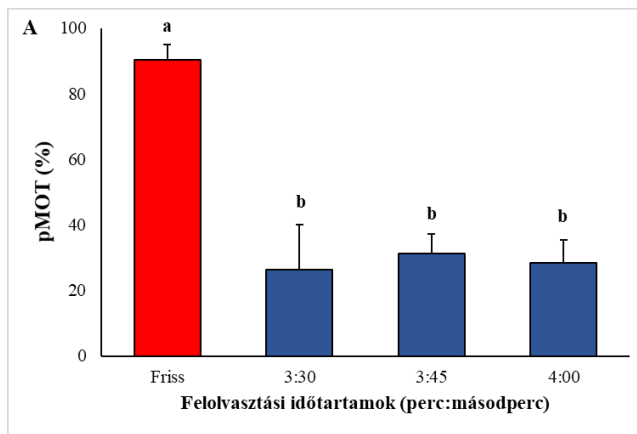




27. ábra (A-C). Három különböző felolvasztási időtartam összehasonlítása során mért pMOT, VCL, és LIN értékek a 10 ml kriocső, pér hígító és CRF berendezés alkalmazása mellett ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

A 10 ml-es kriocső felolvasztási idejének meghatározása csuka hígító használatát követően

A kísérletben a csuka hígító használatát követően hasonlóan a pér hígítóhoz a pMOT értékekben igazolható volt a csökkenés a friss ivartermékhez ($90\pm 5\%$) képest (3 perc 30 másodperc: $26\pm 14\%$, 3 perc 45 másodperc: $31\pm 6\%$, 4 perc: $28\pm 7\%$). A mélyhűtés hatására statisztikailag szignifikánsan csökkentek a mélyhűtött ivartermék VCL paraméterei (friss: 106 ± 21 µm/s, 3 perc 30 másodperc: 41 ± 7 µm/s, 3 perc 45 másodperc: 47 ± 6 µm/s, 4 perc: 45 ± 3 µm/s). A LIN értékek között nem volt igazolható különbség (friss: $75\pm 10\%$, 3 perc 30 másodperc: $81\pm 4\%$, 3 perc 45 másodperc: $82\pm 5\%$, 4 perc: $82\pm 7\%$) (39. ábra A-C). A különböző időtartamok között egyik paraméter esetében sem rögzítettem statisztikailag igazolható különbséget.

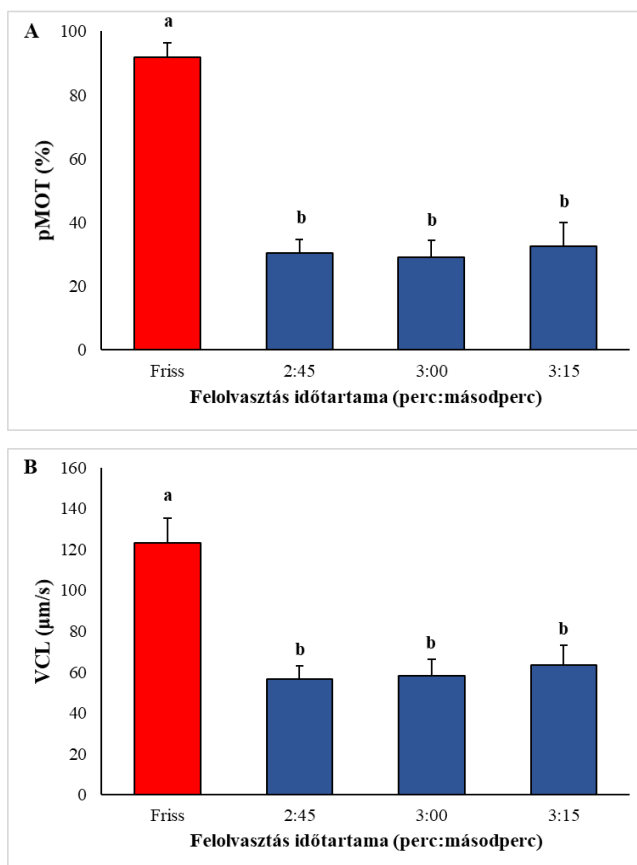


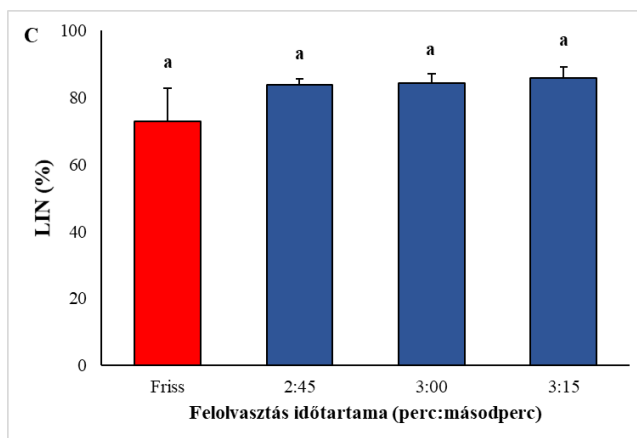
39. ábra (A-C). Három különböző felolvasztási időtartam összehasonlítása során mért pMOT, VCL, és LIN értékek a 10 ml kriocső, csuka hígító és CRF berendezés alkalmazása mellett ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.1.5. Az 5 ml-es kriocső felolvasztási idejének meghatározása 2 hígító és 2 fagyasztási módszer alkalmazása során

Polisztirol doboz, pér hígító

Az 5 ml-es kriocsőben történő mélyhűtés felolvasztási idejének meghatározása során a polisztirol dobozban történő mélyhűtést, valamint a pér hígító használatát követően minden esetben szignifikánsan alacsonyabb pMOT értéket rögzítettem a friss ivartermékhez ($92\pm 5\%$) viszonyítva (2 perc 45 másodperc: $30\pm 4\%$; 3 perc: $29\pm 5\%$; 3 perc 15 másodperc: $33\pm 7\%$). Az eltérő felolvasztási időtartamok között azonban nem volt statisztikailag igazolható különbség. A VCL értékek rögzítése során hasonló tendenciát tapasztaltam (friss: $123\pm 12\ \mu\text{m/s}$; 2 perc 45 másodperc: $56\pm 7\ \mu\text{m/s}$; 3 perc: $58\pm 8\ \mu\text{m/s}$; 3 perc 15 másodperc: $64\pm 10\ \mu\text{m/s}$). A LIN paraméterek között nem volt igazolható különbség (friss: $73\pm 10\%$; 2 perc 45 másodperc: $84\pm 2\%$; 3 perc: $84\pm 3\%$; 3 perc 15 másodperc: $86\pm 3\%$) (40. ábra A-C).

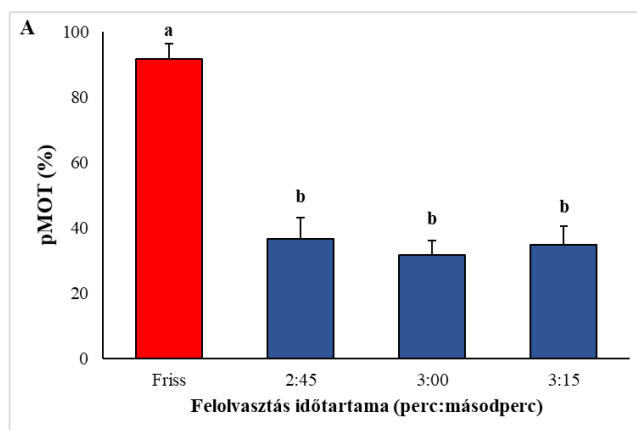


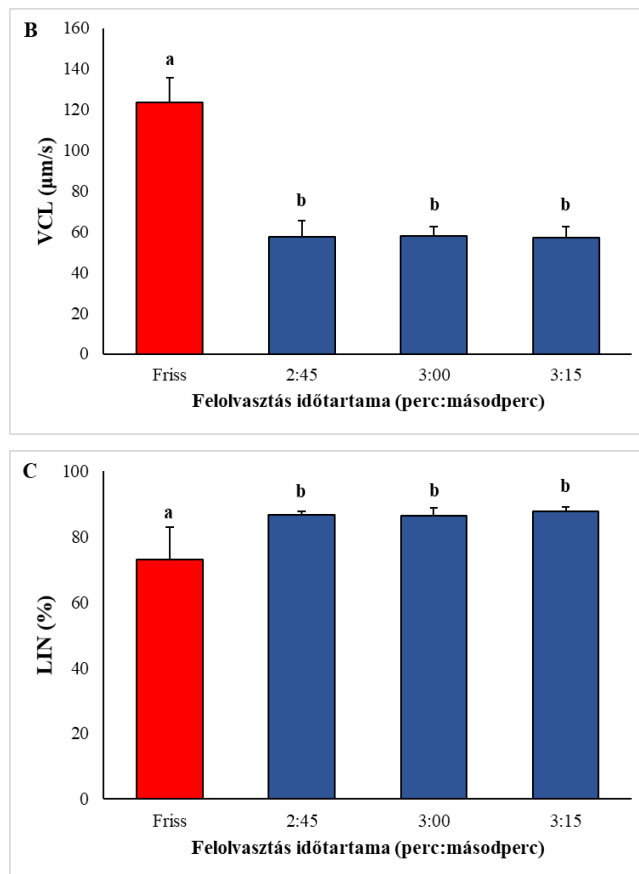


40. ábra (A-C). Három különböző felolvasztási időtartam összehasonlítása során mért pMOT, VCL, és LIN értékek az 5 ml kriocső, pér hígító és polisztirol doboz alkalmazása mellett ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

CRF berendezés, pér hígító

Az CRF berendezésben pér hígító felhasználásával, az eltérő felolvasztási időpontok között nem volt statisztikailag igazolható eltérés a pMOT-ban. A mélyhűtés azonban csökkentette a mozgó sejtek arányát (friss: $92\pm 5\%$, 2 perc 45 másodperc: $37\pm 6\%$, 3 perc: $32\pm 4\%$, 3 perc 15 másodperc: $35\pm 6\%$). A VCL esetében is hasonló tendencia mutatkozott (friss: $123\pm 12 \mu\text{m/s}$, 2 perc 45 másodperc: $58\pm 8 \mu\text{m/s}$, 3 perc: $58\pm 4 \mu\text{m/s}$, 3 perc 15 másodperc: $57\pm 6 \mu\text{m/s}$). Az LIN értékek esetében azonban a mélyhűtés hatására szignifikánsan magasabb értékeket rögzítettem (friss: $73\pm 10\%$, 2 perc 45 másodperc: $87\pm 1\%$, 3 perc: $86\pm 2\%$, 3 perc 15 másodperc: $88\pm 1\%$). Az eltérő felolvasztási időpontok között egyik esetben sem volt igazolható az eltérés (41. ábra A-C).

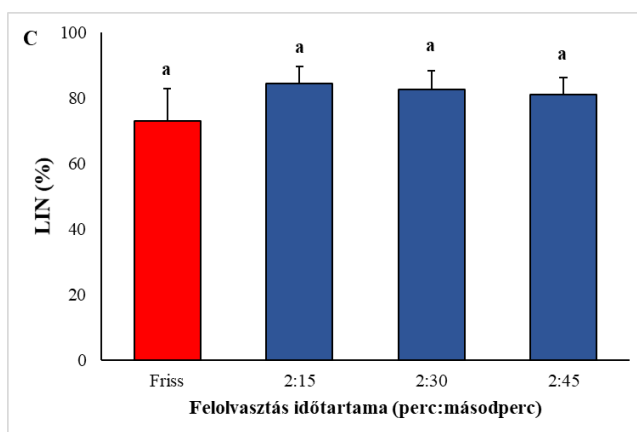
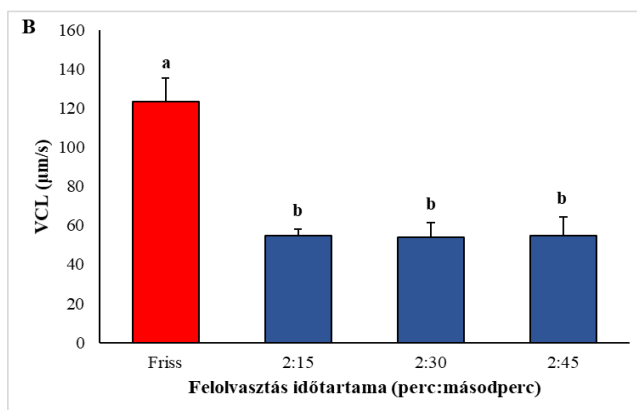
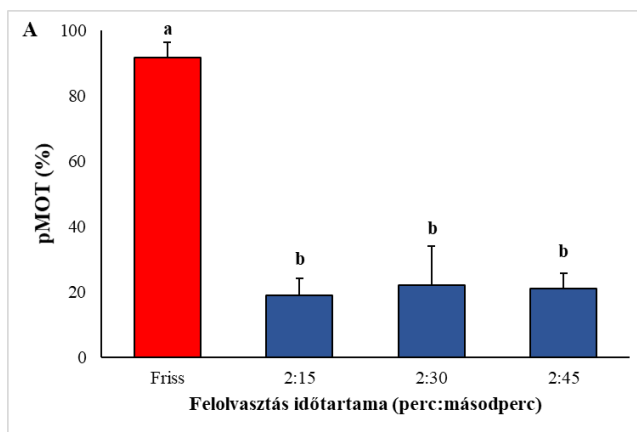




28. ábra (A-C). Három különböző felolvasztási időtartam összehasonlítása során mért pMOT, VCL, és LIN értékek az 5 ml kriocső, pér hígító és CRF berendezés alkalmazása mellett ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

Polisztirol doboz, csuka hígító

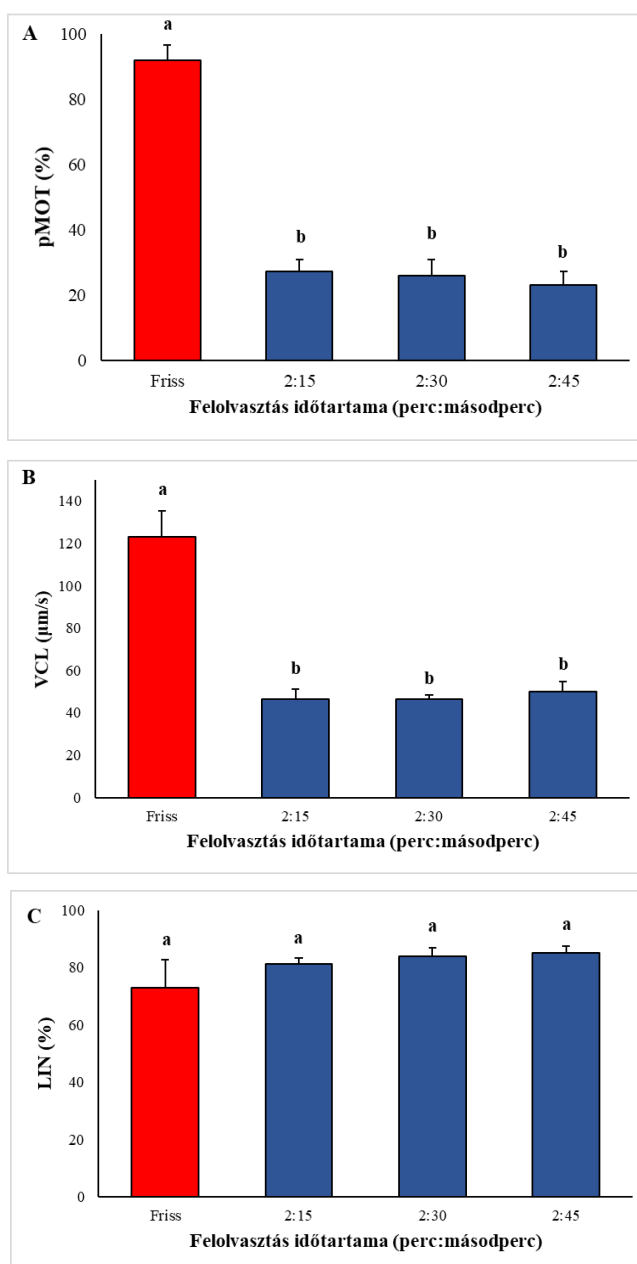
A polisztirol dobozban történő mélyhűtést, valamint csuka hígító használatát követően mind a pMOT (friss: $92\pm 5\%$, 2 perc 15 másodperc: $19\pm 5\%$, 2 perc 30 másodperc: $22\pm 12\%$, 2 perc 45 másodperc: $21\pm 5\%$), mind pedig a VCL (friss: 123 ± 12 $\mu\text{m/s}$; 2 perc 15 másodperc: 55 ± 3 $\mu\text{m/s}$; 2 perc 30 másodperc: 54 ± 7 $\mu\text{m/s}$; 2 perc 45 másodperc: 55 ± 10 $\mu\text{m/s}$) értékek esetében statisztikailag igazolható volt a különbség a natív ivartermékhez viszonyítva. A kezelési csoportok között azonban nem volt igazolható az eltérés. A LIN esetében nem volt jelentős különbség (friss: $73\pm 10\%$, 2 perc 15 másodperc: $84\pm 5\%$, 2 perc 30 másodperc: $83\pm 6\%$, 2 perc 45 másodperc: $81\pm 5\%$) egyik kezelés között sem (42. ábra A-C).



42. ábra (A-C). Három különböző felolvasztási időtartam összehasonlítása során mért pMOT, VCL, és LIN értékek az 5 ml kriocső, csuka hígító és polisztirol doboz alkalmazása mellett ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

CRF berendezés, csuka hígító

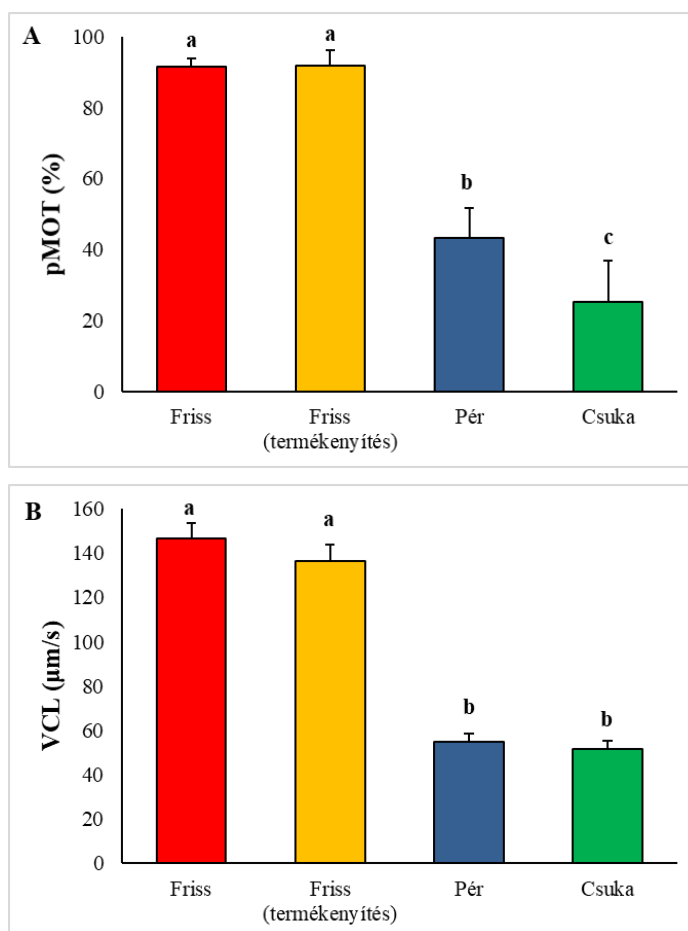
Az CRF berendezésben csuka hígítóval történő mélyhűtését követően a friss ivartermék motilitásához ($92\pm 5\%$) képest szignifikánsan alacsonyabb értékeket rögzítettem a felolvasztási időtartamok esetében (2 perc 15 másodperc: $27\pm 4\%$, 2 perc 30 másodperc: $26\pm 5\%$, 2 perc 45 másodperc: $23\pm 4\%$). A különböző időpontok között nem volt igazolható különbség. A fent említett tendencia jelentkezett a VCL paraméter megfigyelése során (friss: $123\pm 12 \mu\text{m/s}$, 2 perc 15 másodperc: $47\pm 5 \mu\text{m/s}$, 2 perc 30 másodperc: $46\pm 2 \mu\text{m/s}$, 2 perc 45 másodperc: $50\pm 5 \mu\text{m/s}$). A LIN értékeknél azonban nem tapasztaltam számottevő eltérést (friss: $73\pm 10\%$, 2 perc 15 másodperc: $81\pm 2\%$, 2 perc 30 másodperc: $84\pm 3\%$, 2 perc 45 másodperc: $85\pm 2\%$) (43. ábra A-C).

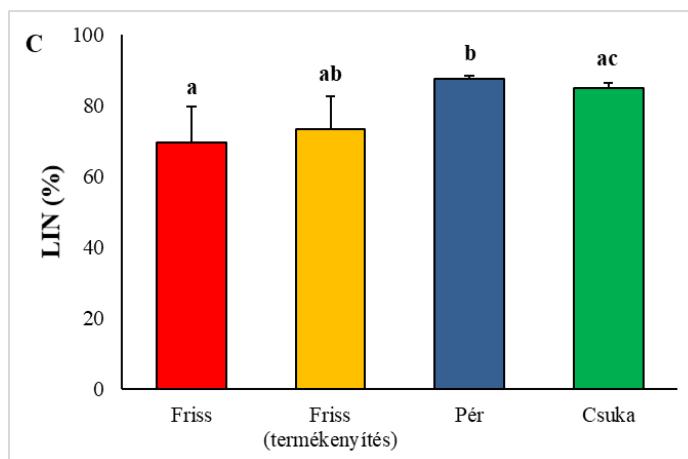


43. ábra (A-C). Három különböző felolvasztási időtartam összehasonlítása során mért pMOT, VCL, és LIN értékek az 5 ml kriocső, csuka hígító és CRF berendezés alkalmazása mellett ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.1.6. A nagy mennyiségű (10 ml-es kriocső) mélyhűtött sperma keltetőházi szaporítás során történő alkalmazása

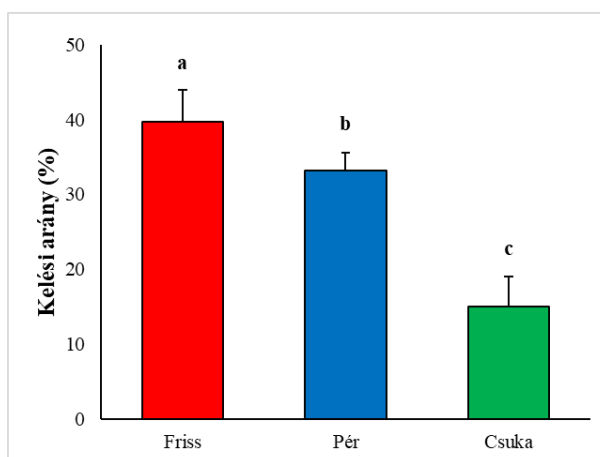
Kísérletemben a fejest követően és közvetlen a termékenyítés pillanatában is ellenőriztem a natív ivartermék motilitását, melyek hasonlóan magas értékeket mutattak (friss: $91\pm 2\%$; friss termékenyítés: $92\pm 2\%$). A két alkalmazott hígító esetében statisztikailag igazolhatóan alacsonyabb pMOT értéket rögzítettem a felolvasztást követően mindkét friss csoporthoz viszonyítva. A pér ($43\pm 8\%$), valamint a módosított csuka ($25\pm 12\%$) hígító alkalmazása mellett szintén szignifikánsan eltérő pMOT értéket mértem. A VCL esetében a fent említett tendencia mutatkozott (friss: $147\pm 7\ \mu\text{m/s}$, friss termékenyítés: $136\pm 7\ \mu\text{m/s}$, pér: $55\pm 4\ \mu\text{m/s}$, módosított csuka: $52\pm 4\ \mu\text{m/s}$). Ebben az esetben azonban a fagyasztott csoportok között nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés. A LIN paraméter esetében a pér hígító ($88\pm 1\%$) szignifikánsan magasabb értéket eredményezett összehasonlítva a frissel ($70\pm 10\%$), illetve a csuka hígítóval ($85\pm 1\%$). A termékenyítés pillanatában mért friss sperma ($73\pm 9\%$) nem különbözött statisztikailag igazolhatóan egyik csoporttól sem. (44. ábra A-C).





