



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

Doktori értekezés

Molnár József

Gödöllő
2024

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztési tudományok

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

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

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

.....

.....
A programvezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	5
1.1. Célkitűzések.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. A csuka gazdasági jelentősége.....	8
2.2. A csuka szaporodásbiológiai jellemzői.....	9
2.2.1. A here felépítése	9
2.2.2. A spermatogenezis folyamata és a spermium felépítése.....	11
2.2.3. A petefészek felépítése	13
2.2.4. Az oogenezis folyamata és az ikra jellemzése.....	14
2.2.5. A csuka szaporodásbiológiai sajátosságai	15
2.3. A csuka keltetőházi szaporítása és előnevelése.....	17
2.3.1. A csuka indukált szaporítása	17
2.3.2. A csukalárva keltetőházi előnevelési technológiája	22
2.4. A sperma mélyhűtése	23
2.4.1. A spermamélyhűtés fizikai és kémiai alapjai	25
2.4.2. Spermamintavétel	26
2.4.3. Spermaminőség vizsgálat	27
2.4.4. Hűtőmedium.....	32
2.4.5. Ekvilibráció	33
2.4.6. A mélyhűtés módszerei.....	33
2.4.7. Tárolás és felolvasztás	35
2.5. A csukaalakúak rendjébe tartozó fajok korábbi spermavizsgálati és - mélyhűtési eredményei.....	36
2.6. A csuka korábbi spermavizsgálati és -mélyhűtési eredményei.....	38
2.7. Nagy mennyiségű halsperma mélyhűtés és a mélyhűtött sperma gyakorlati alkalmazásának eddigi eredményei.....	40
2.8. Mélyhűtött spermából származó hallárva fejlődéstani vizsgálatai.....	42
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	44
3.1. A kísérleti állományok tartási technológiája, kezelése	44
3.1.1. A halak hormonális kezelése.....	45
3.1.2. Az ivartermékek gyűjtésének módszere	46
3.2. A spermasűrűség meghatározása	47
3.3. A sperma motilitás vizsgálata	48
3.4. Spermamélyhűtési vizsgálatok.....	49

3.4.1. A spermamélyhűtési és a felolvasztási kísérletek általános folyamatai	49
3.4.2. Kísérleti elrendezés	52
3.4.3. A hormonális kezelés, különböző spermamintavételi módszerek és hígítók összehasonlítása	53
3.4.4. Nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának vizsgálatai	55
3.4.5. Nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett keltetőházi csukaszaporítás, valamint rövidtávú lárvanevelés vizsgálatai	56
3.5. Az adatok elemzése és értékelése	61
4. EREDMÉNYEK	62
4.1. A hormonális kezelés, különböző spermamintavételi módszerek és hígítók összehasonlításának eredményei	62
4.2. Nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának eredményei	65
4.3. Nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett keltetőházi csukaszaporítás, valamint rövidtávú lárvanevelés vizsgálatainak eredményei	70
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	79
5.1. Következtetések	79
5.1.1. A különböző spermamintavételi módszerek és hígítók tesztelésére irányuló vizsgálatok eredményeiből levonható következtetések	79
5.1.2. A nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának eredményeiből levonható következtetések	81
5.1.3. A nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett keltetőházi csukaszaporítás, valamint rövidtávú lárvanevelési vizsgálat eredményeiből levonható következtetések	85
5.2. Javaslatok	90
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	91
7. ÖSSZEFOGLALÁS	92
8. SUMMARY	95
9. MELLÉKLETEK	98
M.1. Irodalomjegyzék	98
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	121