44. ábra (A-C). A fagyasztott spermával történő szaporítás pMOT, VCL és LIN eredményei 10 ml-es kriocső pér, valamint csuka hígító, CRF berendezés használata során ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

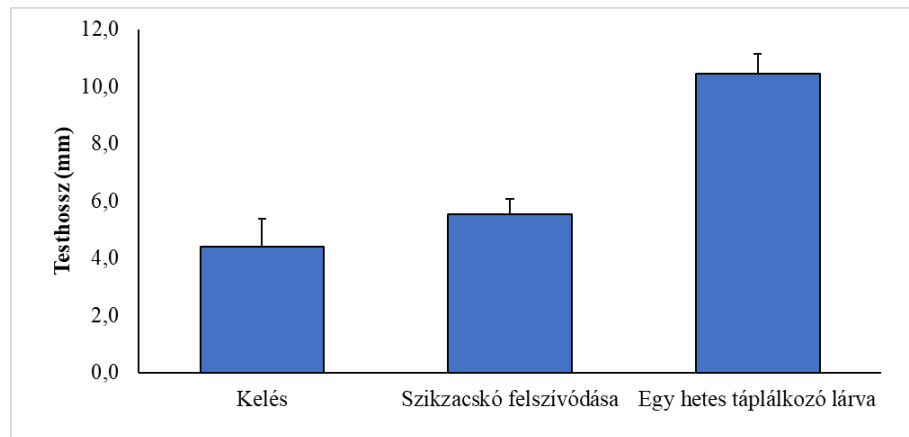
A szaporítást követően, a kelési arány meghatározása során a kezelések hatására statisztikailag igazolható csökkenést tapasztaltam összehasonlítva a natív spermával ($40\pm 4\%$). Továbbá a kezelési csoportok között is igazolható különbséget rögzítettem (pér: $33\pm 2\%$; csuka: $15\pm 4\%$) (45. ábra).



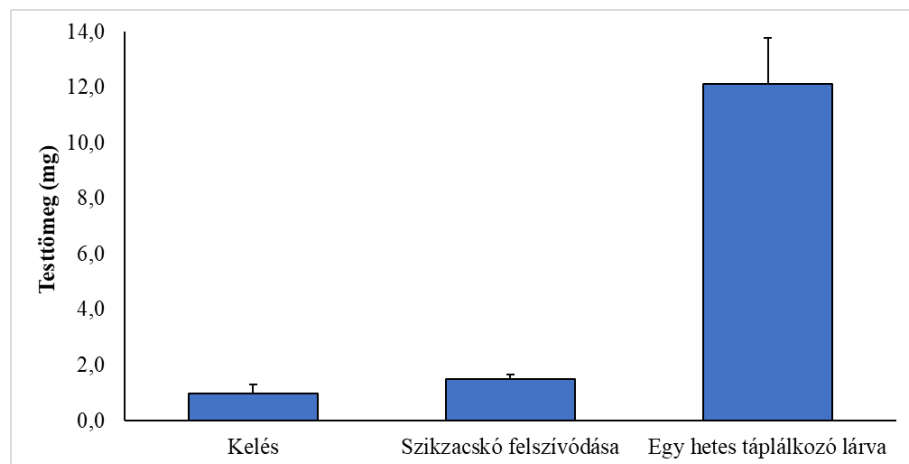
45. ábra. A kétféle hígító összehasonlítása során, 10 ml-es kriocső és CRF felhasználása mellett rögzített kelési arányok ($N=5$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.1.7. Intenzív lárvanevelés friss spermával történő szaporítást követően

Eredményeim alapján a frissen kelt sudár ponty lárvák testhossza $4,4 \pm 1$ mm (46. ábra), a testtömegük pedig $1,0 \pm 0,3$ mg (47. ábra) volt. A szikzacskó felszívódását követően az átlagos testhossz $5,5 \pm 0,5$ mm-re (46. ábra), az átlagos testtömeg pedig $1,5 \pm 0,1$ mg-ra növekedett (47. ábra). Az egy hetes táplálkozó lárvák átlagos testhossz értéke $10,5 \pm 0,7$ mm (46. ábra), míg testtömeg értéke $12,1 \pm 1,7$ mg volt (47. ábra).

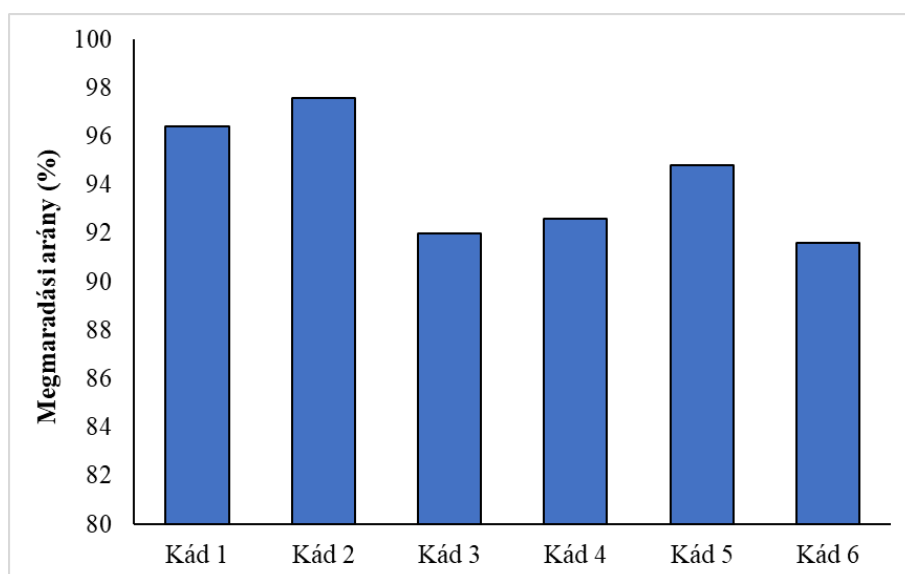


46. ábra. A 3 időpont során rögzített átlagos testhossz értékek ($N=120$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.



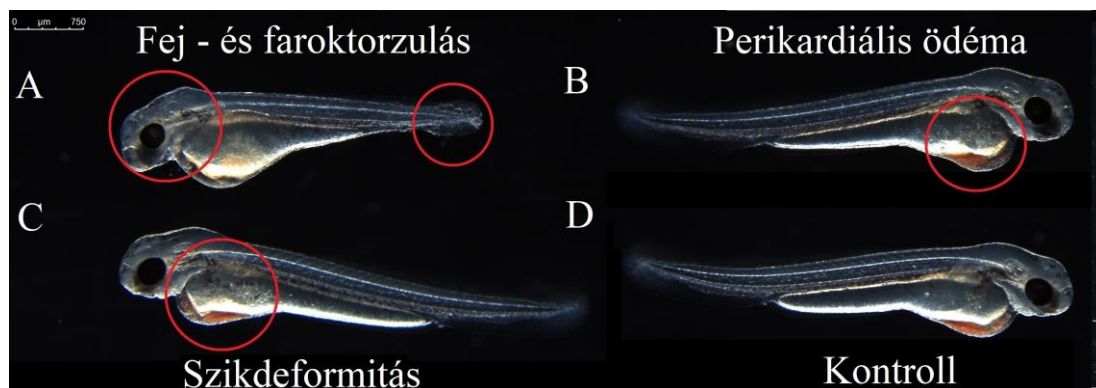
47. ábra. A 3 időpont során rögzített átlagos testtömeg értékek ($N=120$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

A vizsgálat befejeztével a lárvák átlagos megmaradásának aránya $94\pm 2\%$ volt (48. ábra).



48. ábra. A megmaradás aránya a különböző vizsgálati kádakban ($N=2585$).

A lárvamorfológiai vizsgálatok során nem tapasztaltam számottevő mennyiségű elváltozást a vizsgált egyedeknél. Adott egyedben egyszerre több alaktani eltérés is előfordult (49. ábra). Az egyedeken elvégzett lárvamorfológiai vizsgálatok részletes eredményeit a 15. táblázat foglalja össze.

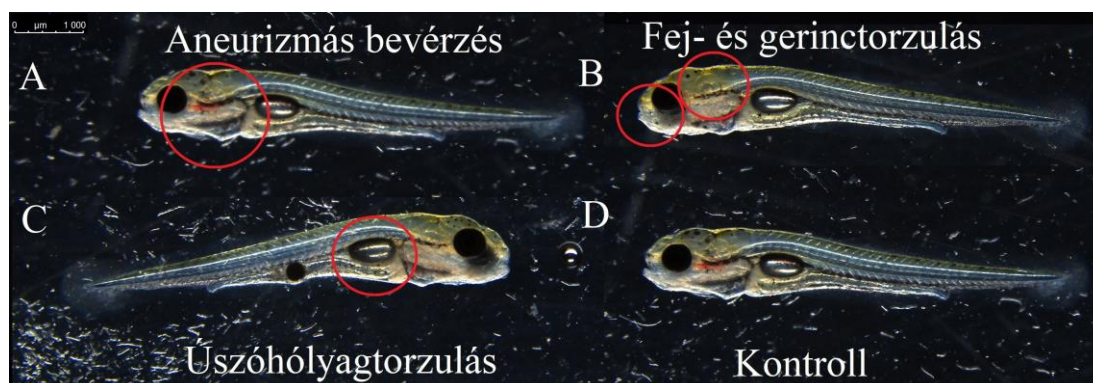


49. ábra (A-D). A kelést követő lárvamorfológiai vizsgálat során talált elváltozások. A piros kör jelzi a rögzített elváltozásokat az egyedeken ($N=60$). A ábra: fej (bal oldali kör) és fark torzulás (jobb oldali kör); B ábra: perikardiális ödéma; C ábra: szikdeformitás; D ábra: kontroll (Fotó: Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre).

15. táblázat. A kelést követően megfigyelt lárvamorfológiai elváltozások ($N=50$).

Morfológiai elváltozás	Egyedszám (db)
Görbült test	0
Torz farokfejlődés	5
Szikdeformitás	1
Fejdeformitás	5
Ödéma	4
Úszóhólyag torzulás	0
Aneurizmás bevérzés	0
Összesen	15

A szikzacskó felszívódását (táplálkozó lárvaszakasz kezdete) követően csekély számban rögzítettem morfológiai elváltozást (50. ábra). Az egyedeken elvégzett lárvamorfológiai vizsgálatok részletes eredményeit a 16. táblázat foglalja össze.

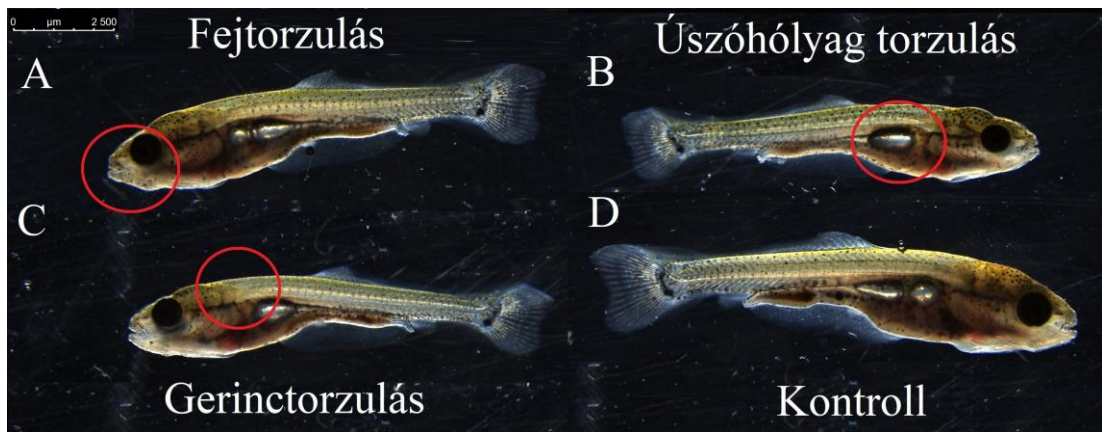


50. ábra (A-D). A szikzacskó felszívódását követően megfigyelt lárvamorfológiai elváltozások. A piros kör jelzi a rögzített elváltozásokat az egyedeken ($N=60$). A ábra: aneurizmás bevérzés; B ábra: fej (bal oldali kör) és gerincatorzulás (jobb oldali kör); C ábra: úszóhólyag torzulás; D ábra: kontroll (Fotó: Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre).

16. táblázat. A szikzacskó felszívódását követően megfigyelt lárvamorfológiai elváltozások ($N=50$).

Morfológiai elváltozás	Egyedszám (db)
Görbült test	2
Torz farokfejlődés	0
Szikdeformitás	0
Fejdeformitás	1
Ödéma	0
Úszóhólyag torzulás	1
Aneurizmás bevérzés	1
Összesen	5

Az egy hetes táplálkozó lárvaszakasz időpontban (10 napos lárva) végzett morfológiai vizsgálat során csekély számú elváltozás volt megfigyelhető (51. ábra). Az egyedeken elvégzett lárvamorfológiai vizsgálatok részletes eredményeit a 17. táblázat foglalja össze.



51. ábra (A-D). Az egy hetes táplálkozó lárva korban megfigyelt lárvamorfológiai elváltozások. A piros kör jelzi a rögzített elváltozásokat az egyedeken ($N=60$). A ábra: fejtorzulás; B ábra: úszóhólyag torzulás; C ábra: gerinctorzulás; D ábra: kontroll (Fotó: Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre).

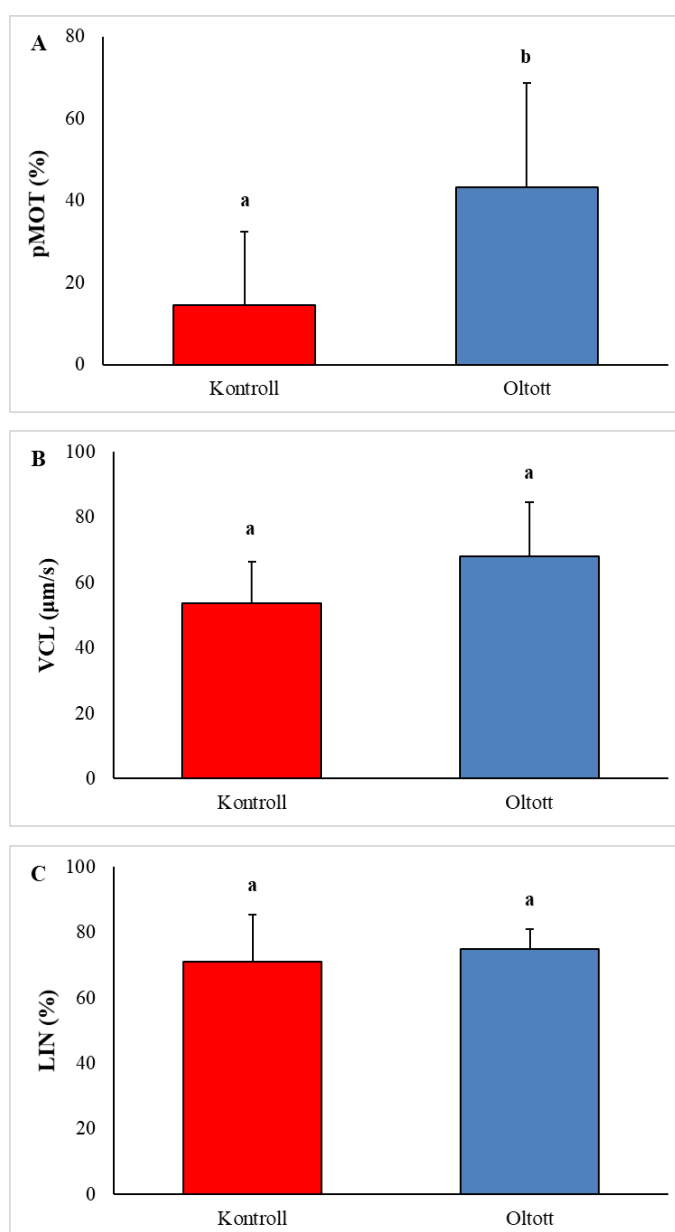
17. táblázat. Az egy hetes táplálkozó lárva korban megfigyelt lárvamorfológiai elváltozások ($N=50$).

Morfológiai elváltozás	Egyedszám (db)
Görbült test	2
Torz farokfejlődés	0
Szikdeformitás	0
Fejdeformitás	2
Ödéma	0
Úszóhólyag torzulás	1
Aneurizmás bevezés	0
Összesen	5

4.2. A hévízi törpenövésű magyar vadponton elvégzett vizsgálatok eredményei

4.2.1. A spermáció terepi körülmények között történő indukciója

A vizsgálatomban kialakított két kezelési csoport fejését követően szignifikáns különbséget találtam a progresszív motilitásban (Oltott csoport: $43 \pm 25\%$, Kontroll: $15 \pm 18\%$). A VCL (Oltott: $68 \pm 16 \mu\text{m/s}$, Kontroll: $54 \pm 13 \mu\text{m/s}$), valamint a LIN értékek között (Oltott: $75 \pm 6\%$, Kontroll: $71 \pm 14\%$) nem találtam statisztikailag igazolható különbséget (52. ábra A-C).



52. ábra (A-C). A vadon befogott (terepi körülmények között oltott) hévízi vadponton tejesek spermájának pMOT, VCL, és LIN értékei ($N=8-8$). A különböző betűk a szignifikáns eltérést jelölik ($P < 0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.2.2. A spermiáció növekvő hormonadagú zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő indukciója

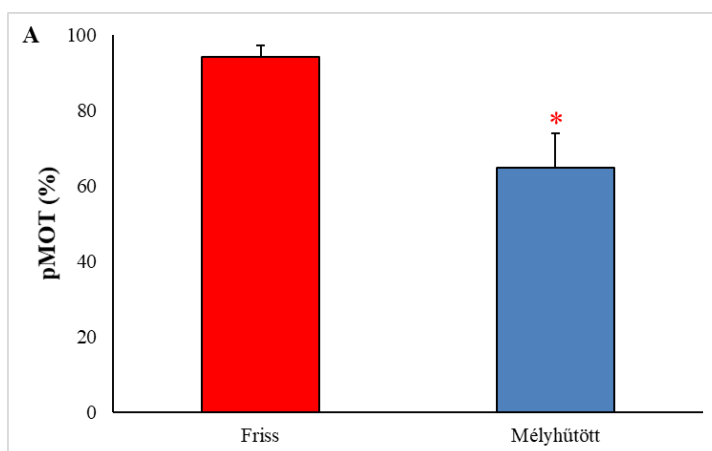
Kísérletemben a halfiziológiás oldattal (kontroll) oltott egyedek nem adtak értékelhető mennyiségű ivarterméket. A növekvő hormondózisú oltott csoport hat egyedétől sikeresen fejtem ivarterméket. A sperma minőségének ellenőrzése során magas pMOT ($72\pm 8\%$), mérsékelt VCL ($93\pm 12 \mu\text{m/s}$), illetve szintén magas LIN értékeket ($88\pm 2\%$) rögzítettem (18. táblázat).

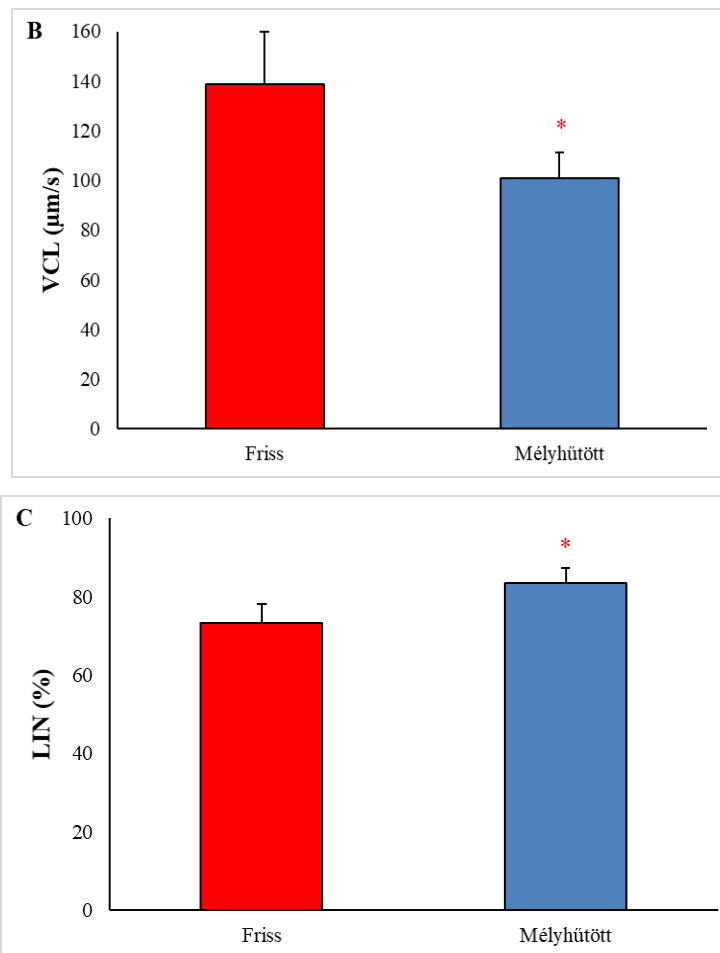
18. táblázat. A kezelt és a kontroll hévízi vadponty tejes csoportok spermájának pMOT, VCL, és LIN értékei ($N=6-6$) a növekvő hormonadagú oltás hatására. A táblázatban átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

CASA paraméterek	Kezelt csoport	Kontroll csoport
pMOT (%)	72 ± 8	N. A.
VCL ($\mu\text{m/s}$)	93 ± 12	N. A.
LIN (%)	88 ± 2	N. A.

4.2.3. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben tartott egyedek spermiációjának hormonális indukciója és a kinyert ivartermék mélyhűtése

Kísérletemben összesen hét kezelt tejestől tudtam sikerrel ivarterméket fejni. Az ivartermék pMOT értéke szignifikánsan csökkent a mélyhűtés hatására (friss: $94\pm 3\%$; 0,5 ml-es műszalma: $65\pm 9\%$). Hasonlóan igazolható volt a csökkenés a VCL (friss: $139\pm 21 \mu\text{m/s}$; 0,5 ml-es műszalma: $101\pm 10 \mu\text{m/s}$) értékek között a felolvasztást követően. A mélyhűtést követően a LIN paramétert esetében a frissel ($73\pm 5\%$) való összehasonlítás során szignifikánsan nagyobb értéket rögzítettem a 0,5 ml-es műszalma esetében ($84\pm 4\%$) (53. ábra A-C).



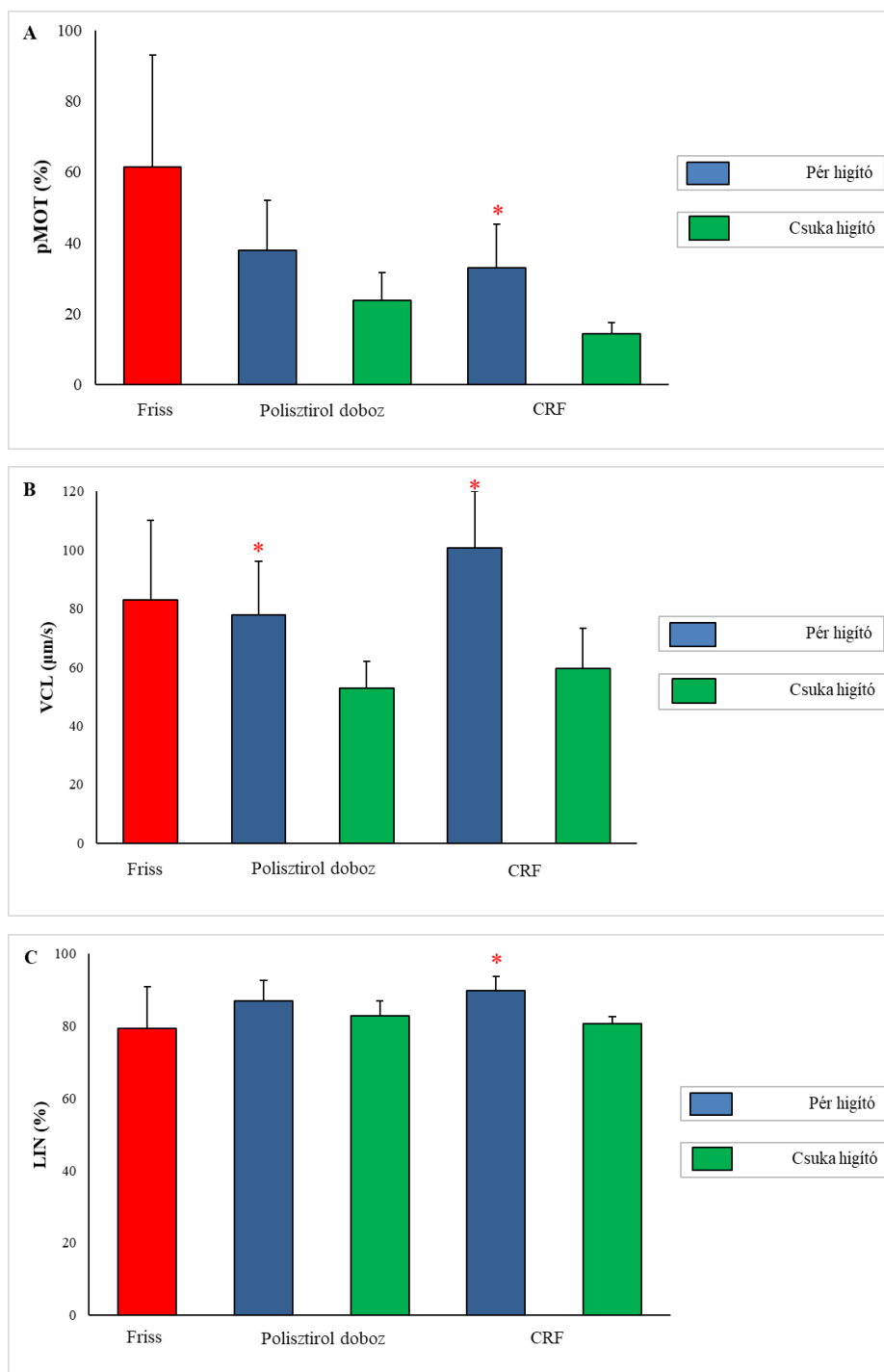


53. ábra (A-C). A recirkulációs rendszerben (növekvő hormondózisú oltás alkalmazása mellett) tartott tejes egyedek spermájának pMOT, VCL, és LIN értékei 0,5 ml-es műszalmában és polisztirol dobozban történő mélyhűtést követően ($N=7$). A piros csillag szignifikáns eltérést jelöl az oszlopok között ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.2.4. Két féle hígító (pér, csuka) alkalmazásának összehasonlítása az agglutináció kiküszöbölésének érdekében a fagyasztás során

A pér hígító esetében minden mintánál agglutináció volt megfigyelhető a felolvasztást követően. Az említett jelenség a csukánál nem jelentkezett. Vizsgálatomban a friss ivartermék pMOT ($61\pm 32\%$), VCL ($83\pm 27\mu\text{m/s}$) és LIN ($79\pm 12\%$) értékeihez viszonyítva nem találtam szignifikánsan igazolható eltérést a használt hígítók (pér, csuka) és a mélyhűtési módszerek (polisztirol doboz, CRF) alkalmazása között. A sejtek progresszív motilitásának vizsgálata során a polisztirol doboz használatát követően nem volt igazolható különbség a használt hígítók között (pér: $38\pm 14\%$, csuka: $24\pm 8\%$). A programozható mélyhűtő berendezés használatát követően azonban a pér hígító esetében ($33\pm 12\%$) szignifikáns magasabb eredményt rögzítettem összehasonlítva a csuka hígítóval ($14\pm 3\%$). A mért VCL értékek között a polisztirol dobozban statisztikailag igazolhatóan magasabb eredményt rögzítettem a pér hígító ($78\pm 18\mu\text{m/s}$) használatát követően összehasonlítva a csuka hígítónál ($53\pm 9\mu\text{m/s}$) mért értékekkel. Hasonló eredményt rögzítettem a CRF berendezés

használata után a minták mért VCL értékeiben (pér: $101 \pm 19 \mu\text{m/s}$; csuka: $60 \pm 14 \mu\text{m/s}$). A LIN paraméterek összehasonlítása során nem volt szignifikáns különbség a polisztirol doboz alkalmazást követően (pér: $87 \pm 6\%$, csuka: $83 \pm 4\%$). Azonban a CRF berendezés használata alkalmával a pér hígító ($90 \pm 4\%$) esetében statisztikailag igazolhatóan magasabb eredményt mértem összehasonlítva a csuka hígítóval ($81 \pm 2\%$) (54. ábra A-C).



54. ábra (A-C). A különféle hígítók és mélyhűtési módszerek használatát követő pMOT, VCL és LIN értékek összehasonlítása a hévízi vadpontyok esetében ($N=5$). A piros csillag szignifikáns eltérést jelöl két hígító között adott fagyasztási csoporton belül ($P < 0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

4.2.5. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő szaporítás

Vizsgálatomban a Zuger-üvegbe kihelyezett ikratételek fejlődése az inkubáció során megállt. Mindösszesen egyetlen lárva kelt ki (55. ábra).



55. ábra. Az egyetlen kikelt hévízi vadponty ivadék (15 nap) az intenzív recirkulációs rendszerben (Fotó: Saját felvétel).

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

5.1. Következtetések

5.1.1. A balatoni sudár ponty esetében elért eredmények következtetései

A hivatalosan elismert tájfajta esetében elsőként adaptálni kívántam a nagy kapacitású mélyhűtést polisztirol dobozban és CRF berendezésben. A fagyasztási kapacitás növelésének fejlesztésével a módszerek könnyebben adaptálhatóvá válnak a gazdaságok keltetőházi technológiája számára (nagy szalma vagy kriocső átmérőgyors töltés, könnyebb adagolhatóság, felolvasztási idő csökkentése) (CABRITA et al. 2010; HU et al. 2011). A szakirodalmi adatok alapján számos publikációban alkalmazták sikeresen a szintén nagy mennyiségű 5 ml-es kriocsőben történő mélyhűtési eljárását. CABRITA et al. (2005) aranydurbincs (*Sparus aurata*), LIU et al. (2015) laposhal (*Paralichthys dentatus*), BEIRÃO et al. (2020) *Anarhichas minor* esetében számoltak be a módszer alkalmazásáról. Előkísérletemben sikeresen mélyhűtöttem a sudár ponty spermát 5 ml-es műszalmában, polisztirol dobozban. A vizsgálatban a pér hígítót alkalmaztam, mely eredményesnek bizonyult korábban már több pontyféle esetében (BERNÁTH et al. 2016a; BERNÁTH et al. 2017; BERNÁTH et al. 2018). Eredményesen alkalmaztam továbbá a 10 ml kapacitású kriocsövet a sudár ponty esetében CRF berendezés használata mellett. Fontos megemlíteni, hogy a nagy mennyiségű mélyhűtés hatására (5 ml műszalma: $5\pm 2\%$; 10 ml kriocső: $25\pm 8\%$) a felolvasztást követően csökkent a minták progresszív motilitása összehasonlítva a friss ivartermék ($94\pm 4\%$) minőségével. HORVÁTH et al. 2007-ben ugyan csak 5 ml-es műszalma használata során magas ($83\pm 22\%$) mozgási értékeket rögzített ponty esetében polisztirol dobozban való mélyhűtést követően és cukor alapú hígítót (350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8,0) alkalmazva. Kapott eredményeim jól mutatták, hogy a fagyasztási körülmények optimalizálásának hiányában a sejtek mozgása elmaradt a korábban közölt irodalmi adattól. Számos kutatás számol be róla, hogy a mélyhűtési folyamatok egységesítése (fajspecifikus hígítók, megfelelő krioprotektáns anyagok arányának pontos alkalmazása) a pontyfélék esetében kulcsfontosságú (BERNÁTH 2016; HORVÁTH et al. 2003; IRAWAN et al. 2010; LAHNSTEINER et al. 2003). Az elmúlt években számos publikáció született a megfelelő arányú - fagyasztást megelőző - hígítás kidolgozására vonatkozóan. CABRITA et al. (2001b) szivárványos pisztráng ivartermékének mélyhűtése során 1:3 hígítási arány használata mellett magas motilitási eredményeket írtak el különböző műszalmák esetében (0,5 ml: 58%;

1,8 ml: 43%; 5 ml: 61%). LAHNSTEINER et al. (2003) azonban negatív hatást rögzített a sperma 1:7-es hígítási arányánál a kűsz (*Chalcalburnus chalcoides*) halfajban. CABRITA et al (2005) aranydurbincson végzett 5 ml-es kriocsőben történő mélyhűtés során három különböző hígítási aránya mellett (1:6; 1:10; 1:20) minden esetben szignifikánsan alacsonyabb mozgási értékeket rögzítettek a kezelések hatására a friss mintával történő összehasonlítás során (1:6: 70±5%; 1:10: 64±2%; 1:20: 58±8%). Kiemelték, hogy az 1:10-es, illetve az 1:20-as hígítási arány esetében nem tudták sikeresen végrehajtani a kísérletet. BERNÁTH et al. (2016b) rögzített adataik alapján a 3 ml ivartermék mélyhűtése (67 db 0,5 ml-es műszalma) használata során az 1:10-es hígítási arány volt a legoptimálisabb európai sügér (*Perca fluviatilis*) esetében. Eredményeikben a felolvasztást követően 72±14% motilitást eredményt mértek. Tapasztalataim, illetve az irodalmi adatok alapján a ponty esetében a legmegfelelőbb az 1:9 hígítási arány. A korábban leírt felolvasztás után jelentkező agglutináció kiküszöbölésére terveztem alkalmazni egy eredetileg csuka fajra kidolgozott hígítót. Az oldatban a cukor-ion összetevők megfelelő arányú egyensúlyban kerültek bekeverésre. Alkalmazása révén ki akartam küszöbölni a felolvasztás után jelentkező agglutinációs (sejtek összetapadása) jelenséget. Kísérleteimben minden esetben hozzávetőlegesen 50%-os agglutinációt tapasztaltam a minták felolvasztását követően a pér hígító esetében. A megfigyelt összetapadást számos kutatás során leírták már a szakirodalomban (BERNÁTH et al. 2016a, 2017; HORVÁTH et al. 2003; IRAWAN et al. 2010). Az elmúlt két évtizedben számos publikáció említi, hogy a pontyfélék esetében a hígítóknak kulcsfontosságú szerepük van a sejtek agglutinációjában, illetve a mélyhűtés eredményességében (HORVÁTH et al. 2003; IRAWAN et al. 2010; LUJIC et al. 2017; MARINOVIĆ et al. 2017). A megfelelő hűtőmedium tervezésénél azonban a cukor felhasználása kulcsfontosságú a ponty sperma sikeres fagyasztásában (HORVÁTH et al 2003; BERNÁTH 2016; BERNÁTH et al. 2016a; MARINOVIĆ et al. 2017). BOONTHAI et al. (2016) kimutatták, hogy két kórokozó baktérium (*Aeromonas hydrophila* és *Pseudomonas fluorescens*) jelenléte a *Barbonymus gonionotus* halfaj esetében agglutinációt eredményezett, valamint a spermiumok mozgásának csökkenéséhez vezetett felolvasztást követően. A sejtek összetapadásáért valószínűsíthetően a cukor tartalom volt a felelős, mely a patogén baktériumok táptalajaként szolgált. Az említett okok miatt is fontos a glükóz mennyiség optimalizációja ponty faj esetében. Kísérletemben a védőanyaghoz adott BSA elősegíthette a sejtek további védelmét a fagyasztási, illetve a felolvasztási folyamat során, melyet CABRITA et al. szintén leírtak 2005-ben. Ki kell emelnem, azonban,

hogy a két eltérő összetételű hígító használata során nem volt szignifikáns különbség az 5 ml-es műszalma polisztirol dobozban (pér: $62\pm 10\%$; csuka: $64\pm 8\%$) és a programozható mélyhűtő berendezésben 10 ml-es kriocső (pér: $25\pm 7\%$; csuka: $27\pm 6\%$) esetében. Azonban igazolhatóan volt eltérés a CRF berendezés használatát követően 5 ml-es műszalma estében (pér: $54\pm 8\%$; csuka: $37\pm 5\%$) a sejtek progresszív motilitásánál. Utóbbi eredmény esetében, hipotézisem szerint pér hígító alkalmazásánál a mesterséges szelekció (mélyhűtés) érvényesült. Hatására csupán a legjobban úszó vagy legéletképesebb sejtek jelentek meg a felolvasztást követően a minta nem agglutinálódott részében (KRÓL et al. 2018). Eredményeim egyértelműen igazolják, hogy mind a pér, mind pedig a csuka hígító egyaránt alkalmas a nagy mennyiségű sperma mélyhűtés elvégzéséhez. Kutatásomban vizsgáltam továbbá az agglutináció mértékének hatását a sejtek koncentrációjára vonatkozóan a két hígító összehasonlítása során. Vizsgáltam az 5 ml-es műszalma polisztirol dobozban és CRF berendezésben, valamint a 10 ml-es kriocső programozható fagyasztóban történő mélyhűtését. Vizsgálatom során minden esetben a csuka hígító egységes sejtuszpenziót eredményezett, míg a pér hígító hatására a sperma agglutinálódott. A csuka hígítóval való mélyhűtés hatására minden általam használt mélyhűtési módszernél szignifikánsan magasabb sejtkoncentrációt rögzítettem. Fontos megemlítenem, hogy a keltetőházi gyakorlatban fontos, egy jól alkalmazható és pontosan leírt teljeskörű fajspecifikus mélyhűtési program kidolgozása (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2017). A szaporítási gyakorlat számára a megfelelő sejtszám lehetővé teszi egy, a sudár pontyban jól alkalmazható termékenyítési egység (szalma vagy kriocső/gramm ikra) kidolgozását. Az említett arányt több ízben sikeresen alkalmazták a szürke harcsa fajban nagy mennyiségű ikra fagyasztott spermával történő termékenyítése során. BOKOR et al. 2010-ben 5 ml-es műszalmával termékenyítettek meg 40-200g-os ikratételket. Vizsgálatukban a friss spermával ($50\pm 6-94\pm 6\%$) való összehasonlítás során nem volt szignifikáns különbség a mélyhűtött csoportok kelési arányához viszonyítva ($50\pm 3-95\pm 2\%$). BOKOR et al. 2019-ben továbbá 5-ml-es műszalmával és 10 ml-es kriocsővel végeztek termékenyítési kísérletet polisztirol dobozban és CRF berendezésben történő mélyhűtést követően. Eredményeikben a friss spermával történő összehasonlítás során a mélyhűtés hatására csökkent a sejtek motilitása (friss: $89\pm 3\%$, 5 ml-es műszalma polisztirol doboz: $50\pm 9\%$, 5 ml-es műszalma CRF: $53\pm 12\%$, 10 ml-es kriocső CRF: $52\pm 7\%$). Termékenyítést követően azonban nem rögzítettek szignifikáns különbséget a kezelések és a friss kontroll csoport között a kelési arány meghatározása során (friss: $68\pm 4\%$, 5 ml-es műszalma

polisztirol doboz: $75\pm 5\%$, 5 ml-es műszalma CRF: $72\pm 3\%$, 10 ml-es kriocső CRF: $66\pm 6\%$). A felolvasztási sebesség szisztematikus optimalizálása kulcsfontosságú tényező a 10 ml-es kriocső mélyhűtési protokolljának kidolgozása esetében (FASZER et al. 2006; HORVÁTH et al. 2007; LAHNSTEINER et al. 2003; KUMAR et al. 2003). Kísérletemben egy, a csuka fajban végzett vizsgálatot vettem alapul a nagy mennyiségű 10 ml-es kriocső felolvasztási idejének egységesítése céljából (MOLNÁR et al. 2020). Összehasonlítottam a 3 perc 30 másodperces, a 3 perc 45 másodperces, valamint a 4 perces felolvasztási időt pér és csuka hígító használatát követően. Azonban nem rögzítettem szignifikáns különbséget az eltérő intervallumok között. Vizsgálatomat összevetve a csuka fajban leírt eredményekkel a 10 ml-es kriocső felolvasztási idejének egységesítése során, hasonlóan magas értékeket rögzítettem. MOLNÁR et al. 2020-ban vizsgálva a 3 perc, a 3 perc 30 másodperc, valamint a 4 perc időintervallumú vízfürdő alkalmazását, mely során nem mértek igazolható különbséget a vizsgált időtartamok között (3 perc: $30\pm 6\%$, 3 perc 30 másodperc: $29\pm 6\%$, 4 perc: $28\pm 8\%$). Továbbiakban egységesíteni kívántam az 5 ml-es kriocső felolvasztási idejét polisztirol dobozban és CRF berendezésben történő mélyhűtést követően pér és csuka hígító esetében. A módszer adaptálása során a ponty tájfajta esetében, korábbi előzetes megfigyeléseim alapján eltérő időtartamokat alkalmaztam (pér hígító: 2 perc 45 másodperc, 3 perc, 3 perc 15 másodperc; csuka hígító: 2 perc 15 másodperc, 2 perc 30 másodperc, 2 perc 45 másodperc). Hasonlóan magas eredményt rögzítettek HERRANZ-JUSDADO et al. 2019-ben európai angolna (*Anguilla anguilla*) ivartermékének 5 ml-es kriocsőben történő mélyhűtését követően. Kísérletükben $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os, 105 másodperces vízfürdőben történő felolvasztást követően kísérleti beállítástól függően 10-12 %-os pMOT és 110-120 $\mu\text{m/s}$ -s VCL eredményeket mértek. Vizsgálatomban minden esetben $>20\%$ pMOT és $>40\ \mu\text{m/s}$ VCL értékeket rögzítettem. Hasonló jó eredményt rögzítettek BEIRÃO et al. (2020) *Anarhichas minor* esetében 5 ml-es kriocső fagyasztását követően ($>50\%$ pMOT, $>15\ \mu\text{m/s}$ VCL) 6 perces felolvasztási időtartamot követően. A legrövidebb felolvasztási időtartam alkalmazása a keltetőházi gyakorlatba kiválóan beilleszthető, ezáltal a fagyasztott ivartermék egyszerű felhasználását teszi lehetővé szaporítás során. Állításomat BERNÁTH et al. 2016-ban végzett kutatása támasztja alá. Azonos mennyiségű ponty ivarterméket ($\sim 5,2\ \text{ml}$) mélyhűtötték 1:9 hígítási 0,5 ml-es műszalmában (104 db) programozható fagyasztó berendezés segítségével. A számos szalma felolvasztása azonban sokkal hosszabb időt vehet igénybe, mint az általam használt néhány ($\sim 10\ \text{db}$) kriocső. Kutatásom hozzájárulhat a módszer sikerebb

keltetőházi adaptációjához (gyorsabb felhasználás a szaporítás során). Vizsgálatom révén elsőként alkalmaztam az 5 ml-es kriocső mélyhűtését programozható mélyhűtő berendezésben a tájfajta esetében. Továbbá a szakirodalomban fellelt publikációk alapján szintén elsőként alkalmaztam az eljárást a sudár ponty tájfajta esetében. Hasonlóan eredményesen alkalmazták HORVÁTH et al. (2007) 1,2 ml és 5 ml térfogatú műszalma polisztirol dobozban történő mélyhűtést követően ($70\pm 0\%$ - 83 ± 22 pMOT%) ponty esetében. A műszalmában történő ivarsejtmélyhűtés eredményes, azonban a módszer nem egységesíthető a gyakorlat számára (eltérő mennyiségek a töltés során). Vizsgálatomban használt kriocsövek ezzel szemben egységesen tölthetőek és minden esetben azonos mennyiséget tartalmaznak. A mélyhűtési módszerek eredményességét szaporítás során kívántam igazolni. A 10 ml-es kriocsőben történő mélyhűtés során mozgási paraméterekre negatív hatással volt a fagyasztás folyamata. Kísérletemben, továbbá, alacsony kelési arányt rögzítettem mind a friss sperma ($40\pm 4\%$), mind a pér ($33\pm 2\%$), mind pedig a csuka ($15\pm 4\%$) hígító használatát követően. Az alacsony kelési arány valószínűsíthető oka a lehetett Rack rendszerbe helyezett termékenyített ikratételek nem megfelelő eloszlása az aljzaton (nem ideális keltetési körülmények). Továbbá a feltételezhető rossz ikraminőség is hatással lehetett az alacsony értékekre. A pér hígító esetében magasabb progresszív motilitás rögzítettem összehasonlítva a módosított csuka hígítóval. Hipotézisem szerint ezek a véletlenszerűen előforduló különbségek az egyes motilitási paraméterekben a minták egyéni variációjával (pl.: mélyhűtéssel szembeni érzékenység), valamint a fagyasztási folyamat során a spermiumok alpopulációira gyakorolt korábbi kísérletemben is tapasztalt erős szelekciós hatással magyarázhatók (KRÓL et al. 2018). A pér hígító esetében a korábban leírt agglutináció volt jellemző. A termékenyítési tesztben a csuka hígító alkalmazása során a mintákban nem tapasztaltam agglutinációt. A pér hígító esetében a felolvasztott nem agglutinálódott szuszpenzió kizárólag ép és kiválóan mozgó spermiumokat tartalmazott. A módosított csuka hígító esetében a homológ mintában nem volt agglutináció, ezáltal nem okozott a mélyhűtés mesterséges szelekciót. A csuka hígító esetében az alkalmazott termékenyítési egységet a szaporítás sikerességének növelése céljából a jövőben módosítani kell (többszörös mennyiség alkalmazása). Az újonnan tesztelt csuka hígító továbbá lehetővé teszi egy pontos, jól működő egységes sperma-ikra arány, valamint termékenyítési egység kidolgozását (HU et al. 2011). Munkám során sikeresen végeztem el a tájfajta végső érlelését és szaporításra történő felkészítését zárt recirkulációs rendszerben. Kutatásaim során nagy biztonsággal végeztem el az

ikrainkubációt vízvisszaforгатásos nevelőegységben. Hasonlóan jó eredményeket ért el azonos feltételek mellett CSORBAI et al. 2020-ban, sikeresen szaporítottak jász (*Leuciscus idus* L.), domolykó (*Squalius cephalus* L.), compó (*Tinca tinca* L.), széles kárász (*Carassius carassius* L.), márna (*Barbus barbus* L.) halfajokat intenzív körülmények között. MOTTA et al. 2019-ben hasonló eredményeket rögzítettek ponty fajon végzett kutatásaikban. Intenzív lárvanevelési vizsgálataim során a meghatározott kelési eredményeim alapján elsőként írtam le az államilag hivatalosan elismert tájfajta kelő lárvájának átlagos testhossz és testtömeg paramétereit zárt rendszerben. A lárvanevelés során magas növekedési értékeket rögzítettem. Vizsgálatomban $94\pm 2\%$ -os megmaradási arányt rögzítettem. Hasonlóan magas értékeket rögzített JAANUSKA & JAANUSKA 2017-ben (hasonló körülmények között, $>99\%$ -os megmaradás). Hasonlóan jó arányú eredményt ($>90\%$) ért el JEZIERSKA et al. 2000-ben, illetve MARTINS et al. 2009-ben recirkulációs rendszer vadponty típusnál. Összevetve az irodalmi adatokkal, HORVÁTH (2018) $45\pm 21\%$ -os eredményéhez viszonyítva szignifikánsan magasabb megmaradást rögzítettem a tavi kihelyezéssel szemben. Számos hazai szakirodalomban feljegyezték, hogy a jól kidolgozott és végrehajtott túlélőkészítés ellenére a frissen keltetőházból kihelyezett ivadékok hozzávetőlegesen csupán fele marad meg (HORVÁTH 2000; HORVÁTH et al. 2018). A lárvanevelés korai szakaszának zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő tartása során a lárva nincs kitéve a kedvezőtlenebb tavi körülményeknek (baktériumok, vízi gombák, zooplankton szervezetek), és nagy mennyiségű ellenálló lárvatömeg állítható elő. CHABALIN et al. (1989) eredményeik megerősítik ezt, hiszen pontyon 35% -os, *Colossoma macropomum* esetében 30% -os, valamint *Piaractus mesopotamius* halfajon elért 20% -os megmaradását érték el félintenzív tavi körülmények között. Eredményeink alapján az éppen aktuális évi „ponty vetőmag” kihelyezése jobb hatásokkal és kisebb kockázattal történhet. Kísérleti körülményeim hozzájárultak a magas megmaradt arányhoz, melyet BRIANT & MATTY (1980), DEMÉNY et al. (2012), JAANUSKA & JAANUSKA (2017), VANHAECKE et al. (1990), ŻARSKI et al. (2011) kutatásai is igazolnak. Továbbá a megfelelően meghatározott medencénkénti egyedkihelyezés egyaránt elősegítette a magas megmaradási arányt (JELKIĆ et al. 2012: 85 egyed/liter; ŻARSKI et al. 2011: 50 egyed/liter). Lárvamorfológiai vizsgálataim során a vizsgált hét különböző torzulás közül egyik rögzített elváltozás mértéke sem volt kimagasló. A torzulások mértéke elmaradt más pontyféléknél leírtakhoz képest (BERNÁTH et al. 2018; MARTINS et al. 2009). A rögzített szik deformitás és perikardiális ödéma megjelenése, valamint a fej, illetve

gerincatorzulás előfordulásának mértéke megfelelt a más vadponty típusnál felvételezett aránynak (ŁUGOWSKA & SARNOWSKI 2011; MARTINS et al. 2009). A zárt intenzív recirkulációs rendszer rendszerben történő előnevelésnek köszönhetően sokkal erőteljesebben és aktívabban táplálkozó, egészséges kihelyezett ivadékok, jobb megmaradást érhet el tógazdasági körülmények között.