1. BEVEZETÉS

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

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

A sperma fagyasztásával a tenyésztésbe vont tejesek számát optimalizálhatni lehetne, ami csökkenthetné a tartási és termelési költségeket (CEJKO et al. 2020b). A mélyhűtött sperma korlátlan ideig tárolható, valamint könnyen hozzáférhetővé is válhat (CABRITA et al. 2010; URBÁNYI 2011). A halsperma mélyhűtésről már az 1950-es években is készültek publikációk, azonban kevés halfaj esetén sikerült olyan magas színvonalon optimalizált és könnyen ismételhető módszert kidolgozni, amely átültethető a keltetőházi és tenyésztési gyakorlatba (URBÁNYI 2011; ASTURIANO et al. 2017). A csuka spermamélyhűtésével kapcsolatban alacsony számú publikáció készült el napjainkig, amelyekben számos esetben eltérőek a mélyhűtési protokollok, a felolvasztási módszerek, a hígítási arányok, a hígítók és az aktiváló oldatok. Az 1990-es évektől kezdődően a csukasperma fagyasztásához kapcsolódó kísérletekben alkalmazott műszalmák térfogata az adott kutatók kísérletbeállításaitól függően 0,25-1,2 ml között változott. A további kutatások során indokolt a nagyobb űrtartalmú műszalmák mélyhűtési technológiájának fejlesztése is (LAHNSTEINER et al. 1998; LAHNSTEINER 2000; ZHANG et al. 2011; DIETRICH et al. 2016; BERNÁTH et

al. 2017b; CEJKO et al. 2020b). A csukaszaporítás módszertani fejlesztése hozzájárulhat a termelés hatékonyságának növeléséhez (CEJKO et al. 2020b).

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

1.1. Célkitűzések

Doktori munkám megkezdése előtt a következő célokat tűztem ki:

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

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A csukafélék (*Esocidae*) családján belül az *Esox* nembe tartozó fajok holarktikus elterjedésének köszönhetően kiemelkedő szerepük van az északi félteke halászati-horgászati ágazatában (KOTTELAT & FREYHOF 2007; DENYS et al. 2014; GANDOLFI et al. 2015; NELSON et al. 2016).

2.1. A csuka gazdasági jelentősége



1. ábra: A csuka (*Esox lucius*) (kép: Molnár József).

A csuka (1. ábra) jelentősége egyaránt megmutatkozik halászati, horgászati, és ökológiai szempontból is (SZABÓ 2016a). Az elmúlt években az ökológiai kutatások kedvelt modellszervezetévé is vált, ezért tudományos jelentősége folyamatosan növekszik (POSPISILOVA et al. 2019; TAKÁCS et al. 2022). A csuka tágtűrésű halfaj, környezeti tényezők széles spektrumához képes alkalmazkodni (PINTÉR 2015; PIERCE et al. 2013; ŽARSKI et al. 2013; SKOV et al. 2018; RÉALIS-DOYELLE et al. 2022). A halközösségek összetétele, eloszlása szempontjából meghatározó édesvízi ragadozó (HARVEY 2009; CRANE et al. 2015; LARSSON et al. 2015). Elfogyasztott tápláléka tekintetében nem válogat, a vízi gerinctelenektől a halakig terjed és kiemelkedő ökológiai szerepet tölt be a táplálékláncban (CRAIG 2008; NILSSON & BRONMARK 2000; JACOBSON et al. 2019; HUNTINGFORD 2020). Hazánk legnagyobb arányban előforduló ragadozó halfaja (BÍRÓ 2016; TAKÁCS et al. 2017). Az általa leginkább kedvelt, a vízínövénnel benőtt területekből és a táplálkozási stratégiájából adódóan hazánkban elsősorban kisüzemi méretben tenyésztik.

A csuka egyre népszerűbb sporthal a horgászok körében. Folyamatosan nő iránta a kereslet (SZABÓ 1997a; ARLINGHAUS et al. 2009; BOJTÁRNÉ LUKÁCSIK et al. 2020; CEJKO et al. 2020a). A csuka hazai halgazdálkodási jelentősége elsősorban a horgászfogásokban mutatkozik meg (CSORBAI et al. 2016). Az élőhelyét érő