5.1.2. A hévízi törpenövésű magyar vadponty esetében elért eredmények következtetései

Kutatásom során a vizsgálataim mintaelemszámának meghatározásánál figyelembe kellett vennem a populáció természeti értékét. A mélyhűtött sperma szerepet játszhat a génmegőrzésben, hiszen a konzervációbiológiai akciótervek nélkülözhetetlen része világszerte (BENSON et al. 2013; CABRITA et al. 2010; GALLEGO et al. 2012, 2013; KÁSA et al. 2014, 2015; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2009, 2017; VAN DER WALT et al. 1993; VÍLCHEZ et al. 2014; VIVEIROS & GODINHO 2009). A mélyhűtési technológia adaptálása során védett, veszélyeztetett populációval rendelkező faj esetében többek között meg kell felelni számos technológiai feltételnek. A módszernek adaptálhatónak kell lennie terepi és laboratóriumi körülmények között egyaránt (FASZER et al. 2006). Tavi környezetben végzett oltási kísérleteim eredményeiből jól látható, hogy sikeresen indukáltam a sebezhető és rendkívül stresszérzékeny vadponty spermiációját. Az oltásra az egyedek jól reagáltak és elhullás nélkül sikerült a beoltott tejeseket lefejtnem. Az ivartermék minősítése során magasabb mozgási eredményeket rögzítettem az oltott csoport esetében ($43\pm 25\%$) összehasonlítva a halfiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest ($15\pm 18\%$). ASTURIANO et al. 2003-as, valamint 2016-os összefoglaló munkájukban leírják, hogy a jövőben a génmegőrzés egyik kulcsa a fajspecifikus és minden körülmények között működő egységes oltási és mélyhűtési protokoll kidolgozása a védett és fokozottan védett halfajok esetében. Elővizsgálataim alapján a ponty klasszikus keltetőházi kezelési eljárása (lásd: 3.1. fejezet) nem volt sikeres a hévízi vadponty esetében. Az egyedek közvetlen zárt recirkulációs rendszerbe történő helyezését követően egy növekvő hormonadagú oltási sorozatot alkalmaztam (SZABÓ szóbeli közlése alapján 2018). A lefejt ivartermék minőségének ellenőrzése során magas pMOT ($72\pm 8\%$), mérsékelt VCL ($93\pm 12\mu\text{m/s}$), illetve magas LIN értékeket ($88\pm 2\%$) rögzítettem. A kontroll csoportnál kapott negatív eredményekből (nem nyertem ki értékelhető ivarterméket) látható, hogy kizárólag a magasabb hőmérséklet nem elegendő a halak spermiációjának megfelelő indukálásához.

Keltetőházi körülmények között szükség van az elnyújtott idejű hormonkezelésre. Számos kutatás számol be hosszabb és növekvő hormonadagú oltási módszer pozitív hatásáról európai angolnánál (ASTURIANO et al. 2005, 2006; MÜLLER et al. 2004; PÉREZ et al. 2000; SZABÓ et al. 2005). Eredményemet alátámasztja BLECHA et al. 2018-ben végzett kutatásaik. Hasonló érlelési eljárást alkalmaztak menyhal (*Lota lota*) esetében intenzív körülmények között $55\pm 7\%$ -os progresszív motilitást rögzítettek. Az előzőben bemutatott oltási sorozatot alkalmaztam egy hosszan tartó zárt recirkulációs rendszerben történő tartást követően a hévízi vadponty egyedeken. Sikeres sperma indukálását követően eredményesen fejtem ivarterméket a hormonálisan indukált csoporttól. A mélyhűtést követően igen magas, $65\pm 8\%$ -os pMOT értéket rögzítettem, mely azonban szignifikánsan eltért a fejést követően mért értéktől ($94\pm 3\%$). Napjainkra több mint 200 halfajra dolgozták ki a spermamélyhűtés technológiáját (SULTANA et al. 2010; TIERSCH 2000). Számos ázsiai vadponty esetében sikeresen mélyhűtötték az ivarterméküket. Azonban említést tesznek a szerzők a hígítók és módszerek fejlesztésének lehetőségéről (RAFIQUZZAMAN 2004; SALAM 2005; SARDER 2004). A mélyhűtés során a csuka fajra kidolgozott és leírt hígító mélyhűtést követően a polisztirol doboz esetében $24\pm 8\%$ -os, míg CRF berendezésben: $14\pm 3\%$ -os pMOT értékeket eredményezett. A korábban pontyféléknél már sikeresen alkalmazott pér hígítóval használata során a sejtek progresszív motilitása polisztirol doboznál $38\pm 14\%$, CRF-nél pedig $33\pm 12\%$ volt fagyasztást követően. Az általam is sikeresen használt 0,5 ml-es műszalma alkalmazása számos publikációban leírásra került polisztirol dobozban történő mélyhűtés során (HORVÁTH et al. 2003, 2012; MISKOLCZI et al. 2005). Kiválóan használható az eljárás természetvédelmi szempontból fontos halfajok esetében (MAITLAND 1995; CABRITA et al. 2010). Eredményeimhez hasonlóan magas motilitási értékeket rögzítettek pénzes pér és márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) esetében felolvasztás után HORVÁTH et al. 2012 és 2015-ben (pér: $50\pm 0\%$, pisztráng: $23\pm 6\%$) 1:1-es, illetve 1:4-es hígítási arányt használva. Eredményeim alapján, hasonlóan a sudár ponty tájfajtaéhoz, a csuka hígító alkalmazása során a felolvasztott ivarterméknél nem tapasztaltam agglutinációt, mely a pér esetében azonban előfordult. A hévízi vadponty esetében elsőként alkalmaztam sikerrel programozható fagyasztó berendezést. Konzervációbiológiai szempontból mindkét hígító eredményesen alkalmazható. A csuka hígító használatát követően azonban pontosan meghatározható a sperma-ikra egymáshoz viszonyított aránya (MOLNÁR et al. 2020). A Hévízi tóban élő populáció megőrzése céljából azonban mindkét hígító alkalmazása sikeres lehet egy jövőbeni keltetőházi szaporítás során

(HORVÁTH et al. 2012). Termékenyítési kísérletemben, a vadon befogott állomány hormonális indukálást követően a sikeresen fejt ivartermékek ellenére, az embriók fejlődése az inkubáció során megállt. A jelenség oka feltételezhetően a petesejtek aszinkron fejlettségi állapota lehetett. Számos halfaj esetében jegyezték fel, hogy a szaporítás során jelentős problémát okoz az ivarsejtek nem szinkronizált érése többek között európai angolnánál (ASTURIANO et al. 2004), illetve a nyelvhal (*Solea senegalensis*) esetén (CABRITA et al. 2006). Korábbi vizsgálataink során a vadponty természetes ívási időszakon kívül (február, március) elvégzett szaporítási eljárás során, sikeresen ívattuk le a hévízi vadpontyot. A tavon kihelyezett mesterséges hálókretrecben, hozzávetőlegesen 80%-os kelést rögzítettünk (pontos becslés nem volt kivitelezhető a természetes ívatás miatt, VÁRKONYI 2015). A sikertelen szaporítás további esetleges problémája lehetett a zárt intenzív recirkulációs rendszerben biztosított a természetestől eltérő szaporítási környezet (WOYNÁROVICH & HORVÁTH 1980). A sperma minőségét továbbá kísérletemben nem vizsgáltam (túl kevés ivartermék állt rendelkezésre), ezen oknál fogva nem kizárható, hogy a sperma minősége szintén befolyásolhatta a termékenyülést, valamint az ikrainkubációt (KHOLODNYI et al. 2019).

5.2. Javaslatok

Eredményeim alapján a gazdasági szempontból fontos sudár ponty tájfajta, illetve a természetvédelmi értéket képviselő hévízi vadponty esetében a következő javaslatokat szeretném tenni:

Balatoni sudár ponty:

1. Ajánlom a polisztirol doboz használata során 5 ml-es műszalma és az 5 ml-es kriocső esetében a 3 cm magasságban, 7 perc időtartamú mélyhűtést. Programozható mélyhűtő berendezés esetén az 5 ml-es műszalma, valamint 5, illetve a 10 ml-es kriocső esetében a 4 °C-os kiindulási -160 °C végponti hőmérsékletre történő mélyhűtési protokollját 15 °C/perc hűtési sebességgel javaslom alkalmazni. Mindkét kidolgozott eljárás jól használható a nagy mennyiségű sudár ponty sperma fagyasztása során, illetve a módszerek kiválóan átültethetőek a keltetőházi szaporítási gyakorlata számára.
2. Sudár ponty esetén javallom az 1:9-es hígítási arányt alkalmazni üzemi mennyiségű sperma mélyhűtése során.

3. Nagy mennyiségű (CRF berendezés) 10 ml-es kriocső felolvasztása során szorgalmazom a 3 perc 30 másodpercig tartó felolvasztás pér és csuka hígító használatát követően, az 5 ml-es kriocső (polisztirol doboz, CRF berendezés) felolvasztásánál a pér hígító esetében 2 perc 45 másodperc, míg csuka hígítónál a 2 perc 15 másodperc felolvasztási időtartam alkalmazását 40 °C-os vízfürdőben.
4. A sudár ponty ivartermékének mélyhűtése, illetve a szaporítási eljárásnál történő felhasználás során egyaránt javaslom a korábban pontyféléken sikeresen alkalmazott pér, illetve az újonnan alkalmazott csuka hígító használatát. A pontosabb termékenyítési egység meghatározásához ajánlom a csuka hígító alkalmazását.
5. Eredményeim alapján javaslom a gazdasági szempontból fontos ponty tájfajta zárt intenzív recirkulációs rendszerben, vagy keltetőházi körülmények között a keléstől számított hosszabb távú előnevelését (10 nap).

Hévízi törpenövésű magyar vadponty:

1. Terepi körülmények között javaslom a vadon befogott állomány parton történő hormonális indukcióját a megfelelő minőségű ivartermék kinyeréséhez. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben tartott egyedek esetében azonban ajánlom alkalmazni az elnyújtott idejű növekvő hormondózisú egy hetes oltási protokollt (1 kezelés: 1 mg/ttkg, 2. kezelés: 2 mg/ttkg, 3. kezelés: 2 mg/ttkg, 4. kezelés: 4 mg/ttkg, 2 napos időintervallumokban).
2. Génmegőrzés céljából ivarsejtmélyhűtés során a 0,5 ml-es műszalma polisztirol doboz és CRF berendezésben történő mélyhűtése során egyaránt ajánlom a pér és a csuka hígítók alkalmazását.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Sikeresen mélyhűtöttem ponty ivarterméket a csukára korábban kidolgozott hígító használata során, mely révén a felolvasztást követően jelentkező agglutinációt megszüntettem, ezáltal lehetővé tettem a mélyhűtött sudár ponty ivartermék keltetőházi felhasználása során egy jövőbeni pontos termékenyítési egység meghatározását.
2. Kísérletesen elsőként adaptáltam egy hatékony mélyhűtési módszert, az 5 és 10 ml-es kriocső fagyasztása esetén mind a pér, mind pedig a csuka hígító használata során CRF berendezésben (kiindulási hőmérséklet: 4 °C, végpont: -160 °C, hűtési sebesség: 15 °C/perc), valamint az 5 ml-es kriocső esetében polisztirol dobozban (3 cm-en, 7 perc).
3. Meghatároztam a 10 ml-es kriocső esetén a pér, illetve csuka hígító használatát követően a 3 perc 30 másodperc felolvasztási időtartamot 40 °C-on. Megállapítottam továbbá az 5 ml kriocső alkalmazása után a pér hígító esetében 2 perc 45 másodperces, a csuka hígító használatát követően pedig a 2 perc 15 másodperces felolvasztási időtartamot 40 °C-os vízfürdővel.
4. Sikeresen vizsgáltam a sudár ponty esetében a frissen kikelt lárvák átlagos testhossz és testtömeg adatait eredményes keltetőházi szaporítást követően zárt intenzív recirkulációs rendszerben. A tájfajta esetében elsőként mutattam be eredményes lárwanevelési eljárást magas megmaradási aránnyal és megfelelő morfológiai tulajdonságokkal rendelkező egyedek esetében zárt intenzív recirkulációs rendszerben.
5. Nagy hatásfokkal indukáltam a rendkívül stresszérzékeny hévízi vadponty spermiációját terepi körülmények között közvetlenül tóparton végzett oltásnak köszönhetően. Továbbá zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő tartást követően elnyújtott hormondózisú oltási eljárással (1 kezelés: 1 mg/ttkg, 2. kezelés: 2 mg/ttkg, 3. kezelés: 2 mg/ttkg, 4. kezelés: 4 mg/ttkg, 2 napos időintervallumokban) szintén eredményesen fokoztam a hévízi vadponty hím ivartermék termelését.
6. Sikeresen mélyhűtöttem a hévízi vadponty hím ivartermékét polisztirol dobozban és CRF berendezésben korábban a pontyféléknél eredményesen használt pér, valamint az újonnan alkalmazott csuka hígító használatát követően 0,5 ml-es műszalmában 1:9-es hígítás mellett.

7. Sikeresen alapoztam meg *in vitro* spermabankot a gazdasági értéket képviselő sudár ponty, illetve a természetvédelmi szempontból sebezhető hévízi vadponty eltárolt ivartermékéből.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásomban a Balatonban őshonos és hivatalos magyarországi tájfajtaként elismert balatoni sudár ponttyal (*Cyprinus carpio morpha accuminatus*), valamint Európában egyedülálló módon kizárólag az unikális állat- és növényvilággal rendelkező Hévízi-tóban élő hévízi törpenövésű magyar vadponttyal (*Cyprinus carpio morpha hungaricus*) foglalkoztam. Szaporodásbiológiai tulajdonságaik vizsgálatát, *in vitro* spermabank megalapozását, illetve zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő szaporításukat és lárvanevelésüket hajtottam végre.

A sudár ponty esetében optimalizáltam nagy mennyiségben történő hímivartermékének mélyhűtési protokollját. Fagyasztás során összehasonlítottam az 5 ml-es műszalmában, illetve a 10 ml-es kriocsőben történő mélyhűtést programozható fagyasztó berendezésben. Mindkét alkalommal a progresszív motilitásban szignifikánsan alacsonyabb értéket jegyeztem fel (műszalma: $5\pm 2\%$, kriocső: $25\pm 8\%$) a frisshez képest ($94\pm 4\%$). Igazolható különbséget rögzítettem a VCL értékek esetében a felhasznált módszerek (műszalma: $39\pm 7 \mu\text{m/s}$, kriocső: $49\pm 4 \mu\text{m/s}$), valamint a friss ($135\pm 14 \mu\text{m/s}$) ivartermékkel való összehasonlítást követően. Továbbá szintén igazolható csökkenést rögzítettem LIN paramétereknél összehasonlítva a friss ($72\pm 3\%$), valamint a műszalmában történő mélyhűtést ($51\pm 19\%$). A natív ivartermék motilitásához viszonyítva nem volt szignifikáns az eltérés a 10 ml-es kriocső ($82\pm 6\%$) használata során. Azonban a kezelések között igazolható volt a különbség. A 10 ml-es kriocsőben CRF berendezés alkalmazásával elsőként mélyhűtöttem a ponty ivarterméket, ezáltal meg kellett határoznom az optimális hígítási arányt a további vizsgálatokhoz. A sejtek pMOT vizsgálata során az eltérő arányok között nem volt igazolható különbség (1:1: $8\pm 4\%$, 1:4: $15\pm 9\%$, 1:9: $19\pm 9\%$). Fontos megemlítenem, hogy a mélyhűtés hatására minden esetben csökkent a minták motilitása a friss ivartermék minőségéhez viszonyítva ($90\pm 3\%$). Nem találtam továbbá statisztikailag igazolható eltérést a VCL (friss: $140\pm 10 \mu\text{m/s}$, 1:1: $35\pm 6 \mu\text{m/s}$, 1:4: $39\pm 6 \mu\text{m/s}$, 1:9: $45\pm 3 \mu\text{m/s}$), illetve a LIN (friss: $86\pm 1\%$, 1:1: $83\pm 1\%$, 1:4: $82\pm 3\%$, 1:9: $86\pm 3\%$) paraméterek között. Kísérletem eredményének értékelését követően az 1:9-es hígítási arányt választottam, mivel a legmagasabb motilitási értéket ez eredményezte a vizsgált módszerek közül. A vizsgálatok során pontyfélékre korábban leírt pér hígítót használtam, mely minden esetben hozzávetőlegesen 50%-os agglutinációt eredményezett. Vizsgáltam továbbá egy a csuka fajra kidolgozott hígító hatását az agglutináció mértékének megszüntetésére vonatkozóan.

Összehasonlítottam a két bemutatott hígító hatását 5 ml-es műszalmában és 10 ml-es kriocsőben polisztirol dobozban, valamint a programozható fagyasztó berendezésben történő mélyhűtés követően. A pér hígító használata minden esetben legalább 50%-os agglutinációt eredményezett. Mind a pér, mind pedig a csuka hígító alkalmazása után statisztikailag igazolható volt a különbség polisztirol dobozban 5 ml-es műszalma használatát követően a natív spermához viszonyítva a pMOT paraméternél (friss: $94\pm 2\%$, pér: $62\pm 10\%$, csuka: $64\pm 8\%$). A kezelések között azonban nem volt szignifikáns különbség. Hasonló eredményt rögzítettem a VCL értékek mérése során (friss: $117\pm 16 \mu\text{m/s}$, pér: $65\pm 15 \mu\text{m/s}$, csuka: $64\pm 14 \mu\text{m/s}$). Azonban a LIN paraméterek esetében nem volt igazolható a különbség (friss: $83\pm 4\%$, pér: $85\pm 2\%$, csuka: $85\pm 2\%$). A CRF berendezésben történő mélyhűtés és 5 ml-es műszalma használata során a pMOT (friss: $94\pm 2\%$, pér: $54\pm 8\%$, csuka: $37\pm 5\%$) értékek között minden esetben szignifikáns eltérést rögzítettem. A kezelések hatására csökkent a minták motilitása összehasonlítva a friss ivartermékkel. A két hígító között egyaránt igazolható volt az eltérés. Hasonló tendenciát rögzítettem a VCL eredmények mérése során (friss: $117\pm 16 \mu\text{m/s}$, pér: $58\pm 6 \mu\text{m/s}$, csuka: $46\pm 4 \mu\text{m/s}$). A friss mintához képest mindkét hígító szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott. Azonban nem volt igazolható különbség a pér, valamint a csuka hígító között. A LIN paraméterek esetében nem volt statisztikailag igazolható különbség a friss, valamint a mélyhűtött minták értékei között (friss: $83\pm 4\%$, pér: $84\pm 3\%$, csuka: $85\pm 2\%$). Valamint a nem volt igazolható különbség a mélyhűtési módszerek között sem. A mélyhűtési módszerek között azonban nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. A 10 ml-es kriocső programozható fagyasztó berendezésben történő mélyhűtése esetén a friss ivartermék minőségéhez viszonyítva igazolhatóan csökkentek a minták pMOT (friss: $94\pm 2\%$, pér: $25\pm 7\%$, csuka: $27\pm 6\%$). A hígítók között azonban nem volt igazolható különbség. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a VCL paraméterek esetében is. A friss minta ($117\pm 16 \mu\text{m/s}$) értékéhez viszonyítva statisztikailag igazolhatóan alacsonyabb értékeket rögzítettem a két hígító esetében (pér: $52\pm 3 \mu\text{m/s}$, csuka: $45\pm 3 \mu\text{m/s}$). Azonban a nem volt igazolható különbség a két hígító paraméterei között. A LIN paraméterek (friss: $83\pm 4\%$, pér: $86\pm 2\%$, csuka: $83\pm 3\%$) összehasonlítása során azonban nem volt statisztikailag igazolható különbség. Meghatároztam a pér és csuka hígító által okozott sejtkoncentráció változást a mélyhűtést követően. Kísérletemben az 5 ml-es műszalma polisztirol dobozban és CRF-ben, valamint a 10 ml-es kriocső programozható fagyasztó berendezésben történő mélyhűtését végeztem el. Mindkét hígító esetében a fagyasztás hatására szignifikánsan csökkent spermiumszám a

mintákban a natív ivarsejtmintához viszonyítva. A csuka hígító minden esetben mind polisztirol hűtődobozban, mind pedig a CRF berendezés használatával (5 ml műszalma polisztirol doboz: $2,9 \cdot 10^9 \pm 2,6 \cdot 10^8$; 5 ml műszalma CRF: $2,81 \cdot 10^9 \pm 5,58 \cdot 10^8$; 10 ml kriocső CRF: $2,82 \cdot 10^9 \pm 7,74 \cdot 10^8$) igazolhatóan magasabb sejtsűrűséget eredményezett összehasonlítva a pérrel (5 ml műszalma polisztirol doboz: $1,18 \cdot 10^9 \pm 1,83 \cdot 10^8$; 5 ml műszalma CRF: $2,15 \cdot 10^8 \pm 1,02 \cdot 10^8$; 10 ml kriocső CRF: $3,25 \cdot 10^8 \pm 2,39 \cdot 10^8$). Meghatároztam a megfelelő felolvasztási időt a 10 ml-es kriocső mélyhűtése során összehasonlítva a pér, valamint csuka hígító CRF berendezésben történő mélyhűtését követően. A pér hígító használatánál minden vizsgált paraméternél a friss ivartermékhez (pMOT: $90 \pm 5\%$, VCL: $106 \pm 21 \mu\text{m/s}$, LIN: $75 \pm 10\%$) képest statisztikailag alacsonyabb értékeket rögzítettem az eltérő felolvasztási időpontok vizsgálata során. A legrövidebb intervallum esetében (3 perc 30 másodperc) $30 \pm 12\%$ -os pMOT, $48 \pm 8 \mu\text{m/s}$ -s VCL és $86 \pm 3\%$ -os LIN értékeket rögzítettem. Csuka hígító használatát követően a programozható fagyasztó berendezésben történő mélyhűtés után hasonlóan a pér hígítóhoz a friss sperma eredményéhez képest minden esetben igazolhatóan alacsonyabb értékeket rögzítettem a felolvasztási időpontoknál. A leggyorsabb 3 perc 30 másodperc időtartam esetében $26 \pm 14\%$ -os pMOT, $41 \pm 7 \mu\text{m/s}$ -s VCL és $81 \pm 4\%$ -os LIN értékeket rögzítettem. Mind a pér, mind pedig a csuka hígító CRF berendezés használatát követően nem tapasztaltam szignifikáns különbséget a különböző időtartamok között a különböző mozgási paraméterek esetében. A keltetőházi gyakorlat számára leggyorsabb 3 perc 30 másodperces felolvasztási időt választottam ki a 10 ml-es kriocső esetében a 2 féle hígító alkalmazása mellett. Egységesítettem az 5 ml-es kriocső polisztirol dobozban és programozható mélyhűtő berendezésben pér, valamint csuka hígítóval történő mélyhűtést követően a felolvasztási időtartamot 40°C -os vízfürdőt alkalmazva. A friss ivartermék minőségéhez viszonyítva (pMOT: $92 \pm 5\%$, VCL: $123 \pm 12 \mu\text{m/s}$, LIN: $73 \pm 10\%$) a kísérlet során majdnem minden esetben a kezelések hatására szignifikáns csökkenést rögzítettem mindhárom vizsgált paraméter esetében. A pér hígító használatával a polisztirol dobozban a három felolvasztási időpont (2 perc 45 másodperc, 3 perc, 3 perc 15 másodperc) között nem volt egyik esetben sem igazolható a különbség a vizsgált paraméterek esetében. A legrövidebb felolvasztási időpont (2 perc 45 másodperc) használata során $30 \pm 4\%$ -os pMOT, $56 \pm 7 \mu\text{m/s}$ -os VCL, $84 \pm 2\%$ -os LIN értékeket rögzítettem. A CRF berendezésben a fent leírt hígító használatát követően, hasonlóan az előző kísérlethez, nem volt számottevő eltérés az eltérő időtartamok között. A LIN paraméterek esetében azonban szignifikánsan magasabb

értékeket rögzítettem a friss ivartermék minőségéhez viszonyítva. A leggyorsabb 2 perc 45 másodperc esetében magas mozgási paramétereket jegyeztem fel (pMOT: $37\pm 6\%$, VCL: $58\pm 8 \mu\text{m/s}$, LIN: $87\pm 1\%$). A csuka hígító használatával polisztirol dobozban a felolvasztási időpontok között nem volt statisztikai különbség (2 perc 15 másodperc, 2 perc 30 másodperc, 2 perc 45 másodperc). A legrövidebb 2 perc 15 másodperc esetén $19\pm 5\%$ -os pMOT, $53\pm 3 \mu\text{m/s}$ -os VCL és $84\pm 5\%$ -os LIN értékeket rögzítettem. A CRF berendezés használatát követően polisztirol doboznál megfigyelt tendenciát tapasztaltam. A leggyorsabb felolvasztási időtartam (2 perc 15 másodperc) használata során $27\pm 4\%$ -os pMOT, $47\pm 5 \mu\text{m/s}$ -os VCL, $81\pm 2\%$ -os LIN mozgási paramétereket jegyeztem fel. A 10 ml-es kriocsőre kidolgozott fagyasztási eljárás hatékonyságát pér és csuka hígító használatát követően, termékenyítési vizsgálatban terveztem igazolni keltetőházi körülmények között zárt recirkulációs rendszerben. A csuka hígító esetében az ozmolalitás optimalizálása érdekében növeltem a cukor, valamint csökkentettem az oldott sók mennyiségét az oldatban. Külön meghatároztam a fejest követően (friss: $91\pm 2\%$), valamint a termékenyítés pillanatában (friss termékenyítés: $92\pm 2\%$) a natív sperma motilitását, melyek között nem volt mérhető különbség. A pér, illetve a csuka hígító használatát követően szignifikáns csökkenést rögzítettem összehasonlítva a fejest követően, valamint termékenyítés pillanatában rögzített értékkel. A csuka hígító ($25\pm 12\%$) igazolhatóan alacsonyabb pMOT értékeket mutatott a pérhez ($43\pm 8\%$) viszonyítva. A VCL értékek esetében nem volt eltérés a friss ($147\pm 7 \mu\text{m/s}$) és a termékenyítés pillanatában ellenőrzött natív ivartermék ($136\pm 7 \mu\text{m/s}$) között. A pér ($55\pm 4 \mu\text{m/s}$), valamint a módosított csuka hígító ($52\pm 4 \mu\text{m/s}$) alkalmazása során azonban statisztikailag igazolható eltérést tapasztaltam összehasonlítva a fent leírt két friss értéktől. A két hígító alkalmazása között azonban nem találtam igazolható eltérést. A LIN paraméter esetében a pér hígító ($88\pm 1\%$) szignifikánsan magasabb értéket eredményezett összehasonlítva a frissel ($70\pm 10\%$), illetve a csuka hígítóval ($85\pm 1\%$). A termékenyítés pillanatában mért friss sperma ($73\pm 9\%$) nem különbözött statisztikailag igazolhatóan egyik paraméterrel való összehasonlítás során sem. A kelési arány meghatározásánál a natív spermával történő szaporítás eredményezte a legmagasabb értéket ($40\pm 4\%$). Mind a pérrel ($33\pm 2\%$), mind pedig a módosított csuka hígítóval ($15\pm 4\%$) való összehasonlítás során szignifikáns eltérést tapasztaltam. Továbbá a két kezelés között is igazolható volt az különbség. Az alacsony kelési arány valószínűsíthető oka a rossz ikraminőségnek, valamint a Rack rendszerbe helyezett ikratételek nem ideális nevelési paramétereinek volt köszönhető. Zárt recirkulációs rendszerben történő

pontyszaporítást követően a lárvák nevelésénél meghatároztam a sudár ponty frissen kelt egyedeinek átlagos testtömeg ($1,0\pm 0,3$ mg) és testhossz ($4,4\pm 1$ mm) paramétereit. A szikzacskó felszívódása idején az átlagos testhossz $5,5\pm 0,5$ mm, míg az átlagos testtömeg $1,5\pm 0,1$ mg volt. Az egy hetes táplálkozó lárva testhossz átlagos értéke $10,5\pm 0,7$ mm-re, testtömege pedig $12,1\pm 1,7$ mg-ra növekedett. Az egyedek zárt intenzív recirkulációs rendszer körülmények között végzett nevelése alkalmával több alaktani torzulását is feljegyeztem. A torzulások előfordulásának gyakorisága azonban nem volt számottevő. A vizsgálat során szignifikánsan magasabb megmaradást rögzítettem ($94\pm 2\%$), összehasonlítva más, a szakirodalomban publikált adatokhoz viszonyítva (HORVÁTH et al. 2018: $45\pm 21\%$). A vizsgálataim során mélyhűtött és fel nem olvasztott minták alapozzák meg a gazdasági értéket képviselő balatoni sudár ponty spermabankját.

Hévízi vadponty esetében sikeresen indukáltam a vadon befogott hímek spermiációját terepi körülmények között. Az oltás hatására szignifikánsan magasabb pMOT értéket mértem az oltott egyedknél ($43\pm 25\%$) összehasonlítva a kontrollal ($15\pm 18\%$). A VCL (Oltott: 68 ± 16 $\mu\text{m/s}$, Kontroll: 54 ± 13 $\mu\text{m/s}$) és a LIN (Oltott: $75\pm 6\%$, Kontroll: $71\pm 14\%$) értékek között nem volt igazolható különbség a két csoport között. Sikeres zárt intenzív recirkulációs rendszerbe történő helyezést követően eredményesen indukáltam egy növekvő hormondózisú oltási sorozat (1. kezelés: 1 mg/ttkg, 2. kezelés: 2 mg/ttkg, 3. kezelés: 2 mg/ttkg, 4. kezelés: 4 mg/ttkg, 2 napos időintervallumokban) alapján a tejes egyedek spermiációját (pMOT: $72\pm 8\%$, VCL: 93 ± 12 $\mu\text{m/s}$, LIN: $88\pm 2\%$). A halfiziológiás oldattal (kontroll) oltott egyedek nem adtak értékelhető mennyiségű spermát. Zárt intenzív recirkulációs rendszerben sikeresen tartott egyedek esetében a fent bemutatott növekvő hormonadagú oltási módszert alkalmazva sikeresen fejtem és mélyhűtöttem ivarterméket 0,5 ml-es műszalmában polisztirol hűtődobozban, pér hígító alkalmazása mellett. A mélyhűtést követően a felolvasztott mintáknál (pMOT: $65\pm 9\%$, VCL: 101 ± 10 $\mu\text{m/s}$, LIN: $84\pm 4\%$) minden esetben szignifikáns különbséget rögzítettem a friss ivartermékkel (pMOT: $94\pm 3\%$, VCL: 139 ± 21 $\mu\text{m/s}$, LIN: $73\pm 5\%$) történő összehasonlítás során. Alkalmazva a korábban bemutatott két féle hígító (pér, csuka) polisztirol dobozban és CRF berendezésben 0,5 ml-es műszalma mélyhűtése során nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a kezeléseik között összehasonlítva a friss ivartermék pMOT ($61\pm 32\%$), VCL (83 ± 27 $\mu\text{m/s}$) és LIN ($79\pm 12\%$) értékeivel. A polisztirol dobozban nem volt igazolható különbség a pér ($38\pm 14\%$), valamint a csuka hígító ($24\pm 8\%$) progresszív motilitási

értékei között. A CRF berendezés használata után azonban statisztikailag igazolható csökkenést rögzítettem a csuka hígító (14±3%) alkalmazása során összehasonlítva a pér hígítóval (33±12%) a sejtek progresszív motilitásában. A mért VCL paramétereknél polisztirol dobozban a pér hígító (78±18 µm/s) szignifikánsan magasabb értéket eredményezett, mint a csuka hígító (53±9 µm/s). Hasonlóan, a CRF berendezés alkalmazását követően a pér hígítóhoz (101±19 µm/s) viszonyítva a csuka hígító (60±14 µm/s) igazolhatóan csökkentette a sejtek VCL paramétereit. A LIN értékek összehasonlítása során nem volt szignifikáns különbség a két hígító (pér: 87±6%, csuka: 83±4%) esetében a polisztirol dobozban. Azonban a CRF berendezés használatát követően a csuka hígító (81±2%) igazolhatóan csökkentette a sejtek mért LIN értékeit összehasonlítva a pér hígítóval (90±4%). A fel nem olvasztott minták alapozzák meg a természetvédelmi értékű hévízi vadponty spermabankját. Vadon befogott egyedek (tejesek és ikrások egyaránt) terepi körülmények között történő hormonális indukcióját követően zárt recirkulációs rendszerben történő szaporítását végeztem el. Az ikrainkubáció során (feltételezhetően a rossz sperma- és ikraminőség okán) mindösszesen egy lárva kelt ki a Zuger-üvegbe helyezett 14,63 g-os ikratételből. A kikelt és felnevelt egyed nem rendelkezett morfológiai elváltozásokkal.

8. SUMMARY

Hungarian common carp landrace (*Cyprinus carpio morpha accuminatus*) from the lake Balaton and the unique Hungarian wild dwarf carp (*Cyprinus carpio morpha hungaricus*) reproductive biological parameters were investigated in my work. Furthermore, *in vitro* sperm banks of the two carp species were established. The artificial propagation and the larval rearing at an intensive closed recirculating system were also carried out.

Large-scale cryopreservation protocol was optimized for Balaton common carp, where the cryopreservation of the 5 mL straw and the 10 mL cryotube in the programmable freezer was compared. Significantly lower progressive motility was recorded (Straw: $5\pm 2\%$, Cryotube: $25\pm 8\%$) compared to the fresh control ($94\pm 4\%$) in both frozen groups. Significant difference was observed between the cryopreserved groups. Significant difference was measured between the Fresh ($135\pm 14 \mu\text{m s}^{-1}$) and the two cryopreserved groups (Straw: $39\pm 7 \mu\text{m s}^{-1}$, Cryotube: $49\pm 4 \mu\text{m s}^{-1}$) in VCL. No significant difference was observed between the two frozen groups. Similar LIN was measured in the Fresh ($72\pm 3\%$) and the Straw ($51\pm 19\%$). Significantly higher LIN was recorded in the case of the Cryotube ($82\pm 6\%$) compared to the Fresh and the Straw. A controlled-rate freezer and the 10 mL cryotube were used in the carp landrace for the first time (according to our knowledge). Therefore, the optimal dilution ratio in the cryotube had to be determined for any further studies. No significant differences were recorded among the different frozen groups in pMOT (1:1: $8\pm 4\%$, 1:4: $15\pm 9\%$, 1:9: $19\pm 9\%$). However, motility reduced significantly in all treated groups compared to the fresh control ($90\pm 3\%$). There was no statistically significant difference in VCL (Fresh: $140\pm 10 \mu\text{m s}^{-1}$, 1:1: $35\pm \mu\text{m s}^{-1}$, 1:4: $39\pm 6 \mu\text{m s}^{-1}$, 1:9: $45\pm 3 \mu\text{m s}^{-1}$) and LIN (Fresh: $86\pm 1\%$, 1:1: $83\pm 1\%$, 1:4: $82\pm 3\%$, 1:9: $86\pm 3\%$) parameters between the experimental groups. The highest values were observed using the ratio 1:9 which was chosen for further studies. During the experiment Grayling extender (formerly used in cyprinid species) resulted approximately 50% agglutination in each sample. A recently developed extender (for northern Pike) was investigated for the elimination of agglutination in frozen carp sperm following thawing. Two different extenders (Grayling and Pike), the 5 mL straw and 10 mL cryotube, cryopreserved in a polystyrene box and in a controlled-rate freezer were compared. The Grayling extender resulted at least 50% agglutination in almost all samples. In the case of both extenders, significantly lower pMOT was observed using 5 ml straw in a polystyrene

box (Grayling: $62\pm 10\%$, Pike: $64\pm 8\%$) to the Fresh control ($94\pm 2\%$). No significant difference was observed between the cryopreservation methods. The similar tendency was observed in VCL (Fresh: $117\pm 16 \mu\text{m s}^{-1}$, Grayling: $65\pm 15 \mu\text{m s}^{-1}$, Pike: $64\pm 14 \mu\text{m s}^{-1}$). However, there was no difference between the frozen groups. Furthermore, no significant difference was recorded in LIN (Fresh: $83\pm 4\%$, Grayling: $85\pm 2\%$; Pike: $85\pm 2\%$). Significant difference was recorded in pMOT between the frozen and Fresh groups (Fresh: $94\pm 2\%$, Grayling: $54\pm 8\%$, Pike: $37\pm 5\%$) using the 5 mL in the CRF. A significant difference in pMOT was also measured between the two extenders. Similar tendency was observed in VCL results. Significantly higher VCL was recorded in the Fresh group ($117\pm 16 \mu\text{m s}^{-1}$) compare to the two cryopreserved groups (Grayling: $58\pm 6 \mu\text{m s}^{-1}$, Pike: $46\pm 4 \mu\text{m s}^{-1}$). However, there was no statistical difference between the extenders in VCL. No significant difference was measured in LIN (Fresh: $83\pm 4\%$, Grayling: $84\pm 3\%$, Pike: $85\pm 2\%$) parameters. Sperm frozen in 10 mL cryotube using CRF showed significant reduction in pMOT (Grayling: $25\pm 7\%$, Pike: $27\pm 6\%$) and VCL (Grayling: $52\pm 3 \mu\text{m s}^{-1}$, Pike: $45\pm 3 \mu\text{m s}^{-1}$), in comparison with the fresh control (pMOT: $94\pm 2\%$, VCL: $117\pm 16 \mu\text{m/s}$). However, there was no notable difference between the two diluents. In LIN, no significant difference was measured between the frozen and control groups (Fresh: $83\pm 4\%$, Grayling: $86\pm 2\%$, Pike: $83\pm 3\%$). The change in cell concentration was determined in the case of the two diluents (Grayling and Pike) following thawing using the 5 mL straw in polystyrene box and CRF and the 10 mL cryotube in a controlled-rate freezer. In all cryopreservation methods, both extenders showed significantly lower sperm density compared to the fresh control groups. Furthermore, the use of the Pike extender resulted in significantly higher cell concentration in all cryopreserved groups (5 mL straw polystyrene box: $2,9\cdot 10^9\pm 2,6\cdot 10^8$; 5 mL straw CRF: $2,81\cdot 10^9\pm 5,58\cdot 10^8$; 10 mL cryotube CRF: $2,82\cdot 10^9\pm 7,74\cdot 10^8$) in comparison with the Grayling (5 mL straw polystyrene box: $1,18\cdot 10^9\pm 1,83\cdot 10^8$; 5 mL straw CRF: $2,15\cdot 10^8\pm 1,02\cdot 10^8$; 10 mL cryotube CRF: $3,25\cdot 10^8\pm 2,39\cdot 10^8$). A standard thawing period was determined for the 10 ml cryotube using Grayling and Pike extender and CRF. Significantly lower values were determined compared to the fresh (pMOT: $90\pm 5\%$, VCL: $106\pm 21 \mu\text{m s}^{-1}$, LIN: $75\pm 10\%$) in all thawing periods in the case of the Grayling extender. In the shortest period (3 min 30 seconds) $30\pm 12\%$ pMOT, $48\pm 8 \mu\text{m s}^{-1}$ VCL and $86\pm 3\%$ LIN was recorded. A similar tendency was observed in Pike groups. In the fastest thawing time (3 min 30 seconds) $26\pm 14\%$ pMOT, $41\pm 7 \mu\text{m s}^{-1}$ VCL, and $81\pm 4\%$ LIN was measured. There was no significant difference between the different thawing times.

According to my results, the shortest period (3 min 30 seconds) was chosen for further studies which can be adaptable and more suitable in the hatchery practice. A standard thawing period for 5 mL cryotube was experimentally investigated using Grayling and Pike extenders and two cryopreservation methods (polystyrene box and controlled-rate freezer). During the experiment significantly lower motility parameters were observed in all cryopreserved groups compared to the fresh control (pMOT: $92\pm 5\%$, VCL: $123\pm 12 \mu\text{m s}^{-1}$, LIN: $73\pm 10\%$). No significant difference was measured using the Grayling extender in polystyrene box between the 3 thawing periods (2 minutes 45 seconds, 3 minutes, 3 minutes 15 seconds). There was no significant difference between the different thawing times. In the case of fastest thawing time (2 minutes 45 seconds) $30\pm 4\%$ pMOT, $56\pm 7 \mu\text{m s}^{-1}$ VCL, and $84\pm 2\%$ LIN parameters was recorded. After the cryopreservation of the 5 mL cryotube using Grayling extender in CRF similar effect of the 3 periods was observed. However, a significantly higher LIN was measured in the cryopreserved groups compared to the fresh. Using 2 minutes 45 seconds thawing period $37\pm 6\%$ pMOT, $58\pm 8 \mu\text{m s}^{-1}$ VCL, and $87\pm 1\%$ LIN was recorded. Similarly, notable difference between the thawing periods was not observed (2 min 15 sec, 2 min 30 sec, 2 min 45 sec) using the Pike extender in polystyrene box. $19\pm 5\%$ pMOT, $53\pm 3 \mu\text{m s}^{-1}$ VCL and $84\pm 5\%$ LIN was recorded in the case of the fastest thawing time (2 minutes 15 seconds). There was no significant difference between the different thawing times. Pike extender using CRF showed similar results to the previous experiment. $27\pm 4\%$ pMOT, $47\pm 5 \mu\text{m s}^{-1}$ VCL, $81\pm 2\%$ LIN was measured using the shortest thawing period (2 minutes 15 seconds). There was no significant difference between the different thawing times. Sperm cryopreserved in 10 mL cryotube using Grayling and Pike extender in CRF was applied for propagation in a closed recirculation system. In the case of the Pike extender, the sugar content was increased where the number of dissolved salts was decreased. Thus, the osmolality of the extender was reduced. A similar motility of fresh sperm post stripping (Fresh: $91\pm 2\%$) and immediately prior to fertilization (Fresh fertilization: $92\pm 2\%$) was recorded. Both control groups showed higher pMOT in comparison with the two frozen. Furthermore, a significantly lower motility was measured in Pike extender ($25\pm 12\%$) than in Grayling ($43\pm 8\%$). In the case of the VCL parameter, there was no significant difference between Fresh ($147\pm 7 \mu\text{m s}^{-1}$) and Fresh fertilization ($136\pm 7 \mu\text{m s}^{-1}$). However, a significantly lower curvilinear velocity was observed using a Grayling ($55\pm 4 \mu\text{m s}^{-1}$) Pike ($52\pm 4 \mu\text{m s}^{-1}$) extender compared to the two control Fresh groups. Cryopreserved groups did not show notable difference in VCL. The Grayling extender

(88±1%) showed significantly higher LIN in comparison with the Pike extender (85±1%) and the Fresh (70±10%). In case of the Fresh fertilization group (73±9%) there was no significant difference in LIN parameters. The highest hatching rate was observed in the Fresh (40±4%). Significant difference was recorded between the Grayling (33±2%) and the Pike extender (15±4%) as well as the Fresh. Artificial propagation was carried out in the carp landrace at a closed recirculation system. Average body weight (1.0±0.3 mg) and standard length (4.4±1 mm) of the freshly hatched larvae was determined. The mean standard length was 5.5±0.5 mm, where the mean body weight increased to 1.5±0.1 mg at the moment of yolk sac absorption. The standard length (10.5±0.7 mm) and the average bodyweight (12.1±1.7 mg) of the one-week feeding larvae also increased notably. During the intensive rearing, several malformations were recorded on the larvae. However, the prevalence of abnormal development was negligible among the investigated individuals. At the end of the larvae rearing, a significantly higher survival rate (94±2%) was recorded compared to the value 45±21% published in a former study (HORVÁTH et al. 2018). In the case of my research the cryopreserved and not thawed samples (not used for analysis) are the basis of the sperm bank the economic importance Hungarian common carp landrace.

In the case of the Hévíz wild dwarf carp the spermiation of wild-caught males was successfully induced at field conditions. A significantly higher pMOT was recorded in the injected individuals (43±25%) compared to the control group (15±18%). There was no significant difference in VCL (injected: 68±16 $\mu\text{m s}^{-1}$, control: 54±13 $\mu\text{m s}^{-1}$) and LIN (injected: 75 ± 6%, control: 71±14%) between the two groups. Hormonal induction of the male broodstock maintained in an intensive recirculating system was also successfully carried out (pMOT: 72±8%, VCL: 93±12 $\mu\text{m s}^{-1}$, LIN: 88±2%). Fish were treated using multiple injection at 2 days interval (1. treatment: 1 mg kg⁻¹, 2. treatment: 2 mg kg⁻¹, 3. treatment: 2 mg kg⁻¹; 4. treatment: 4 mg kg⁻¹). Individuals injected with fish saline solution (control) did not provide required amount of sperm for motility analysis. Multiple injection (mentioned above) resulted high quality sperm also in the case of Hévíz carp individuals kept long-term in an intensive recirculating system. Furthermore, samples were cryopreserved using Grayling extender in 0.5 ml straw with polystyrene box. Significantly lower motility parameters were recorded in the thawed samples (pMOT: 65±9%, VCL: 101±10 $\mu\text{m s}^{-1}$, LIN: 84±4%) compare to the fresh control (pMOT: 94±3%, VCL: 139±21 $\mu\text{m s}^{-1}$, LIN: 73±5%). Applying the two extenders (presented earlier) in polystyrene box and

in a CRF equipment using 0.5 mL straw, there was no significant difference between the cryopreserved groups compared to the fresh one pMOT ($61\pm 32\%$), VCL ($83\pm 27 \mu\text{m s}^{-1}$) and LIN ($79\pm 12\%$) parameters. There was no significant difference between Grayling ($38\pm 14\%$) and Pike extender ($24\pm 8\%$) in the polystyrene box. However, after the use of the programmable freezer, statistically significant decrease was recorded in the case of Pike extender ($14\pm 3\%$) compared to the Grayling one ($33\pm 12\%$) in the progressive motility. In the case of the VCL values in polystyrene box the Grayling extender ($78\pm 18 \mu\text{m s}^{-1}$) showed significantly higher results compared to the Pike extender ($53\pm 9 \mu\text{m s}^{-1}$). Similarly, in CRF equipment using Pike extender ($60\pm 14 \mu\text{m s}^{-1}$) VCL values reduced significantly compared to the Grayling one ($101\pm 19 \mu\text{m s}^{-1}$). There was no significant difference in LIN values between the cryopreserved groups in polystyrene box (Grayling: $87\pm 6\%$, Pike: $83\pm 4\%$). However, a significantly lower linearity parameter was observed using the Pike extender ($81\pm 2\%$) compared to the Grayling extender ($90\pm 4\%$) in CRF. A sperm bank of the vulnerable Hévíz wild dwarf carp was established using the remaining straws (not used for analysis). The spermiation and ovulation of wild-caught males and females were hormonally stimulated at field conditions. Propagation was carried out in an intensive recirculation system. Because of the poor embryo development, only one larva hatched (presumably due to poor sperm and egg quality) from the 14.63 g batch of eggs. The hatched and reared individual had no morphological abnormalities.