környezeti degradáció és a halászati-horgászati túlhasznosítás miatt állománya jelentősen lecsökkent Európában (SÄISÄ et al. 2008; CEJKO et al. 2020a; VIRBICKAS 2021). A lehalászási jelentések alapján hazánk tógazdasági üzemének csukatermelése is csökkentő tendenciát mutat (KISS 2022). A vizeink ökológiai sokszínűségének megőrzése napjainkra a haltenyésztők, a horgásszervezetek és az akvakultúrával foglalkozó kutató intézmények közös érdekévé vált (LORENZEN 2014; KRISTIANSEN & BRACKE 2020). A természetes vízi haltelepítés egy általánosan bevett gyakorlat a meglévő állomány erősítése vagy a fogási lehetőségek növelése érdekében (GUILLERAULT et al. 2018). A gazdasági és természetvédelmi előnyökkel szemben a horgászati méretkorlátozás tulajdonképpen egy méretalapú szelekciós tevékenység, amely a genetikai sodródás lehetséges hatásának veszélyét hordozza magában (BEKKEVOLD et al. 2014; LORENZEN 2005; LORENZEN et al. 2012), valamint a lassabb növekedés és a korai ivarérettség felé terelheti az evolúciós fejlődést (RAAT 1988; SMITH 1994; MARTY et al. 2014). A halállomány fenntartása érdekében a tudományos alapokon nyugvó haltelepítések és fogási korlátozások jelenthetnek megoldást (LORENZEN 2014; VIRBICKAS 2021). Közép-Európában a polikultúrás haltenyésztési technológia hatékonyabb kihasználása érdekében tenyésztik a csukát (MILARDI et al. 2014; KRISTAN et al. 2020). A pontycentrikus (*Cyprinus carpio*) tavakban a csuka hasznosítani tudja a nem kívánatos, elsősorban pontyfélék (*Cyprinidae*) táplálékkonkurenciáját jelentő gyomhalakat, amellyel a tógazdaságok termelése növelhető. A húsának minősége pedig hazai viszonylatok között rendkívül értékes (HORVÁTH & MAGYARY 2007).

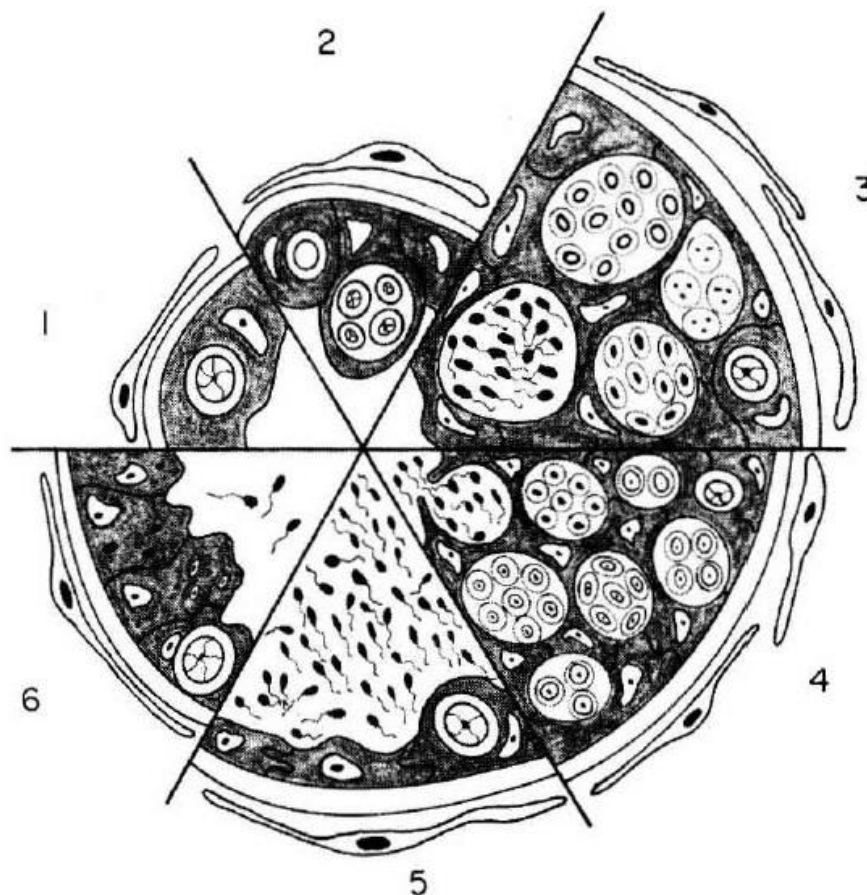
2.2. A csuka szaporodásbiológiai jellemzői