9. MELLÉKLETEK

- ABED-ELMDOUST, A., FARAHMAND, H., MOJAZI-AMIRI, B., RAFIEE, G., RAHIMI, R. (2015): Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). *Aquac. Res.* 46, 2392–2397. p.
- AGARWAL, N. K. (2011): Cryopreservation of Fish Semen. Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation and New Tools in Biotechnology. 978-81-904778-3-6, 2011, 104-127. p.
- AHN, J. Y., PARK, J. Y., ÉS LIM, H. K. (2018): Effects of different diluents, cryoprotective agents, and freezing rates on sperm cryopreservation in *Epinephelus akaara*. *Cryobiology*, 83, 60–64. p.
- AKCAY E., BOZKURT Y., SECER S., TEKIN N. (2004): Cryopreservation of Mirror Carp Semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 28: 837-843. p.
- ALAVI, S.M.H., LINHART O., COWARD, K., AND RODINA, M. (2008): Fish Spermatology: Implications for Aquaculture Management. 397-460. p. In: ALAVI, S.M.H., COSSON, J., COWARD, K., AND RAFIEE, G., (Eds.): Fish spermatology. Oxford, United Kingdom: Alpha Science International Ltd., 465. p.
- ALAVI, S. M. H., AND COSSON, J. (2005): Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, 29(2), 101–110.
- ALAVI, S. M. H. AND COSSON, J. (2006): Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International*, 30: 1–14. p.
- ALIKHUNI, K. H. (1966): Synopsis of biological data of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus), 1758 (Asia and Far East). In: FAO Fisheries Synopsis, 31.2: 39. p.
- ALIX, M., KJESBU, O. S., AND ANDERSON, K. C. (2020): From gametogenesis to spawning: How climate-driven warming affects teleost reproductive biology. *Journal of Fish Biology*. 97 (3) Pages 607-632. p.
- AMANN, R. P., WABERSKI, D. (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81 (2014) 5-17. p.
- ANDREEV, A. A., GAKHOVA, E. N., PASHOVKIN, T. N. (2009): Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. *Biofizika* 54, 869–875.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. (1980): Low temperature preservation of cells, tissues and organs. 19-44. p. In: ASHWOOD-SMITH M. J. AND FARRANT J. (Eds.): Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Tunbridge Wells, Kent, England: Pitman Medical Ltd., 323. p.
- ASTURIANO, J.F., PÉREZ, L., MARCO-JIMÉNEZ, F., OLIVARES, L., VICENTE, J.S., JOVER, M. (2003): Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. 28 (1-4), 501–502. p.
- ASTURIANO, J.F., PÉREZ, L., GARZÓN, D.L., MARCO-JIMÉNEZ, F., PEÑARANDA, D.S., VICENTE, J.S., JOVER, M. (2004): Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiol. Biochem.* 30, 283–293. p.
- ASTURIANO, J.F., PÉREZ, L., GARZÓN, D.L., PEÑARANDA, D.S., MARCO-JIMÉNEZ, F., MARTÍNEZ-LLORENS, S., TOMÁS, A., JOVER M. (2005): Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. *Aquac. Res.*, 36 (2005),1480-1487. p.

- ASTURIANO, J.F., MARCO-JIMÉNEZ, F., PÉREZ, L., BALASCH, S., GARZON, D.L., PEÑARANDA, D.S., VICENTE, J.S., VIUDES-DE-CASTRO, M.P., JOVER M. (2006): Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology*, 66 (2006), 1012-1020. p.
- ASTURIANO, JUAN. F., CABRITA, E., HORVÁTH, Á. (2016): Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A minireview. *General and Comparative Endocrinology, Gen Comp Endocrinol* (1) 245: 69-76. p.
- BABIAK, I., GLOGOWSKI, J., KUJAWA, R., KUCHARCZYK, D., AND MAMCARZ, A. (1998): Cryopreservation of Sperm from *Asp Aspius aspius*. In: *The Progressive Fish-Culturist*, 60, 146–148. p.
- BABIAK, I., FRASER, L., DOBOSZ, S., GORYCZKO, K., KUZMINSKI, H., STRZEZEK, J. (1999): Computer-controlled freezing of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spermatozoa for routine programmes. In: *Aquaculture Research*, 30 (9) 707-710. p.
- BALON, E. K. (1974): Domestication of the carp *Cyprinus carpio* L. Royal Ontario Museum, *Life Science* 1974. 37. p.
- BALON, E. K. (1984): Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Transaction of the American Fisheries Society* 1984,113 (2) 178-185. p.
- BALON, E. K. (1995): Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourments to the swimming flowers. *Aquaculture*. 129: 3-48 p.
- BALON E. K. (2004): About the oldest domesticates among fishes. *Journal of Fish Biology* (2004) 65 (Supplement A), 1–27. p.
- BALON, E. K. (2006): The oldest domesticated fishes, and the consequences of an epigenetic dichotomy in fish culture. *J. Ichthyol. Aquat. Biol.*, 11(2): 47-86.
- BÁRTFAIR., EGEDIS., GEN HUA YUE, KOVÁCS B., URBÁNYI B., TAMÁS G., HORVÁTH L., ORBÁN L. (2003): Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture* 219; 157–167.
- BAUMLI, P. (2015): Hőtároló anyagok, hőtároló kompozitok. *Anyagok világa. Anyagok Világa (Materials World)* 2 (2015) 9-19. p.
- 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. In: *Aquaculture*, 66 (1) 53-67 p.
- BEIRÃO, J., CABRITA, E., PÉREZ-CEREZALES, S., MARTÍNEZ-PÁRAMO S., HERRÁEZ, M.P. (2011): Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *62(1)*, 0–31. p.
- BEIRÃO, J., BOULAIS, M., GALLEGO, V., O'BRIEN, J.K., PEIXOTO, S., ROBECK, T.R., AND CABRITA, E. (2019): Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology* 133, 161–178. p.
- BEIRÃO, J., FLENGSTAD, S., BABIAK I. (2020): Spotted wolffish (*Anarhichas minor*) sperm cryopreservation in 5-mL cryovials. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020 Jul 1. doi: 10.1007/s10695-020-00837-1.
- BENSON, E.E., BETSOU, F., FULLER, B.J., HARDING, K., KOFANOVA, O. (2013): Translating cryobiology principles into trans-disciplinary storage guidelines for biorepositories and biobanks: a concept paper. *Cryo-Letters* 34, 277–312. p.
- BERCSÉNYI M., TAHY B. (1997): *Halgazdálkodás II*. MOHOSZ, Budapest. 65 p.
- BERINKEY L. (1966): *Magyarország állatvilága*. Akadémia Kiadó, Budapest. 1-132 p.
- BERNÁTH, G., BOKOR, Z., KÁSA, E., VÁRKONYI, L., HEGYI, Á., KOLLÁR, T., URBÁNYI, B., ŽARSKI, D., RADÓCZI IFJ, J., HORVÁTH, Á. (2015):

- Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. *Cryobiology*, 70(1), 76–78. p.
- BERNÁTH, G. (2016): A halsperma minősítési rendszerének gazdasági célú fejlesztése. Doktori disszertáció, Gödöllő.
- BERNÁTH, G., ŽARSKI, D., KÁSA, E., STASZNY, Á., VÁRKONYI, L., KOLLÁR, T., HEGYI, Á., BOKOR, Z., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2016a): Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation using a programable freezer. *General and Comparative Endocrinology* 237, 78–88. p.
- BERNÁTH, G., BOKOR, Z., ŽARSKI, D., VÁRKONYI, L., HEGYI, Á., STASZNY, Á., URBÁNYI, B., RADÓCZI, IFJ., J., HORVÁTH, Á. (2016b): Commercial-scale out-of-season cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm and its application for fertilization. *Animal Reproduction Science*. 170: 170–177. p.
- BERNÁTH, G., ITTZÉS, I., SZABÓ Z, HORVÁTH Á, KREJSZEFF S, LUJIĆ J, VÁRKONYI L, URBÁNYI B, BOKOR Z. (2017): Chilled and post-thaw storage of sperm in different goldfish types. *Reproduction in Domestic Animals*. 52, 680–686. p.
- BERNÁTH, G., CSENKI, ZS., BOKOR, Z., VÁRKONYI, L., MOLNÁR, J., SZABÓ, T., STASZNY, Á., FERINCZ, Á., SZABÓ, K., URBÁNYI, B. (2018): The effects of different preservation methods on ide (*Leuciscus idus*) sperm and the longevity of sperm movement. *Cryobiology*. F2018 Apr; 81:125-131. p.
- BILLARD, R. (1972): Racines flagellaires transitoires au cours de la spermiogénèse de la truite. *Journal de microscopie*. 1972. 14, 21a.
- BILLARD, R., FOSTIER, N., WELL, C. AND BRETON, B. (1982): Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1982. 39, 65-79.
- BILLARD, R., COSSON, J., ÉS CRIM, L. W. (1993): Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6 (1), 67–75. p.
- BILLARD, R., COSSON, J., PERCHEC, G., AND LINHART, O. (1995): Biology of sperm and artificial reproduction in carp. In: *Aquaculture*, 129, 95–112. o.
- BÍRÓ, P., TÖLG, L., SPECIÁR, A. (2002): A Hévízi forrástó és kifolyójának halfaunája, A Hévízi forrástó ökológiai állapota, Hévízi Könyvtár 15., Hévíz, p. 68-79.
- BLAXTER, J. H. S. (1953): Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172: 1189-1190. p.
- BLECHA, M., DZYUBA, B., BORYSHPOLETS, S., HOROKHOVATSKYI, Y., DADRAS, H., MALINOVSKYI, O., SAMPELS, S., POLICAR, T. (2018): Spermatozoa quality and sperm lipid composition in intensively cultured and wild burbot (*Lota lota*). *Animal Reproduction Science*, S0378432018306894.
- BOBE, J., AND LABBE, C. (2008): Chilled Storage of Sperm and Eggs. Methods in reproductive aquaculture - Marine and freshwater species Chapter: 6 Publisher: CRC Press. 219–235. p.
- BOBE, J., AND LABBÉ, C. (2010): Egg and sperm quality in fish. In: *General and Comparative Endocrinology*, 165 (3), 535-548. p.
- BODÓ, I., DINNYÉS, A., FARKASNÉ B., PAPP, Á., FÉSÜS, L., HIDAS, A., HOLLÓ, I., HORVAINÉ SZ., M., KOMLÓSI, I., KOVÁCS, A., LENGYEL, A., MIHÓK, S., NAGY, N., POLGÁR J., P., SZABÓ, F., SZABÓNÉ W. E., TÓZSÉR, J. (2004): Általános állattenyésztés, Mezőgazda Kiadó – Budapest
- BOKOR, Z. (2009): A harcsa (*Silurus glanis*) és a süllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata gyakorlati szempontok alapján. Doktori disszertáció, Gödöllő.

- BOKOR, Z., URBÁNYI, B., HORVÁTH, L., HORVÁTH, Á. (2010): Commercial-scale cryopreservation of wels catfish (*Silurus glanis*) semen. *Aquaculture Research* 41, 1549–1551. p.
- BOKOR, Z., ITTZÉS, I., MOSONYI, G., KOTRIK, L., MÜLLER, T., URBÁNYI, B., ÉS HORVÁTH, Á. (2015): Survival and growth rates of wels catfish (*Siluris glanis* Linnaeus, 1758) larvae originating from fertilization with cryopreserved or fresh sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 164–168. p.
- BOKOR, Z., BERNÁTH, G., VÁRKONYI, L., MOLNÁR, J., LÁNG, Z. L., TARNAI-KIRÁLY, Z., URBÁNYI, B. (2019): The applicability of large-scale sperm cryopreservation in wels catfish (*Silurus glanis*) optimized for hatchery practice. *Aquaculture*, 506, 337–340. p.
- BOONTHAI, T., KHAOPONG, W., SANGSONG, J., VUTHIPHANDCHAI, V., NIMRAT, S. (2016): Influence of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* on motility, viability and morphometry of cryostored silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Cryobiology*, 73(2), 140–146. p.
- BORYSHPOLETS, S., KOWALSKI, R.K., DIETRICH, G.J., DZYUBA, B., CIERESZKO, A. (2013): Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* 80, 758–765. p.
- BOZKURT, Y., OGRETMAN, F. SECER, F. S. (2009): Effect of different extenders and storage periods on motility and fertilization success of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm during spawning season. *Tarim Bilimeri Dergisi*, 15(3): 277-28. p.
- BOZKURT, Y., ĞRETMEN, F. Ö., KÖKÇÜ, Ö., ERÇİN, U. (2011): Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science* 56(8): 355-364. p.
- BOZKURT, Y., YAVAS I. (2017): Effect of Different Straw Volumes and Thawing Rates on Post-Thaw Quality and Fertilization Ability of Cryopreserved Common Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm. *LIMNOFISH-Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research* 3(1): 25-31. p.
- BRIANT P. L., AND A.J. MATTY A. J. (1980): Optimisation of artemi feeding rate for carp larvae (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 21 (1980) 203-212. p.
- BROWNE, R. K., KAUROVA, S. A., UTESHEV, V. K., SHISHOVA, N. V., MCGINNITY, D., FIGIEL, C. R., MANSOUR, N., AGNEW, D., WU, M., GAKHOVA, E. N., DZYUBA B., AND COSSON, J. (2015): Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. In: *Theriogenology*, 83, 1–13. p.
- BUTLER, S., PEGG, D. F. C. (2012): Precision in cryopreservation-Equipment and Control. 507-526. p. In: I. KATKOV (Ed.): *Current Frontiers in Cryobiology*. Rijeka, Croatia: In Tech. 574. p.
- CABRITA, E., ANEL, L., AND HERRÁEZ, M.P. (2001a): Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. In: *Theriogenology*, 56, 623–635. p.
- CABRITA, E., ROBLES, V., ALVAREZ, R., HERRÁEZ, M. P. (2001b): Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 201 Ž2001. 301–314. p.
- CABRITA, E., ROBLES, V., CUÑADO, S., WALLACE, J.C., SARASQUETE, C., AND HERRÁEZ, M. P. (2005). Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. In: *Cryobiology*, 50, 273–284. p.

- CABRITA, E., SOARES, F., DINIS, M. T. (2006): Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* 261, 967-975. p.
- CABRITA, E., ROBLES V., AND HERRÁEZ, P. (2009): Sperm quality assessment. 93-147 p. In: CABRITA, E., ROBLES, V., AND HERRÁEZ, P. (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton, Florida, USA: Taylor és Francis Group. 549. p.
- CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRÃO, J., PÉREZ-CEREZALES, S., AND HERRÁEZ, M. P. (2010): Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. In: *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 623–635. p.
- CAFFEY, R. H., TIERSCH, T. R. (2000): Cost analysis for integrating cryopreservation into an existing fish hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society* 31, 51–58. p.
- CARDOSO, R.D.S., SILVA, A.R., DA SILVA, L. D. M. (2006): Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Anim Reprod Sci* 92: 384–391. p.
- CEJKO, B. I., KREJSZEFF, S., ŻARSKI, D., JUDYCKA, S., TARGOŃSKA, K., KUCHARCZYK, D. (2018): Effect of carp pituitary homogenate (CPH) and sGnRH α (Ovaprim) on northern pike (*Esox lucius*) spermiation stimulation and its effect on quantity and quality of sperm. *Animal Reproduction Science*, 193: 217-225. p.
- CEJKO, B. I., KREJSZEFF, S., JUDYCKA, S., TARGOŃSKA, K., KUCHARCZYK, D. (2019): Effect of different treatment agents and post-treatment latency times on spermiation stimulation of northern pike (*Esox lucius*) under controlled conditions. *Theriogenology*, 142: 260-267. p.
- CHABALIN, E., SENHORN, J.A., FERRAZ DE LIMA, J. A. (1989): Estimativa do custo de produção de larvas e alevinos. *Boletim Técnico CEPTA*, 2: 61-74. p.
- CHAO, N. H., LIAO, I. C. (2001): Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*. 197, 161-189. p.
- CHIBA, T., KURIHAMA N., KENICHI Y. (1966): Culture of common carp (in Japanese). Green Book House Publisher, Tokyo, Japan, 1-222. p.
- CHE-ZULKIFLI, C. I., IVAN CHONG CHU, K., MUSTAFA, S., MD SHERIFF, S., ÉS IKHWANUDDIN, M. (2019): Use of dry ice for the shipping and packaging of cryopreserved giant grouper *Epinephelus lanceolatus* spermatozoa. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 46 (1).
- CHEN, S.-L., JI, X.-S., YU, G.-C., TIAN, Y.-S., ÉS SHA, Z.-X. (2004): Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, 236 (1-4), 547–556. p.
- CHRISTENSEN, J. M., TIERSCH, T. R. (1996): Cryopreservation of channel catfish sperm: effect of cryoprotectant, straw size and extender formulation. *Theriogenology* 47: 639–645 p.
- CIERESZKO, A., DIETRICH, G.J., NYNCA, J., DOBOSZ, S., AND ZALEWSKI, T. (2014): Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. In: *Aquaculture*, 420–421, 275–281. p.
- CLOUD, J., AND PATTON, S. (2009): Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. 237-250. p. In: CABRITA, E., ROBLES, V., AND HERRÁEZ, P. (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton, Florida, USA: Taylor és Francis Group. 549. p.

- CONGET, P., FERRHDEZ, M., HERRERA, G., MINGUELL, J. C. J. (1996): Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture* 143 (19): 319-329. p.
- COSSON, J., BILLARD, R., LETELLIER, L. (1989): Rise of internal Ca²⁺ accompanies the initiation of trout sperm motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1989; 14: 424-434. p.
- COSSON, J. (2004): The Ionic and Osmotic Factors Controlling Motility of Fish Spermatozoa, *Aquaculture International* volume 12, 69–85. p.
- COSSON, J. (2008): Methods to analyse the movements of fish spermatozoa and their flagella. 63-102. p. In: ALAVI, S. M. H., COSSON, J., COWARD, K., AND RAFIEE, G. (Eds.): *Fish spermatology*. Oxford, United Kingdom: Alpha Science International Ltd., 465. p.
- CSERVENI-SZÜCS, R. (2013): A ponty (*Cyprinus carpio*) pikkelymintázat öröklődési modelljének revíziója, Doktori (PhD) értekezés, Keszthely 2013. 15-59 p.
- CSORBAI B., URBÁNYI B., BERNÁTH G., SZABÓ T., VÁRKONYI L., MOLNÁR J., CSENKI-BAKOS ZS. I., BOKOR Z. (2020): Kisméretű recirkulációs keltetők felhasználásának lehetősége Magyarországon. *Halászat-Tudomány* 6. évfolyam, 1. szám 13-18. p.
- CUEVAS-URIBE, R., AND TIERSCH, T. R. (2011): Estimation of Fish Sperm Concentration by Use of Spectrophotometry. 162-200. p. In: Tiersch T.R., and Green C.C., (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2nd Edition. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.
- CUEVAS-URIBE, R., CHESNEY, E. J., DALY, J., TIERSCH, T. R. (2013): Vitrification of sperm from marine fish: Effect on motility and membrane integrity. *Aquac. Res.* 1–15.
- CZUCZKA, P. (2002): A ponty (*Cyprinus carpio* L.) pikkelymintázat öröklődésének vizsgálata Diplomadolgozat, Keszthely.
- DADRAS, H., DZYUBA, B., COSSON, J., GOLPOUR, A., SIDDIQUE, M. A. M., LINHART, O. (2016): Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. *Aquaculture Research*, 2016, 1–12. p.
- DAY, F. (1880): *The fishes of Great Britain and Ireland (Vol. II.)*, Williams and Norgate, London, UK, pp 1-388. p.
- DEMÉNY, F., TRENOSZKI, M. M., VARGA, S. S., HEGYI, Á., URBÁNYI, B., ŽARSKI, D., ÁCS, B., MILJANOVIĆ, B., SPECZIÁR, A., MÜLLER, T. (2012): Relative Efficiencies of Artemia nauplii, Dry Food and Mixed Food Diets in Intensive Rearing of Larval Crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12: 691-698. p.
- DENNISTON, S. R., MICHELET S., AND GODKE, A. R. (2000): Principles of cryopreservation. 59-74. p. In: TIERSCH, R.T., AND MAZIK, M.P. (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 439. p.
- DICKERMAN, R. W., VILLA RAMIREZ, B. (1964): Dry ice: a new field technique *J. Mammal.*, 45 (70) (1964), 1-5. p.
- DIOGO, P., MARTINS, G., QUINZICO, I., NOGUEIRA, R., GAVAIA, J. P., CABRITA E. (2018): Electric ultrafreezer (−150 °C) as an alternative for zebrafish sperm cryopreservation and storage. *Fish Physiology and Biochemistry* volume 44, p. 1443–1455.
- DIOGO, P., MARTINS, G., NOGUEIRA, R., MARREIROS, A., GAVAIA, P. J., AND CABRITA, E. (2019). Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring skeletogenesis. *Cryobiology*. 91: 115-127. p.

- DING, F., LALL, S. P., LI, J., LEI, J., ROMMENS, M., ÉS MILLEY, J. E. (2010): Cryopreservation of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) for commercial application. *Cryobiology*, 63 (1), 56–60. p.
- DONG, Q, HUANG, C, TIERSCH T. R. (2007): Control of sperm concentration is necessary for standardization of sperm cryopreservation in aquatic species: evidence from sperm agglutination in oysters. *Cryobiology* 54, 87–98. p.
- DUNCAN, N., MYLONAS, C., MAÑANÓS, E. (2008): Reproduction and Control of Ovulation, Spermiation and Spawning in Cultured Fish. *Methods in Reproductive Aquaculture*, 3–80. p.
- DZYUBA, V., COSSON J. (2014): Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. *Reproductive Biology* 14: 165– 175. p.
- FAHY, G. M. (1986): The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. *Cryobiology*, 1986. 23, 1-13. p.
- FAHY G. M., MACFARLANE D. R., ANGELL C. A. AND MERYMAN H. T. (1984): Vitrification as an Approach to Cryopreservation. *Cryobiology*, 1984. 21, 407-426.
- FAO (1996): Aquaculture Production Statistics 1985-1994. In: FAO Fish Circular 815, 189 p.
- FAO (2012): Phenotypic characterization of animal genetic resources, FAO Animal Production and Health Guidelines. 158 p.
- FAO (2020): The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FASZER, K., DRAPER, D., GREEN, J. E., MORRIS, G. J., GROUT, B. W. W. (2006): Cryopreservation of horse semen under laboratory and field conditions using a Stirling Cycle freezer. *Cryo-Letters*. 27:179– 184. p.
- FAUVEL, C., SAVOYE, O., DREANNO, C., BILLARD, R., COSSON, J., SUQUET, M. (1999): Characteristics of captive seabass (*Dicentrarchus labrax*) sperm in relation to its fertilisation potential. *J. Fish Biol.* 54, 356–369. p.
- FAUVEL, C., SUQUET, M., COSSON, J. (2010): Evaluation of fish sperm quality. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 636–643. p.
- FIGUEROA, E., MERINO, O., RISOPATRON, J., ISACHENKO, V., SANCHEZ, R., EFFER, B. (2015): Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83: 238–245. pp
- FLAJŠHANS M., HULATA G. (2006): Common carp – *Cyprinus carpio*. In: “Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations.” GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. WP1 workshop “Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish”, Viterbo, Italy, 7 p.
- FRANKS, F. (1982): Water and Aqueous Solutions at Subzero Temperatures. Springer US, Boston, MA., 621 p.
- FREYHOF, J., KOTTELAT, M. (2008): *Cyprinus carpio*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T6181A12559362. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T6181A12559362.en>. Downloaded on 01 March 2021.
- FROESE, R. (1998): Insulating properties of styrofoam boxes used for transporting live fish. *Aquaculture*, 159 (3–4) (1998), 283-292. p.
- FROUFE, E., MAGYARY, I., LEHOCZKY, I., WEISS, S. (2002): mtDNA sequence data supports an Asian ancestry and single introduction of common carp into the Danube Basin. *Journal of Fish Biology*. 61: 301-304. p.
- GADEA, J., SELLES, E., MARCO, M. A., COY P., MATAS, C., ROMAR, R., RUIZ, S. (2004): Decrease in glutathione content in boar sperm after

- cryopreservation-Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders *Theriogenology*, 62, 690-701. p.
- GALLEGO, V., PEÑARANDA, D.S., MARCO-JIMÉNEZ, F., MAZZEO, I., PÉREZ, L., ASTURIANO, J. F. (2012): Comparison of two techniques for the morphometry study on gilthead seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa and evaluation of changes induced by cryopreservation. *Theriogenology* 77, 1078–1087. p.
- GALLEGO, V., CARNEIRO, P.C.F., MAZZEO, I., VÍLCHEZ, M.C., PEÑARANDA, D.S., SOLER, C., PÉREZ, L., ASTURIANO, J. F. (2013): Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology* 79, 1034–1040. p.
- GILMORE, J. A., LIU, J., GAO, D.Y., CRITSER, J. K. (1997): Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 12, 112–118.
- GILMORE, J. A., LIU, J., WOODS, E. J., PETER, A. T., CRITSER, J. K. (2000): Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod.* 15 (2): 335-43. p.
- GONÇALVES JR., L.P., MENDONÇA, P.P., PEREIRA, S.L., MATIELO, M.D., AMORIM, I. R. F. (2014): Densidade de estocagem durante a larvicultura do kinguio. *Boletim do Instituto de Pesca*, 40(4): 597-604. p.
- GORDA, S. (2004): Pontyfajták, tájfajták és hibridek összehasonlító teljesítményvizsgálata. Debrecen. Doktori értekezés. p. 1-139.
- GORDA, S. (2017): Ponty fajtaelismerést fenntartó teljesítményvizsgálat eredményei. p. 15-19.
- GRIER, H.J., NEIDIG, C. (2011): Gonads and Gametes of Fishes. 19–32. p. In: Tiersch, T.R., and Green, C.C. (Eds.): Cryopreservation in Aquatic Species. 2nd Edition. Baton Rouge, Luisiana, USA: World Aquaculture Society, 1003. p.
- GROSS, R., KOHLMANN, K., KERSTEN, P. (2002): PCR-RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 204, 507-516.
- GÜNTHER A. (1868): Catalogue of the fishes in the British Museum, Vol.7, Trustees of the British Museum, London, UK, 1-512. p.
- GWO, J.-C., JAMIESON, B.G.M., LEUNG, L.K.-P. (2009): Live preservation of fish gametes. *Reprod. Biol. Phylogeny Fishes* (Agnathans Bony Fishes) 395–484. p.
- GWO, J.-C. (2011): Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Tiersch T. R., Green C. C. (eds) Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd edn, 459–481. p.
- HARKA, Á. (1997): Halaink. Kiadja a Természet- és Környezetvédő Tanárok Egyesülete, Budapest, 175. p.
- HARKA, Á. ÉS SALLAI, Z. (2007): Magyarország halfaunája. Nimfea Természetvédelmi Egyesület, 174. o.
- HARKA, Á., NYESTE, K., NAGY, L., ERŐS, T. (2014). Bíborsügérek (*Hemichromis guttatus* Günther, 1862) a Hévízi-tó termálvizében. *Pisces Hungarici* 8, 29-34.
- HARVEY, B. (1983): Cryopreservation of Sharoteredon mossambicus spermatozoa, *Aquaculture* 1983. 32, 313–320. p.