2.2.1. A here felépítése

A hímivarú halak ivarszerve a here (*testis*). Két lebenyből álló, hosszúkas felépítésű páros szerv. Hosszanti irányban kapcsolódik a hasüreg háti részéhez. A lebenyek összenőhetnek részlegesen (pl. sügér, *Perca fluviatilis*) vagy teljesen is (pl. szivárványos guppi, *Poecilia reticulata*). A here kivezető csöve az ivarnyílásig tart, amely a végbélnyílás és a húgycső között helyezkedik el. A csontoshalak (*Osteichthyes*) heréje anatómiailag két fő típusba sorolható (KISS 2000; PARENTI & GRIER 2004). A csöves (*tubuláris*) here jellemzően az elevenesülők fogaspontyfélék (*Poeciliidae*) sajátossága, mely csövecskékből épül fel. A spermatogenezis során az „A” típusú spermatogóniumok kezdetben a csövecskék vakon végződő területén csoportosulnak és egyenként fejlődnek. Az „A” típusú spermatogóniumok

fokozatosan átalakulnak „B” típusú spermatogóniumokká, cisztákat képeznek és fejlődésük során folyamatosan a herecsatornák nyitott vége felé vándorolnak (MYLONAS et al. 2017). A lebenyes (*lobuláris*) here több gazdaságilag fontos halfaj általános heretípusa, mint ahogy a csukáé is (GRIER & LINTON 1977; CRAIG 1996). A lobuláris here lebenykéket (*lobulusokat*) tartalmaz egy összetett csőrendszerben, melyek vakon végződnek. A lebenyek falát az intersticiális szövet köti össze. A hímivarsejtképzés a lebenyekben történik. A cisztákból már kiszabadult spermiumok tárolásának helyszíne a lebenyek ürege és az ondóvezető (HOFFMANN et al. 1980; URIBE et al. 2014). Ívási időszak előtt a hím csukák heréjének tömege akár a testtömeg 2%-át is elérheti. A herét a burok felől kötőszövetes sövények hálózák át belülről, számos részre felosztva a szervet (BILLARD 1996). A here nyirokereket, vérereket, idegeket, mioid sejteket, valamint Leydig-féle sejteket is tartalmaz (ROSSEN & ADABJIEVA 2015). A Leydig-féle sejtek szteroidokat termelnek, amik az ivarsejtképződéshez és a másodlagos nemi jellegek kialakulásához szükségesek. A lebenyek belső falát a csírahám borítja, benne csírasejtekkel és Sertoli-féle támasztósejtekkel (GRIER & LINTON 1977). A Sertoli-féle sejtek körülveszik az ivarsejtképződési sejteket, melyekkel cisztát képeznek (MIURA & MIURA 2003; ROSSEN & ADABJIEVA 2015). A hímivarsejt képződés során több fázisában lévő spermatociszta is jelen van, de egy cisztában mindig csak azonos fejlettségi állapotú sejtcsoport található. A fejlődés során a ciszták mérete megnő, a spermiogenezist követően felnyílnak és a lebenyek ondóvezetővel kapcsolatban lévő üregébe ürítik a spermiumokat (GRIER 1981). A csukának húgyivari szemölcs van, azaz a húgy és ondóvezető egy helyen nyílik, amelyeket a hashártyából (*peritoneum*) képződött közös burok vesz körül (CRAIG 1996). Az ondóvezető belső burka hengerhámszövetekből áll. Az ondóvezető tárolja a spermiumokat az ívási időszakban, valamint szerepet játszik az ozmotikus nyomás és szeminális plazma ionösszetételének szabályozásában (SZABÓ 2016a).

2.2.2. A spermatogenezis folyamata és a spermium felépítése



2. ábra: A spermatogenezis sematikus ábrázolása a szívárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) lebenyes heréjében. 1. Inaktív spermatogenezis. 2. Spermatogóniumok képzése. 3. Aktív spermatogenezis, a herelebens mérete jelentősen megnő. 4. Aktív spermatogenezis, korai spermiumok felszabadulása. 5. Spermiáció. 6. A spermium végső érési folyamata (BILLARD 1986).

A hímivarsejtképződés folyamatát spermatogenezisnek nevezzük, amely több szakaszból és alszakaszból áll (2. ábra). Egy diploid ($2n$) spermatogóniumból négy haploid (n) spermium fejlődik (SCHULZ et al. 2005).

Az első szakasz az osztódási szakasz. Elsőként az őscsírasejtek osztódása megy végbe mitotikus osztódással. Létrejönnek az A-típusú spermatogóniumok (SZMELSKYJ et al. 2015). Az átlagosan $18\ \mu\text{m}$ átmérőjű ivarsejtképződmények egész évben jelen vannak a csuka heréjében. A második alszakasz során az A-típusú spermatogóniumok egymást követő mitotikus osztódásai zajlanak le. A folyamat során az utolsó mitózisból származó sejtnevezékből alakulnak ki a B-típusú

spermatogóniumok. A sejtmagvacskái felszívódnak, és továbbfejlődnek elsőrendű spermatocitákká. Átmérőjük 7,5 µm körül alakul (CRAIG 1996).

A második szakasz a meiotikus érési szakasz, ahol a meiózis első és második fázisa során a diploid elsőrendű spermatocitákból haploid spermatidák képződnek (RÉTHELYI & SZENTÁGOTHAJ 2020). A meiotikus érés befejeztével egy elsőrendű spermatocitából négy spermatida alakul ki, amelyek hozzávetőlegesen 3,8 µm átmérővel rendelkeznek (CRAIG 1996).

A harmadik szakasz a spermiogenezis. A folyamat során a spermatida spermiummá fejlődik, valamint a citoplazmát összetevő elemek többsége felszívódik. Kialakul például a spermiumok farki része és a mitokondriális hüvely (GYÖRGY 2000). A DNS kompakt szerkezetének kialakulásához hozzájárul a sejtmagban lévő fehérjék képződésében létrejövő változás. A hiszton fehérje helyett protamin kezd termelődni (INGLES & DIXON 1967). A spermiogenezis szakasz végén a spermiumok még nem alkalmasak a termékenyítésre, de a fejlődésük morfológiai szempontból lezárul (ICKOWICZ et al. 2012).

A negyedik szakasz a spermiáció, mely során a spermiumok elválnak az őket tápláló és támasztó Sertoli-sejtektől. Az ivarsejtek a spermatocitákból fokozatosan a herecsatornába kerülnek (KIERSZENBAUM & TRES 2019).

Az ötödik, és egyben utolsó szakasz a kapacitáció. A herecsatornán végighaladva végbemegy a spermium végső érési folyamata. Az ivarsejt már alkalmassá válik a megtermékenyítésre (OKABE 2013; PÉREZ 2020). A folyamattal párhuzamosan az ondóvezető szeminális plazmát választ ki, ezzel megduzzasztva és hidratálva a herét. A már teljes értékű ivarsejteket tartalmazó sperma az ondóvezetőben tárolódik egészen az ívásig (POLICAR et al. 2010).

A csukaspermium három részre osztható: fej, középdarab és fark (*flagellum*). A spermium teljes hossza 34,5 µm. A fej gömbölyű alakú, hossza 1,3 µm, átmérője 1,4 µm (CRAIG 1996). A feji részben található a sejtmag, benne a DNS-állománnyal (HERRÁEZ et al. 2017). A középdarab tartalmazza a 12 µm hosszú mitokondriumot (AMARAL et al. 2013). A 34,5 µm hosszúságú fark tengelyvázát axonéma alkotja, mely két centrális mikrotubulusból és kilenc mikrotubuláris dupletből áll. A csukaspermium fark részére jellemző továbbá egy hullámzó, hártyszerű képlet is (CRAIG 1996). Hormonkezelés nélkül egy átlagos 1,5 kg-os csuka tejestől 1-2 ml sperma nyerhető ki klasszikus fejjel. A spermasűrűség átlagosan $1,5-2,5 \cdot 10^{10}$ spermium/ml (SZABÓ 2016a). A spermium az ondóvezetőben még inaktív állapotban van. Az aktiváció az ívás során a vízzel történő érintkezéssel indul. A víz ozmolalitása

alacsonyabb, mint a szeminális plazmáé, ez aktiválja a sejteket (COSSON 2004; NÓBREGA et al. 2008; SCHULZ et al. 2010; ULLOA-RODRÍGEZ et al. 2017; KHOLODNYI et al. 2019). A csukaspermiumok élénk mozgásának megkezdését követően hozzávetőlegesen 40-60 másodpercig, maximum 90 másodpercig életképesek (ALAVI et al. 2009).