- HARVEY, B., KELLEY, R. N., & ASHWOOD-SMITH, M. J. (1983): Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 20 (4), 432–439. p.
- HECKEL, J. J. (1836): Über einige neue, oder nicht gehiirig unterschiedene Cyprinen, nebst einer systematischen Darstellung der europäischen Gattungen dieser Gruppe. *Ann. Wien. Mus. Nat.*, 1: 219-234. p.
- HECKEL, J. AND KNER, R. (1858): Die Silsswasserfische der Bstreichischen Monarchic, mit Riicksicht auf die angranzenden Lander. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, 388 p.
- HERMAN, O. (1887): A magyar halászat könyve, K. M. Természettudományi Társulat, Budapest. 570-571. p.
- HERRANZ-JUSDADO, J. G., GALLEGO, V., ROZENFELD, C., MORINI, M., PÉREZ, L., ASTURIANO, J. F. (2019): European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes. *Aquaculture*, 506, 42–50. p.
- HORVÁTH, Á. (2001): Halgaméták mélyhütési módszereinek továbbfejlesztése. Doktori értekezés, Gödöllő.
- HORVÁTH, Á. (2007): Cryobank of common carp sperm, a tool for the preservation of genetic resources. Workshop a ponty (*Cyprinus carpio*) genetikai erőforrásainak jellemzése és megőrzése. (előadás) HAKI, Szarvas, december.
- HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B. (2020): Chapter 15 Sperm Cryopreservation of Aquatic Species. *Reproduction in Aquatic Animals* 321-334. p.
- HORVÁTH, Á., MISKOLCZI, E., URBÁNYI, B. (2003): Cryopreservation of common carp sperm. In: *Aquatic Living Resources*, 16, 457–460. p.
- HORVÁTH, Á., MISKOLCZI, E., MIHÁLFFY, S., ÖSZ, K., SZABÓ, K., AND URBÁNYI, B. (2007): Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. In: *Cryobiology*, 54, 251–257. p.
- 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. p.
- HORVÁTH, Á., LABBÉ, C., JESENŠEK, D., HOITSY, G., BERNÁTH, G., KACZKÓ, D., BOKOR, Z., URBÁNYI, B. (2015): Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 119–124. p.
- HORVÁTH L. (2000): Halbiológia és haltenyésztés: Tenyésztési alapok (214-413. o.). Mezőgazda Kiadó, Budapest. 274-275. p.
- HORVÁTH, L. (2018): A ponty szaporodásbiológiája és szaporítása. Csorbai B. és Urbányi B. (2018): A ponty (*Cyprinus carpio* L.) biológiája és tenyésztése. Szent István Egyetem Kiadó, Gödöllő, 35-65. p.
- HORVÁTH, L., ÉS URBÁNYI, B. (2000): Halak szaporodásbiológiája. 214-343. p. In: Horváth L. (szerk.). Halbiológia és Haltenyésztés. Második kiadás. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 440. p.
- HORVÁTH L., URBÁNYI B. (2004): Tógazdálkodás, Gödöllő, 30-32. p.
- HORVÁTH TAMÁS, G., HORVÁTH L., TÖLG I. (1982): Tógazdasági tenyészanyag termelés, Mezőgazdasági kiadó, Budapest.
- HORVÁTH, L., TAMÁS G., TÖLG I. (1984): Special methods in pond fish husbandry. Akadémiai Kiado and Halver Corporation, Budapest (Hungary) and Seattle (WA, USA), 1-148. p.

- HORVÁTH, L., TAMÁS, G., SEAGRAVE, C. (1992): Carp and Pond Fish Culture: Including Chinese Herbivorous Species, Pike, Tench, Zander, Wels Catfish and Goldfish. Fishing News Books, London
- HORVÁTH, L., CSORBAI, B., URBÁNYI, B., TAMÁS, G. (2009): Néhány halfaj ivadékanak táplálkozási adaptációja a zooplankton-kínálatjhoz. *Állati közlemények* 94 (2): 131-145. p.
- HU, E., YANG, H., TIERSCH, T. R. (2011): High-throughput cryopreservation of spermatozoa of blue catfish (*Ictalurus furcatus*): Establishment of an approach for commercial-scale processing. *Cryobiology*, 62 (1), 74–82. p.
- HUANG, C., DONG, Q., TIERSCH, T. R. (2004): Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. 62(6), 0–989.
- HULATA, G. (1995): A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture* 129:143-155.
- IRAWAN, H., VUTHIPHANDCHAI, V., NIMRAT, S. (2010): The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. In: *Animal Reproduction Science*, 122, 236–243. p.
- ISAYEVA, A., ZHANG, T., RAWSON, D.M. (2004): Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology* 49, 114–122. p.
- FJAMIESON, B. G. M. (1991): Fish evolution and systematics from sperm. Cambridge University Press, Cambridge. *Journal of Evolutionary Biology* 5, (4) 721-723. p.
- JAMIESON, B. G. M. (2009): Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes): Sperm Competition Hormones. 307-308. p.
- JAANUSKA H., JAANUSKA L. (2017): Test of different feeding regimes and diets for rearing *Cyprinus carpio* larvae in closed RAS. *Acta Biol. Univ. Daugavp.*, 17 (2): 157 – 167. p.
- JELKIĆ D., OPAČAK A., STEVIĆ I., OZIMEC S., JUG-DUJAKOVIĆ J., SAFNER R. (2012): Rearing carp larvae (*Cyprinus carpio*) in closed recirculatory system (RAS). *Ribarstvo* 70 (1): 9-17. p.
- JEZIERSKA, B., LUGOWSKA, K., LUGOWSKA, WITESKA, M., SARNOWSKI, P. (2000): Malformations of newly hatched common carp larvae. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities (EJPAU) Fisheries*, Volume 3, Issue 2: #01
- JI, X. S., CHEN, S. L., TIAN, Y. S., YU, G. C., SHA, Z. X., XU, M. Y., ZHANG, S. C. (2004): Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture*, 241 (1-4), 517–528. p.
- JOAQUIM, S., MATIAS, D., MATIAS, A.M., LEITÃO, A., SOARES, F., CABRAL, M. & GASPAR, M. B. (2016): The effect of density in larval rearing of the pullet carpet shell *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791) in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 47(4): 1055-1066. p.
- KAGAWA, H. (2013): Oogenesis in teleost fish. *Aqua BioSci. Monographs*. 6, 99-127. p.
- KALBASSI, M. R.; LORESTANI, R. AND MARAMAZI, J. G. (2013): Analysis of saline activator solution effects on sperm quality indices of *Barbus sharpeyi* by Image J software. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12: 357-377. p.
- KAISE, H., VINE, N. (1998): The effect of 2-phenoxyethanol and transport packing density on the post-transport survival rate and metabolic activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquarium Science and Conservation* 2: 1-7. p.

- KASPAR, V., HULAK, M., KOHLMANN, K., VANDEPUTTE, M., RODINA, M., GELA, D. AND LINHART, O. (2008): In vitro study on sperm competition in common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: *Cybium*, 32 (2), 303-306. p.
- KÁSA, E. (2017): Halsperma és – spermatogóniumok vitrifikációja. Doktori disszertáció, Gödöllő.
- KÁSA, E., VÍLCHEZ, M.C., MORINI, M., PEÑARANDA, D.S., PÉREZ, L., ASTURIANO, J.F., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2014): Vitrification of the sperm of European eel (*A. anguilla*): investigation of different protocols. *Aquaculture Europe 14. Adding value (AE2014)*. European Aquaculture Society annual meeting. San Sebastián (Spanyolország). Book of abstracts, p. 616–617. p.
- KÁSA, E., BERNÁTH, G., KOLLÁR, T., _ARSKI, D., LUJIC, J., MARINOVIC, Z., BOKOR, Z., HEGYI, Á., URBÁNYI, B., VÍLCHEZ, M.C., MORINI, M., PEÑARANDA, D.S., PÉREZ, L., ASTURIANO, J.F., HORVÁTH, Á. (2015): Vitrification of fish sperm. 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. Ancona (Italy). Book of abstracts, 106–107. p.
- KHOLODNYI, V.; GADÊLHA, H.; COSSON, J.; BORYSHPOLETS, S. (2019): How do freshwater fish sperm find the egg? The physicochemical factors guiding the gamete encounters of externally fertilizing freshwater fish. *Reviews in Aquaculture*, 1-28. p.
- KIME, D. E., EBRAHIMI, M., NYSTEN, K., ROELANTS, I., RURANGWA E., MOORE, H. D.M., OLLEVIER, F. (1996): Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicology* 36 (1996) 223-237. p.
- KIME, D. E., VAN LOOK, K. J. W., MCALLISTER, B. G., HUYSKENS, G., RURANGWA, E., OLLEVIER, F. (2001): Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. 425–433. p.
- KISS, I. (2000): A halak testfelépítése és biológiája. 17-67. p. In: HORVÁTH L. (szerk.). *Halbiológia és Haltenyésztés* második kiadás. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 440. p.
- KIRPICHNIKOV, V. S. (1967): Homologous hereditary variation and evolution of wild common carp *Cyprinus carpio* (in Russian). *Genetika (Moscow)* 8: 65 - 72. p.
- KIRPITCHNIKOV, V. S. (1999) Genetics and breeding of Common carp. INRA, Paris. 1-97. p.
- KOHLMANN K, KERSTEN P. (1999) Genetic variability of German and foreign common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture* 247:253-266 p.
- KOHLMANN, K., GROSS, R., MURAKAEVA, A., KERSTEN, P. (2003): Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquatic Living Resources*, 16: 421-431. p.
- KOHLMANN, K., KERSTEN, P., FLAJSHANS, M. (2005): Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture*, Special Issue: *Genetics in Aquaculture*, VIII. 247: 253-266. p.
- KOMEN, J. (1990): Clones of common carp, *Cyprinus carpio*: New perspectives in fish research. Ph.D. thesis. Agricultural University Wageningen. 169. p.
- KOPEIKA, E., KOPEIKA, J., ÉS ZHANG, T. (2007): Cryopreservation of Fish Sperm. *Methods in Molecular Biology*, 203–217. p.

- KOTTELAT, M. (1996): *Cyprinus carpio* (River Danube subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T6180A12556019. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6180A12556019.en>. Downloaded on 03 March 2021.
- KOVÁCS B., LEHOTCZKY I., KOVÁCS GY., GORDA S., PÉTERI A., BAKOS J. (2018): A ponty genetikája és eroforrásai. CSORBAI B. ÉS URBÁNYI B. (2018): A ponty (*Cyprinus carpio* L.) biológiája és tenyésztése. Szent István Egyetem Kiadó, Gödöllő, 9-10 p.
- KOWALSKI, R. K., CEJKO, B. I. (2019): Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135: 94–108. p.
- KÖRMENDI, E., ŐRI, I., CSEPREGI, A., IZÁPY, G., ÁGOTAI, GY. (2008): A Hévízi-tó környezeti, természeti és gyógy-idegenforgalmi jelentőségének bemutatása. Kutatási jelentés, tanulmány, Budapest 1-52. p.
- KRASZNAI, Z., MORISAWA, M., MORISAWA, S., KRASZNAI, Z. T., TRON, L., GASPAR, R. (2003): Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquatic Living Resources*. 2003; 16: 445-449. p.
- KRÓL, J., ŻARSKI, D., BERNÁTH, G., PALIŃSKA-ŻARSKA, K., KREJSZEFF, S., DŁUGOŃSKI, A., HORVÁTH, Á. (2018): Effect of urine contamination on semen quality variables in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. *Animal Reproduction Science* 197: 240–246. p.
- KUDO, S. (1980): Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Development, Growth és Differentiation*. 22, 403-414. p.
- KULESHOVA, L.L., GOUK, S.S., HUTMACHER, D.W. (2007): Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Biomaterials* 28: 1585–1596. p.
- KUMAR, S., MILLAR, J.D., WATSON, P. F. (2003): The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46: 246–253. p.
- LACHNER, E. A., ROBINS, C. R., COURTENAY, W. R. (1970): Exotic fishes and other aquatic organisms introduced into North America. *Smithsonian Contributions to Zoology*; no. 59:1-29. p.
- LAHNSTEINER F., WEISMANN T. AND PATZNER R. A. (1995): A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta f. fario* L., *Salmo trutta f. lacustris* L., *Coregonus* sp. *Aquaculture Research*, 1995. 26: 801-807. p.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER R. A. (1996): Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry* volume 15, 167–179. p.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., HORVATH, A., URBANYI, B., WEISMANN, T. (2000): Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54 (9), 1477–1498. p.
- LAHNSTEINER, F., MANSOUR N., WEISMANN T. (2002): The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). *Cryobiology* 45: 195-203. p.
- LAHNSTEINERA, F., BERGERB, 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 (2003) 829–841. p.

- LÁSZLÓ, V., SZALAI, CS., PAP, E., TÓTH, S., FALUS, A., OBERFRANK, F., SZALAI, CS. (2013): Genetika és genomika. Typotex Kiadó, Budapest. 17. p.
- LEHOCZKY, I., JENEY, Z., MAGYARY, I., HANCZ, C., KOHLMANN, K. (2005a): Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries., *Aquaculture* 247: 45-49. p.
- LEHOCZKY, I., MAGYARY, I., HANCZ, C. AND WEISS S. (2005b): Preliminary studies on the genetic variability of six Hungarian common carp strains using microsatellite DNA markers. *Hydrobiologia* 533.1: 223-228. p.
- LEHOCZKY, I. (2006): Doktori (PhD) értekezés, Kaposvár 2006. 7-9 p.
- LEHOCZKY, I., NAGY, ZT., MAGYARY, I., HANCZ, C., BAKOS, J., JENEY, Z. (2007): Genetic characterisation of cultured and natural-water populations of common carp (*Cyprinus carpio*) in Hungary, *Aquaculture* 272: 271-272. p.
- LEIBO, S. P. (1980): Water Permeability and its Activation Energy of Fertilized and Unfertilized Mouse Ova. *Journal of Membrane Biology*, 1980. 53: 179-188. p.
- LEUNG, L. K. P. (1991): Principles of biological cryopreservation. In: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Eds: JAMIESON, B. G. M. AND LEUNG, L. K. P. Cambridge University Press, Cambridge. *Journal of Evolutionary Biology*,
- LI, P., LI, Z.-H., DZYUBA, B., HULAK, M., RODINA, M., AND LINHART, O. (2010): Evaluating the Impacts of Osmotic and Oxidative Stress on Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Sperm Caused by Cryopreservation Techniques 1. *Biology of Reproduction*, 83(5), 852–858. p.
- LINHART, O., RODINA, M., COSSON, J. (2000): Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*. 2000 Nov; 41(3): 241-50. p.
- LIU, Q., LI, J., ZHANG, S., DING, F., XU, X., XIAO, Z., XU, S. (2006): An Efficient Methodology for Cryopreservation of Spermatozoa of Red Seabream, *Pagrus major*, with 2-mL Cryovials. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37 (3), 289–297. p.
- LIU, Q. H., MA, D. Y., XU, S. H., XIAO, Z. Z., XIAO, Y. S., SONG, Z. C., LI, J. (2015): Summer flounder (*Paralichthys dentatus*) sperm cryopreservation and application in interspecific hybridization with olive flounder (*P. olivaceus*). *Theriogenology*, 83 (4), 703–710. p.
- LU, J. C., HUANG, Y.F., LÜ, N.Q. (2014): Computer-aided sperm analysis: Past, present and future. *Andrologia* 46, 329–338. p.
- LUJIĆ, J., MARINOVIĆ, Z., SUŠNIK B. S., DJURDJEVIČ, I., KÁSA, E., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2017): First successful vitrification of salmonid ovarian tissue. *Cryobiology*, 76,154-157. p.
- ŁUGOWSKA K., SARNOWSKI P. (2011): Heads or tails—fish hatching. *Acta Ichthyol. Piscat.* 41 (1): 13–17. p.
- MAGNOTTI, C., CERQUEIRA, V., LEE-ESTEVEZ, M., FARIAS, J. G., VALDEBENITO, I., ÉS FIGUEROA, E. (2016): Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture*, 10 (1), 15–25. p.
- MAGYARY I. (1996): Halgaméták és halembriók mélyhütése. Doktori (PhD) értekezés; Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Gödöllő
- MA-HAL (2017): Jelentés a Szervezet működésének 2016. évi eredményeiről. MA-HAL, Budapest, 1-53. p.

- MA-HAL (2019): Jelentés a Szervezet működésének 2018. évi eredményeiről. MA-HAL, Budapest, 1-48. p.
- MAITLAND, P. S. (1995): The conservation of freshwater fish: Past and present experience. *Biological Conservation* 72, 259–270. p.
- MAKLER, A. (1978): A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil. Steril.* 30, 313–8. p.
- MARIA, A., CARNEIRO, P. (2012): Fish semen cryopreservation in Brazil: state of the art and future perspectives. *Ciência Animal* 22 (1): 124–131. p.
- MARINOVIĆ, Z., LUJIĆ, J., KÁSA, E., BERNÁTH, G., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2017): Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing. *General and Comparative Endocrinology* 245, 77–83. p.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, F., AND ADAMS L. S. (2009): Cryobiological material and handling procedures. 295-319. p. In: Cabrita, E., Robles, V., and Herráez, P., (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton, Florida, USA: Taylor és Francis Group. 549. p.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., PÉREZ-CEREZALES, S., GÓMEZ-ROMANO, F., BLANCO, G., SÁNCHEZ, J.A., HERRÁEZ, M. P. (2009): Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 71, 594–604. p.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., HORVÁTH, Á., LABBÉ, C., ZHANG, T., ROBLES V., HERRÁEZ, P., SUQUET, M., ADAMS, S., VIVEIROS, A., TIERSCH R. R., CABRITAA E. (2017): Cryobanking of aquatic species, *Aquaculture*. 1; 472: 156–177. p.
- MARTINS, C. I. M., PISTRIN, M. G., ENDE, S. S. W., EDING, E. H., ÉS VERRETH, J. A. J. (2009): The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 291 (1-2), 65–73. p.
- MARQUES, S., GODINHO G. P. (2004): Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes, *Brazilian Archives of Biology and Technology* Vol.47, n. 5: 799-804. p.
- MASSAR, B., DEY, S., DUTTA, K. (2011): An electron microscopic analysis on the ultra-structural abnormalities in sperm of the common carp *Cyprinus carpio* L. inhabiting a polluted lake, Umiam (Meghalaya, India). *Microscopy Research and Technique* 74: 998–1005, 2-9. p.
- MAZUR, P. (1963): Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *Journal of Cell Physiology*, 1963. 47, 347-369. p.
- MAZUR, P. (1984): Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, 125-142. p.
- MCCRIMMON, H. (1968): Carp in Canada. *Bulletin of Fisheries Research Board of Canada*, 165, 94 p.
- MERINO, O., SÁNCHEZ, R., RISOPATRÓN, J., ISACHENKO, E., KATKOV, I.I., FIGUEROA, E., VALDEBENITO, I., MALLMANN, P., ISACHENKO, V. (2012): Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: First report. *Andrologia* 44, 390–395. p.
- MERINO, O., RISOPATRÓN, J., SÁNCHEZ, R., ISACHENKO, E., FIGUEROA, E., VALDEBENITO, I., ISACHENKO, V. (2011): Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 125–131. p.

- MÉZES, M. (2018): A pontytakarmányozás alapjai. Csorbai B. és Urbányi B. (2018): A ponty (*Cyprinus carpio* L.) biológiája és tenyésztése. Szent István Egyetem Kiadó, Gödöllő, 95-126. p.
- MÉZES, M., BÓDIS, M. (2015): Az intenzív haltenyésztés infrastruktúrája; Takarmányozási rendszerek és takarmányok. (In:) CSORBAI B., PÉTERI A., URBÁNYI B. (2015): Intenzív haltenyésztés. Vármédia-Print Kft. 78-97. p.
- MISKOLCZI, E. (2007): A mélyhűtés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain. Doktori értekezés, Gödöllő.
- MISKOLCZI, E., MIHÁLFFY, S., VÁRKONYI, E.P., URBÁNYI, B., AND HORVÁTH, Á. (2005): Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. In: *Aquaculture*, 247, 119–125. p.
- MOCZARSKI, M. (1977): Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. In: Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Biological Sciences, 25 (3), 187-90. p.
- MOLNÁR, J., BOKOR, Z., VÁRKONYI, L., IZSÁK, T., FÜZES-SOLYMOSSI, E., LÁNG, Z.L., CSORBAI, B., TARNAI-KIRÁLY, ZS., URBÁNYI, B., AND BERNÁTH, G. (2020). The systematic development and optimization of large-scale sperm cryopreservation in northern pike (*Esox lucius*). *Cryobiology* 94, 26–31. p.
- MORISAWA, M. (2008): Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *Journal of Applied Ichthyology* 24: 362-370. p.
- MORISAWA, M., SUZUKI, K. (1980): Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*. 1980; 210: 1145-1147. p.
- MORISAWA, M., SUZUKI, K., SHIMIZU, H., MORISAWA, S. AND YASUDA, K. (1983): Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 95-103. p.
- MOTTA, J. H., VIDAL JUNIOR, M.V., GLÓRIA, L. S., NETO, M. A. C., FREITAS DA SILVEIRA, L., ANDRADE D. E. (2019): Technical and economic feasibility of food strategies in the hatchery of *Cyprinus carpio* (Cypriniformes, Cyprinidae) in a recirculating aquaculture system. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(4): 626-637. p.
- MOYLE, P. B. (1976): Inland fishes of California, University of California Press, Berkeley, CA, USA, 1-405. p.
- MUCHLISIN, Z. A. AND SITI-AZIZAH, M. N. (2010): Preliminary study on the natural extenders for artificial breeding of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *AAFL Bioflux*, 3(2) 119-124. p.
- MÜLLER, T., URBÁNYI, B., VÁRADI, B., BINDER, T., HORN, P., BERCSÉNYI, M., HORVÁTH, Á. (2004): Cryopreservation of sperm of farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35, 225-231. p.
- MYLONAS, C. C., FOSTIER, A., ZANUY, S. (2010): Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165 (2010) 516–534 p.
- ORBAN, L., WU Q. J. (2008): *Cyprinids*. In: Kole CR and Kocher TD (eds). *Genome Mapping and Genomics in Animals: Fishes and Aquatic Animals*. Springer Verlag, Berlin, Germany, 45-83. p.
- PARMENTIER, H. K. AND TIMMERMENS, L. P. M. (1985): The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *Journal of Embryol. Exp. Morph.*, 1985. 90, 13-32. p.