2.2.3. A petefészek felépítése

A porcos- és csontoshalak, így a csuka petefészke (*ovarium*) is páros szerv. Az úszóhólyag mellett helyezkedik el a testfal mentén. A hasüreghez a *mesovarium* hártya rögzíti a terjedelmes üregű hártyásfalú zsákot. Kívülről kötőszöveti burok (*tunica albuginea*) határolja, belülről a tágult üregébe hatolnak a kötőszöveti rostokból álló lemezek szövetei (sztómák) (PARENTI & GRIER 2004). A belső falán elhelyezkedő lamellákról fűződnek le a halaknál ikrának nevezett petesejtek és a tüszőhámsejtek (nutritív sejtek), melyek feladata az ikra táplálása és a peteburok kialakítása. A sztómák felszínét alkotó csírahámban (*germinal epithelium*) különböző fejlődési stádiumban lévő ivarsejtek és szomatikus sejtek találhatók (LUBZENS et al. 2010). A gametogenezis során meghatározott fejlődési stádium elérése után az ivarsejtképződményeket körülövik a szomatikus sejtek, így kialakul a follikuláris tok (JALABERT 2005). A follikuláris tok külső (*theca*) rétege szteroidszintézisre képes kötőszövetből áll, bennük kollagén rostok, fibroblasztok és vérerek húzódnak (YOSHIDA & ASTURIANO 2020). Minden ivarsejt képződmény külön vérrellátással rendelkezik (PARENTI & GRIER 2004). A follikuláris tok belső rétege granulóza sejteket tartalmaz (FONYÓ & GEISZT 2019). A legtöbb csontoshalnál már kialakult a petevezető (*oviductus*), hazánkban kivételt képez ez alól például a réti csík (*Missgurnus fossilis*), a lazacfélék családja (*Salmonidae*) és az angolna (*Anguilla anguilla*), így ezen fajok esetében az ovuláció után a petefészek szövetéről leváló ikraszemek közvetlenül a testüregbe kerülnek. A petevezető eredése csontoshalaknál a petefészek steril, elkeskenyedő része. A petevezető porcoshalaknál (*Chondrichthyes*) és tokféléknél (*Acipenseridae*) az ősvese elvezetőcsatornájából levezethető Müller-csőből indul, ingoláknál (*Petromyontida*) és nyálkahalaknál (*Myxini*) hiányzik (SZABÓ 2016a). A petevezető kiszélesedő szakasza a méh (*uterus*). Az eleve szülőknél az utódok ezen a helyen kezdenek fejlődni. Az ivarvezeték általánosan a húgynyílás előtt, a végbélnyílás után helyezkedik el (YOSHIDA & ASTURIANO 2020). Bizonyos fajok (pl. csuka) szemölcsrel rendelkeznek (SZABÓ

2016b). Az ívási időszakban az érett ikraszemek az ovuláció során kilökődnek a petefészek üregébe. Az ikraszemek az ívás idején a petevezetőn keresztül az ivarnyíláson át kerülnek a vízbe (YOSHIDA & ASTURIANO 2020). A nem ovulált ikraszemek lebontásáért a tüszőhámsejtek és más fagocitáló sejtek felelnek (SZABÓ et al. 2000). A csuka azon valódi csontoshal (*Teleostei*) fajok közé tartozik, melyek rövid időtartamú ívási időszakukban csak egyszer ívnak. A petefészekben lévő ivarsejtek fejlődési állapota morfológiaileg nem egységes, benne megtalálható legalább két fejlődési állapotú sejtcsoport (SZABÓ 2016a).

2.2.4. Az oogenezis folyamata és az ikra jellemzése

Az ikra kialakulásának folyamatát oogenezisnek nevezzük. A spermiogenezishez hasonlóan több szakaszból és alszakaszból áll, ahol a fejlődés során egy diploid oogóniumból egy haploid ikra képződik (KOÇ et al. 2008; LUBZENS et al. 2010; READING et al. 2018).

Az ikrafejlődés első szakasza az osztódási szakasz. Az oogóniumok mitotikusan osztódni kezdenek és elsőrendű oocitákká fejlődnek (URIBE et al. 2016). A csuka oogóniumok differenciálatlan sejtek, hozzávetőleges átmérőjük 12-18 μm , alakjuk szabálytalan. A petefészekben elhelyezkedő sejtek több más kisebb sejtípussal együtt alkotják a pre-follikuláris tokot. A valódi csontoshalak oogóniumai zömében mitotikusan osztódnak. Az egyszer ívó halfajokban, kétéltűekben és a legtöbb gerinces állatban megszűnik ez az osztódási forma az embrionális fejlődés vagy a lárva állapot során. A halak esetében azonban nem szűnik meg, következtetésképpen az ikrás élete végéig termelhet oocitákat, amelynek nincs elméleti korlátja. Az oogónium sejtfázisától kezdve a sejtkepződmények tovább fejlődhetnek, vagy degenerálódhatnak és felszívódhatnak (CRAIG 1996).

Az oogenezis második szakasza a növekedési szakasz, aminek első alszakasza a protoplazmás növekedés. A számtartó osztódás mellett megkezdődik a számfelező, azaz a meiotikus sejtosztódás, ami az osztódás első fázisának profázisát túlhaladva leáll. Az oociták közül nem mindegyik folytatja a fejlődést, egy részük nyugalomban marad (READING et al. 2017). A fejlődő sejtek mérete eléri a 120-220 μm -t, és kialakul számos sejtszervecske (SZABÓ 2016a). A fázisban létrejövő Balbiani-test már Golgi készüléket, mitokondriumokat, és endoplazmatikus hálózatot is tartalmaz. Az oociták külső felületén kialakul a zona radiata-nak elnevezett sejten kívüli burok (ELKOUBY & MULLINS 2017). Az oociták petefészken belüli táplálása

pinocitózissal történik. A zona radiatában merőlegesen elhelyezkedő csatornában vannak a mikrovillik, melyek a tápanyagokat közvetítik (SZABÓ 2016a).

Számos halfaj szaporításának kulcstényezője a megfelelő minőségű ikra (SAMARIN et al. 2015a; PAVLOV & EMEL'YANOVA 2016; SAMARIN et al. 2018). A csukaikra átmérője átlagosan 2-3 mm (FARRELL & LAPAN 1996; BALIK et al. 2006). Ovulációt követően az ikra sárga színű, benne láthatók az animális pólus kisméretű lipidcseppjei szétszórt csoportokban, melyek a termékenyítés után a csírákorong alatt tömörülnek össze (CRAIG 1996). A folyamatért a citoplazma mozgás felel. A szikmentes citoplazma az animális pólus felé vándorol, rajta a csírákorong kiemelkedik a citoplazma felszínéről (LUBZENS et al. 2017).

2.2.5. A csuka szaporodásbiológiai sajátosságai

A szaporodási folyamatokra - felkészüléstől az ivásig - a csuka élőhelyén döntően a markáns változást mutató környezeti tényezők hatnak. A legnagyobb szabályozó szerepet a víz hőmérséklet emelkedésének vagy csökkenésének tendenciózus változásai, üteme és az évszakhatásból következően a nappalok hosszának vagy csökkenésének hatásai adják (SPENS et al. 2007). A szükséges környezeti stimulációk hiánya a kezelési stresszel együtt gátolhatja az oocita végső érését és ezt követően az ovulációt is (ZOHAR & MYLONAS 2001; SCHRECK 2010). A szaporodásbiológiai leírások alapján a megfelelő hormonális változások lejátszódásához a csukának is szüksége van egy hideg periódusra. A vitellogenezis szeptember-október hónapban kezdődik (LENHARDT & CAKIC 2002; ENGSTEDT et al. 2010; MOSLEMI-AQDAM et al. 2016), amit a csökkenő víz hőmérséklet és fotoperiódus változása válthat ki. Megkezdődik a tartalék tápanyagok felhalmozása, mely a téli időszak során is folyamatos. A szaporodás hormonális szabályozásáért a halakban a hipotalamusz – agyalapi mirigy – ivarszerv tengely felelős, amely a változó környezeti információkat meghatározott hormonok segítségével juttatja el az ivarsejtekig (SZABÓ 2016a). A gonadotrop hormon a hipofízisben termelődik, a releasing-hormon hatására. A releasing-hormon eljut az agyalapi mirigybe, ahol kiváltja a gonadotrop hormonok szekrécióját, melyek a szisztémás keringésen keresztül az ivarszervekbe kerülnek és előidézik a szexuáliszteroidok termelődését és elválasztását (PARIS et al. 2006; READING et al. 2018). A gonadotropinok végzik a Leydig-sejtek és spermatozoidok képződésének hormonális szabályozását. A tejesek spermatogenezisét a Leydig-sejtekben termelődő 11-ketotesztozteron serkenti. Az

ikrások vitellogenezisét a granulóza sejtrétegben termelődő 17 β -ösztadiol hormon stimulálja (SZABÓ et al. 2000; NELSON & HABIBI 2013; SCHILLING et al. 2015).