- PERCHEC, G., JEULIN, C., COSSON, J., ANDRÉ, F., BILLARD R. (1995): Relationship between sperm ATP and motility of carp spermatozoa, *Journal of Cell Science* 108 (Pt 2) (2): 747-53. p.
- PÉREZ, L., ASTURIANO, J.F., TOMÁS, A., ZEGRARI, S., BARRERA, R., ESPINÓS, E.J., NAVARRO, J.C., JOVER M. (2000): Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *J. Fish Biol.*, 57 (2000), 1488-1504. p.
- PLÓZER, I. (1977): A Hévízi-tó forrásbarlangjának feltárása. Karszt és Barlang, 1977. I-II. 65–66. p.
- PIIRONEN, J. (1993): Thawing and insemination. 11-13. p. In: Cryopreservation of fish eggs and sperm. Copenhagen, Denmark: Nordic Council of Ministers. 589. 28. p.
- PINTÉR, K. (1989): Magyarország halai. Akadémiai Kiadó, Budapest, 109-116. p.
- PINTÉR, K. (1992): Magyarország Halai. Budapest: Akadémiai Kiadó, 202.p.
- PINTÉR, K. (2002): Magyarország halai; Biológiájuk és hasznosításuk. Második, átdolgozott kiadás. Akadémia Kiadó, Budapest. 1-232 p.
- PINTÉR, K. (2015): Magyarország Halai. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 166-169. p.
- POLGE, C., SMITH, A. U., PARKES, A. S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666. p.
- RAFIQUZZAMAN, S. M. (2004): Cryopreservation of *Labeo rohita* and *Oreochromis niloticus* spermatozoa for quality seed production. M.S. Thesis. Department of Fisheries Biology and Genetics, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, Bangladesh
- RANDALL, D., ÉS TSUI, T. K. (2002): Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45 (1-12), 17–23. p.
- REDONDO-MÜLLER, C., COSSON, M. P., COSSON, J. AND BILLARD, R. (1991): Invitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. *Mol. Rep. Dev.* 29, 259-270. p.
- ROOSEN-RUNGE, E. C. (1977): The process of spermatogenesis in animals. London; New York: Cambridge University Press, 1977. 170-200. p.
- RURANGWA, E., KIME, D.E., OLLEVIER, F., AND NASH, J. P. (2004): The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. In: *Aquaculture*, 234 (1-4), 1-28. p.
- SAAD, A., BILLARD, R., THERON, M. C., AND HOLLEBECQ, M. G. (1988): Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. In: *Aquaculture*, 71, 133–150. p.
- SADEGHI, S., NUÑEZ, J., SOLER, C., SILVESTRE, M. A. (2017): Effect of the activation media with different osmolality and cool storage on spermatozoa motility parameters over time in zebrafish, *Danio rerio*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 17: 111-120. p.
- SALAM, M. A. (2005): Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. M.S. Thesis. Department of Fisheries Biology and Genetics, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh.
- SARDER, M. R. I. (2004): Application of cryopreservation in the Indian major carps (*Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrhinus cirrhosus*) and other culture species for their quality seed production. SUFER, DFID Final Report, May 2004.
- SARIG, S. (1966): Synopsis of biological data on common carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Near East and Europe). FAO Fish. Synops., (31.2).
- SAROSIEK, B., CEJKO, B. I., GLOGOWSKI, J., TARGOŃSKA, K., ŻARSKI, D., KOWALSKI, R. K., KUCHARCZYK, D. (2012): Spermatozoa motility and short-term sperm storage of colourful orfe (*Leuciscus idus aberr orfus*). *Italian Journal of Animal Science*, 11 (3), e50.

- SCHAPERCLAUS, W. (1963): Die Züchtung von Karauschen mit Köchster Leistungsfähigkeit. *Zeitung für Fisherei*. 1. 2. 19-67. p.
- SCHUSTER, T. G., KELLER, L. M., DUNN, R. L., OHL, D. A., SMITH, G. D. (2003): Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Hum. Reprod.* 18, 788–795. p.
- SCHULZ, R. W., DE FRANÇA L. R., LEGAC F., CHIARINI-GARCIA H., NOBREGA R. H., MIURA T. (2010): Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 390–411. p.
- SCHÜFFNER, A., MORSHEDI, M., OEHNINGER, S., CARVALHO, N. S., OLIVEIRA, M. T. C. R., PLACIDO, T., URBANETZ, A. A. (2008): Apoptosis and lipid peroxidation before and after cryopreservation. *Reprod Clim.* 2008; 23: 176–184. p.
- SCOTT, A. P., BAYNES, S. M. (1980): A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17: 707–739. p.
- SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A., KOTAS, P., ŠTĚRBA, J., RODINA, M., DZYUBA, B., COSSON, J., AND LINHART, O. (2016). Protein profile of seminal plasma and functionality of spermatozoa during the reproductive season in the common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*, 83 (11) 968-982. p.
- SHEPHERD, C.J. ÉS BROMAGE, N. R. (1992): Intensive Fish Farming, Wiley-Blackwell kiadó, 420. p.
- SMITH, C., WOOTTON R. J. (2016): The remarkable reproductive diversity of teleost fishes. *Fish and Fisheries* 17: 1208–1215. p.
- SPECZIÁR, A. (2004): Life history pattern and feeding ecology of the introduced eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in a thermal spa under temperate climate, of Lake Hévíz, Hungary. *Hydrobiologia* 522, 249–260. p.
- 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) 37-52. p.
- STEFFENS, W. (1980): Der Karpfen. A. Ziemsen Verlag Wittenberg Lutherstadt. 5 Auflage.
- STEIN, H., BAYRLE, H. (1978): Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1978, 18 (4), 1073-1076. p.
- STREIT-JR, D.P., GODOY, L.C. DE, RICARDO PEREIRA, R., DARCI CARLOS, F., MELANIE, D., ZHANG, T. (2014): Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species, in: Recent Advances in Cryopreservation. p. 130.
- STOSS, J. (1983): Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. 9. 305-350. p. In: Hoar, W., S., Randell, D.J., and Donaldson, E.M., (Eds.): *Fish Physiology*. New York, New York, USA: Academic Press. 477. p.
- STOSS, J., AND HOLTZ, W. (1981): Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent. In: *Aquaculture*, 25, 217. p.
- SUQUET, M., DREANNO, C., FAUVEL, C., COSSON, J., BILLARD, R. (2000): Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31 (3): 231–243. p.
- SVETOVIDOV, A. N. (1933): Über den europäischen und ostasiatischen Karpfen (*Cyprinus carpio*) *Zool. Anzeiger*, 104 p. 269 – 292. p.
- SZABÓ, G., MÜLLER, T., BERCSÉNYI, M., URBÁNYI, B., KUCSKA, I. B., HORVÁTH, A. (2005): Cryopreservation of European eel (*Anguilla*

- anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. Short communication. In: *Acta Biologica Hungarica*, 56, 173–175. p.
- SZABÓ, T., SZABÓ, R., URBÁNYI, B., HORVÁTH, L. (1998): A tógazdasági nemes ponty indukált szaporításának eredményei az ikrások beérésére és ikraproduktumára vonatkozó adatok elemzése alapján, *Halászat*, 91 (4) 151-156. p.
- SZABÓ, T., HORVÁTH, L., ÉS URBÁNYI, B. (2000): Halak szaporodásbiológiája. 168-205. p. In: Horváth L. (szerk.). Halbiológia és Haltenyésztés. Második kiadás. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 440.p.
- SZABÓ T. 2013: Rázóasztal alkalmazása halikra duzzasztása során. In: *Halászatfejlesztés* 35. – *Fisheries and Aquaculture Development* Vol. 35, ISSN:1219-4816; ISBN: 978-963-7120-33-6; Published by HAKI, Szarvas
- SZLAMINIŃSKA, M., PRZYBYŁ, A. (1986): Feeding of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae with an artificial dry food, living zooplankton and mixed food. *Aquaculture*, 54 (1-2), 77–82. p.
- SULTANA, M., NAHIDUZZAMAN, M., HASSAN, M., KHANAM, M., AND HOSSAIN, M. (2010): Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *University Journal of Zoology*, Rajshahi University, 28, 51–55. p.
- SZUVOROV, E. (1948): Osznovú ichtiologii. Szovjetszkaja Nauka, 1-575. p.
- TAKÁCS, P., MAÁSZ, G., VITÁL, Z., HARKA, Á. (2015): Akvárium halak a Hévízi-lefolyó termálvizében. *Pisces Hungarici* 9, 59-64. p.
- TAKEMURA, A., RAHMAN, MD. S., NAKAMURA, S., PARK, Y. J., AND TAKANO, K. (2004): Lunar Cycles and Reproductive Activity in Reef Fishes with Particular Attention to Rabbitfishes. *Fish and Fisheries*, 5, 317–328. p.
- TATENO, H., WAKAYAMA, T., WARD, W.S., AND YANAGIMACHI, R. (1998): Can alcohol retain the reproductive and genetic potential of sperm nuclei? Chromosome analysis of mouse spermatozoa stored in alcohol. *Zygote* 6: 233–238. p.
- TIERSCH, T. R. (2000): Introduction. In: Cryopreservation in Aquatic species (TIERSCH, T. R. & MAZIK, P. M., eds.), World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. xv-xvi. p.
- TIERSCH, T. R. (2001): Cryopreservation in Aquarium Fishes. *Marine Biotechnology*, 3 (0), S212–S223. p.
- TIERSCH, T. R. (2011): Process pathways for cryopreservation research, application and commercialization. 646-671. p. In: TIERSCH T. R. AND GREEN C. C. (Eds.): 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. In: Roldan E, Gomendio M (eds) *Spermatology*, 493–508. p.
- TREMMER, I. (2012): Egyre jobban elismerik a balatoni sudárpontyot. 2012. 01. 23. <https://www.veol.hu/hirek/egyre-jobban-elismerik-a-balatoni-sudarpontyot-1303003/>
- TÖLG, I., TASNÁDI, R. (1996): Halgazdálkodás I.-II., Magyar Országos Horgász – szövetség (MOHOSZ), Budapest. I/190-191 p., II/ 498-501. p.
- UDVARI, ZS. (2017): Magyarországon elismert pontyfajták, Földművelésügyi Minisztérium, Horgászati és Halgazdálkodási Főosztály, Iktatószám: HHgF/268/2017. 1. p.
- URBÁNYI, B. (2011): Egyes gazdasági haszonhalaink hímivartermékeinek mélyhűtése, a technológia standardizálásának kidolgozása és gyakorlati alkalmazása. MTA Doktori értekezés, Gödöllő.

- URBÁNYI, B. (2015): Az intenzív haltenyésztés története, definíciói. Csorbai B., Péteri A., Urbányi B. (2015): Intenzív haltenyésztés. Vármédia-Print Kft. 5-10 p.
- URBÁNYI B. ÉS STASZNY Á. (2018): A faj jelentőségé, trendek hazánkban, Európában és a világban. CSORBAI B. ÉS URBÁNYI B. (2018): A ponty (*Cyprinus carpio* L.) biológiája és tenyésztése. Szent István Egyetem Kiadó, Gödöllő, 163-175. p.
- USANDI B., SAINI V. P., OJHA M. L., JAIN H. K. (2019): Effect of larval rearing density on growth and survival of koi carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2019; 7(2): 548-553. p.
- VALENTI, W. C., BARROS, H. P., MORAES-VALENTI, P., BUENO, G. W., CAVALLI, R. O. (2021): Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, Volume 19, March 2021, 100611
- VARELA JUNIOR, A. S., GOULARTE, K. L., ALVES, J. P., PEREIRA, F. A., SILVA, E. F., CARDOSO, T. F., JARDIM, R. D., STREIT JR, D. P., CORCINI, C. D. (2015): Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Anim. Reprod. Sci.* 157, 71–77. p.
- VÁRKONYI, L. (2015): Új módszer a veszélyeztetett halak védelmében (hévizi törpenövésű vadponty indukált szaporítása az élőhelyén). Diplomadolgozat, Gödöllő.
- VAN DER WALT, L. D., VAN DER BANK, F. H., STEYN, G. J. (1993): The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for the conservation of genetic diversity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 106, 313–318. p.
- VANDEPUTTE, M. (2003): Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquatic Living Resources* 16 (5) 399-407. p.
- VANHAECKE P., VRIEZE DE L., TACKAERT W., SORGELOOS P. (1990): The Use of Decapsulated Cysts of the Brine Shrimp *Artemia* as Direct Food for Carp *Cyprinus carpio* L. Larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 21.
- VARGA, D., MÜLLER, T., SPECZIÁR A., HANCZ, CS., SZABÓ A. (2011): A hévizi törpenövésű vadponty zsírsavösszetétele. XXXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, HAKI. Szarvas, 2011. máj. 25-26. abstract book 28. p.
- VARGA, D., MÜLLER, T., SPECZIÁR, A., FÉBEL, H., HANCZ, CS., BÁZÁR, GY., SZABÓ, A. (2013): Note on the special fillet fatty acid composition of the dwarf carp (*Cyprinus carpio carpio*) living in thermal Lake Hévíz, Hungary. *Acta Biologica Hungarica* 64: 38–48. p.
- VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M., MEDINA-ROBLES, V. M., AND CRUZ-CASALLAS, P. E. (2006): Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. In: *Aquaculture*, 256, 264–271. p.
- VELÍŠEK, J., SVOBODOVÁ Z. (2004): Anaesthesia of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: Acute Toxicity and Effects on Biochemical Blood Profile. *Acta Vet. Brno* 2004, 73: 247-252. p.
- VÍLCHEZ, M.C., MORINI, M., PEÑARANDA, D., PÉREZ, L., DEPINCÉ, A., KÁSA, E., LABBÉ, C., HORVÁTH, Á., ASTURIANO, J. F. (2014): Comparison of two validated methods for cryopreserving European eel (*A. anguilla*) sperm: standardization as a target. *Aquaculture Europe* 14. Adding value (AE2014). European Aquaculture Society annual meeting. San Sebastián (Spain). Book of abstracts, p. 1418-1419. p.

- VIVEIROS, A. T. M., SO, N., KOMEN, J. (2000): Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. 54(9), 0–1408. p.
- VIVEIROS, A. T. M., GODINHO, H. P. (2009): Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 137–150. p.
- VOOREN, C. M. (1972): Ecological aspects of the introduction of fish species into natural habitats in Europe, with special reference to the Netherlands. *J. Fish Biol.*, 4: 565-83. p.
- WANG, N., TELETCHEA, F., KESTEMONT, P., MILLA, S., FONTAINE, P. (2010): Photothermal Control of the Reproductive Cycle in Temperate Fishes: Photothermal Control of Reproduction. *Reviews in Aquaculture*, 2, 209–222. p.
- WILSON-LEEDY, J. G., AND INGERMANN, R. L. (2007): Development of a novel CASA system based on open-source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. In: *Theriogenology*, 67 (3), 661-672. p.
- WILSON-LEEDY, J.G., KANUGA, M.K., INGERMANN, R. L. (2009): Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology*, 71: 1054–62. p.
- WHITTINGHAM, D. G. (1980): Principles of embryo preservation. 65-83 p. In: Ashwood-Smith M. J. and Farrant J. (Eds.): *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. Tunbridge Wells, Kent, England: Pitman Medical Ltd., 323. p.
- WOELDERS, H., WINDIG, J., HIEMSTRA, S. J. (2012): How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (Farm) animals. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 264–273 p.
- WOYNÁROVICH, E. (1962): Hatching of Carp eggs in Zug glas and breeding of carp larvae until an age of 10 days. *Bamidgch*, 14.2: 38-46. p.
- WOYNÁROVICH, E., HORVÁTH, L., (1980): The artificial propagation of warm-water finfishes. A manual for extension. 4. Artificial propagation of finfish *FAO Fish. Tech. Pap.*, (201): 183 p.
- WOYNÁROVICH, E., WOYNÁROVICH, A. (1980): Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. *Aquacult. Hung.* 2, 19–21. p.
- YAMAGAMI K. (1972): Isolation of a choriolytic enzyme (hatching enzyme) of the teleost, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology* 29 (3) November 1972, 343-348. p.
- 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. p.
- YANG, S., HAN, L., HUANG, R., LIUFU, Y., MENG, Z., LIN, H. (2017): Optimization of conditions for the cryopreservation of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) sperm. *Cryobiology* 76, 104–110. p.
- YAO, Z., RICHARDSON, G. F., CRIM, L. W. (1999): A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture* 174, 183– 193. p.
- YASUI, G. S., ARIAS-RODRIGUEZ, L., FUJIMOTO, T., ARAI, K. (2008): Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice *Cryo-Letters*, 29 (5) (2008), 383-390. p.

- YAVAŞ, İ., BOZKURT, Y., ÉS YILDIZ, C. (2013): Cryopreservation of scaly carp (*Cyprinus carpio*) sperm: effect of different cryoprotectant concentrations on post-thaw motility, fertilization and hatching success of embryos. *Aquaculture International*, 22 (1), 141–148. p.
- YOSHIDA M., KAWANO N., YOSHIDA K. (2008): Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 3446– 3457. p.
- ŻARSKI, D., TARGOŃSKA, K., KREJSZEFF, S., KWIATKOWSKI, M., KUPREN, K. AND KUCHARCZYK, D. (2011): Influence of stocking density and type of feed on the rearing of crucian carp, *Carassius carassius* (L.), larvae under controlled conditions. In: *Aquaculture International*, 19: 1105-1117. p.
- ZHANG, X., LIU, Y. (1991): Study of cryopreservation of fish spermatozoa. *Acta Sci. Nat. Univ. Norm. Hunanensis*, 14: 255-259. p.
- ZHOU, J. F., WU, Q. J., YE, Y. Z., TONG, J. G. (2003): Genetic divergence between *Cyprinus carpio carpio* and *Cyprinus carpio haematopterus* as assessed by mitochondrial DNA analysis, with emphasis on origin of European domestic carp. *Genetica*. 2003 Sep; 119 (1): 93-7. p.
- ZHOU, J., WU, Q., WANG, Z., YE, Y. (2004): Genetic Variation Analysis within and among Six Varieties of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in China Using Microsatellite Markers. *Russian Journal of Genetics*, 40 (10) 1144-1148. p.
- ZIMMER, A. M., WRIGHT, P. A., ÉS WOOD, C. M. (2017): Ammonia and urea handling by early life stages of fishes. *The Journal of Experimental Biology*, 220 (21), 3843–3855. p.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori munkám során számos ember segítette kutatásaimat, részt vett vizsgálataimban, illetve szakmai tanácsokkal látott el. Ez úton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni mindazon személyek, szervezetek, vállalkozások számára, akik valamilyen módon hozzájárultak dolgozatom létrejöttéhez.

Legnagyobb köszönettel **Dr. Bernáth Gergely témavezetőmnek** tartozom. Segítsége és útmutatása nélkül ez a dolgozat nem jött volna létre. Idejét és energiáját nem sajnálva látott el szakmai tanácsokkal. A lassan egy évtizede tartó ismeretségünk ideje alatt számtalanszor bebizonyosodott kiváló szakmai rátermettsége és elhivatottsága. Hálás vagyok neki továbbá, hogy az elmúlt években barátomként is mellettem állt.

Köszönet illeti még társ-témavezetőmet **Dr. Urbányi Bélát**, aki egyben a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet vezetője. Szakmai munkámat mindvégig messzemenően támogatta. A kutatásom szervezésében, valamint a források biztosításában hatalmas szerepet vállalt. Teljes doktoranduszi munkám alatt messzemenően támogatott mind szakmailag, mind emberileg.

Köszönetemet szeretném kifejezni továbbá kollegámnak, **Dr. Bokor Zoltánnak**. Szerencsésnek mondhatom magamat, hogy személyében egy jó szakembert, kollégát és barátot ismerhettem meg az elmúlt közel tíz évben.

Az Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola vezetőjének, **Dr. Mézes Miklósnak** köszönöm a doktori cselekményem során nyújtott folyamatos, szakmai irányítást.

Hálával tartozom még **Dr. Csorbai Baláznak** és **Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imrének**. Segítségük révén tudtam a zárt intenzív recirkulációs rendszerben történő lárwanevelést és a lárvamorfológiai vizsgálatokat a lehető legtökéletesebben elvégezni.

A hévízi vadpontyok tavi befogása során tett jelentős segítségükért külön köszönettel tartozom még **Dr. Ferincz Árpádnak**, **Dr. Staszny Ádámnak**, valamint **Juhász Verának** (MATE, AKI Természetesvízi Halökológiai Tanszék).

Szeretném köszönetemet kifejezni továbbá **Dr. Horváth László** professzor úrnak is, aki a Halgazdálkodási Tanszék alapítójaként, mentoromként nagyban hozzájárult szakmai tudásom megalapozásához.

Közvetlen kollégáimnak és doktorandusz társaimnak is szeretném köszönetet mondani. **Molnár József**, **Nagy Borbála** és **Birkó-Sulyok Zita** segítőkész munkája

nélkül még több akadállyal néztem volna szembe munkám során. Köszönettel tartozom, az évek során szakmai vezetésem alatt dolgozó hallgatóknak, akik közül már van, akit kollégámnak is tekinthetek. **Láng Levente Zete, Izsák Tibor, Bartucz Tamás és Takács Ádám** segítségével nélkül nem tudtam volna a néha akár hajnalba nyúló kísérleteket megvalósítani. Továbbá áldozatos munkájuk nélkül a tanszéki zárt intenzív recirkulációs rendszer nem működött volna kifogástalanul.

Hálámat szeretném kifejezni továbbá **Dr. Müller Tamásnak** és **Dr. Speciár Andrásnak**. Szakmai segítségük révén ismerhettem meg a Hévízi-tavat és számos elővizsgálatban voltak a segítségemre. Köszönöm továbbá **Dr. Szabó Tamásnak**, hogy konzulensként, az egyetemi alapképzésem során a szakmát megszerettette velem.

Köszönet illeti többek között a **MATE, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet teljes kollektíváját**. A kollégáim segítségével nélkül nem tudtam volna megvalósítani doktori munkámat. Támogatásuk és adminisztratív tevékenységük révén egyaránt megkönnyítették a mindennapjaimat. Továbbá hálával tartozom még a **Doktori és Habilitációs Központ (Gödöllői Campus)** kollegináinak **Törökné Hajdú Mónikának, Megyeri Ágnesnek, Tassy Zsuzsannának** és **Simáné Dolányi Editnek**, akik a doktori munkám során az ügyintézésben a segítségemre voltak.

Köszönet illeti még a Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt. munkatársait, köztük vezérigazgatóját, **Szári Zsoltot, Fodor Ferenc** haltermelési igazgatót, illetve **Fekete Áront** a cég Balatonlelleli tógazdaságának vezetőjét, valamint **Koltai Tamást** a Buzsáki tógazdaság vezetőjét, hogy anyaállományt biztosítottak számomra és szakmai tanácsokkal láttak el kísérleteim során. Köszönettel tartozom továbbá a **Hévízgyógyfürdő és Szent András Reumakórháznak**, valamint **Németh Györgynek**, a szervezet környezetvédelmi vezetőjének, akik minden alkalommal szabad bejárást biztosítottak számomra a tóra. Köszönet illeti még az **AquaBioTech Group** máltai székhelyű cégcsoportját, azon belül **Bardócz Tamást**, a cég fő tanácsadóját, az intenzív recirkulációs rendszerekről szerzett tapasztalati tudásom bővítéséért.

Köszönettel tartozom a következő pályázatoknak, melyek támogatásával kísérleteimet végeztem: **GINOP-2.3.2-15-2016-00004** „A balatoni horgászati célú halgazdálkodás fenntarthatóvá tételének megalapozása a halfauna rekonstrukciója és a táplálékbázis hasznosulásának vizsgálatával alap- és alkalmazott kutatási módszerekkel” című projektnek, az **EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008** számú „Innovatív tudományos műhelyek a hazai agrár felsőoktatásban” nevű projektnek, az

ÚNKP-19-3-I kódszámú **Új Nemzeti Kiválóság Program** Felsőoktatási Doktori Hallgatói, Doktorjelölti Kutatói, valamint Bernáth Gergely Bolyai János Kutatási (BO/00508/18/4) Ösztöndíjának és az **Európai Halászati Alap, Halászati Operatív Program III. tengelye** (“Európai Halászati Alap: a megújuló halászatért”- az Európai Unió és Magyarország támogatásával) pályázatnak.

Végül, de nem utolsó sorban hálámat szeretném kifejezni **Családomnak**. Kutatómunkám során végig lelkesítettek és a támaszaim voltak. Személyes támogatásuk nélkül ez a dolgozat nem valósulhatott volna meg. Családom tagjai közül szeretném kiemelni **nagyapámat** és **édesapámat**, akik fiatal koromban számtalan órát töltöttek velem a vízparton horgászat közben. Továbbá meg szeretném említeni **bátyámat**, aki a legtöbb támogatást nyújtotta a számomra rögzös doktoranduszi munkám során.