A csuka ivaréésének ideje nem bizonyos életkor, inkább adott testméret eléréséhez köthető, amely tejeseknél 35-40 cm-es, ikrások esetén 40-45 cm-es testhossznál valósul meg (WRIGHT & SHOESMITH 1988; BILLARD 1996; HARVEY 2009). Az időtartamot számos környezeti faktor befolyásolja már lárvakortól kezdődően, például az élőhely adottságai, éghajlata, jellemző vízhőmérsékleti viszonyai és az elérhető táplálék mennyisége (BALIK et al. 2006). Az északi területeken, például Skóciában a tejesek kétnyaras, az ikrások háromnagaras korukban érik el általánosan az ivarérettséget (BILLARD 1996; HARVEY 2009). Hazai viszonylatokban a csuka ivaréése tejeseknél egy-, kétnyaras, ikrások esetén háromnagaras korban szokott bekövetkezni (SZABÓ 2016a). A csuka ivari dimorfizmusa egész évben megnyilvánul (BILLARD 1996). Az ikrásoknál a végbélnyílás és az urogenitális tájék között egy kitüremkedés található, mely a tejeseknél hiányzik (RAAT 1988). Az ívási időszakban és azt megelőzően a testalkatban is láthatóak a különbségek (3. ábra). A nőstények általában nagyobb méretűek, a petefészek elhelyezkedése körül teltebbek, míg a hím egyedek karcsúak (BILLARD 1996).



3. ábra: Csuka tejes (fent) és ikrás (lent) (kép: Molnár József).

Az ikrások termékenységének alapvető szaporodásbiológiai mutatószáma a fekunditás (PAVLOV & EMEL'YANOVA 2016; SERRAT et al. 2019). Relatív fekunditásnak nevezzük a testtömegkilogrammmra vetített ikraszemek számát, amely értéke 10000–40000 közé tehető (BILLARD 1996). Az abszolút fekunditás a testtömeggel és testhosszal egyenes arányosságban áll (EINUM & FLEMING 2002;

KOTAKORPI et al. 2013). Fontos szaporítási mérőszám továbbá a pseudo-gonadoszomatikus index (PGSI, $\% = \text{lefejt ikra tömege} / \text{hal tömege közvetlen fejés előtt} \cdot 100$) (CEJKO et al. 2016).

Az idősebb, nagyobb testmérettel rendelkező ikrások ikramérete általában nagyobb, mely megfigyelhető a kelő lárva méretében is, ez pedig előnyt jelent az embrió és a lárva túlélésében (TIBBLIN et al. 2015; BERRGREN et al. 2016). A jelenség feltételezhetően abból adódik, hogy a nagyobb nőstények több energiát tudnak biztosítani az ikra fejlődéséhez (MURRY et al. 2008; KOTAKORPI et al. 2013). A fekunditás 12-14 éves kortól csökkenő tendenciát mutat (SZABÓ 2016a). Édesvizeinkben több hajfajból csak az idősebb korosztályú egyedek tarthatók meg horgászszákmányként a fogások méretkorlátozása miatt (TIAINEN et al. 2017). A magyar, országos horgászrend szerint a csuka legkisebb kifogható mérete 40 cm (133/2013. (XII. 29.) VM rendelet). A korlátozás hatására szelekciós hatást mutattak ki. Megnő azon egyedek aránya, melyek mérete kisebb, lassabb növekedési erélyűek és korábban ivaréretté válnak (POST et al. 2003; COOKE & COWX 2004; EDELINE et al. 2007; VAN WIJK et al. 2013). A jelenséget leírták például süllőnél (*Sander lucioperca*) (MUSTAMÄKI et al. 2014; KOKKONEN et al. 2015), sügérnél (PUKK et al. 2013) és csukánál is (DIANA 1983; EDELINE et al. 2007; ARLINGHAUS et al. 2009; MATSUMURA et al. 2011).

2.3. A csuka keltetőházi szaporítása és előnevelése

2.3.1. A csuka indukált szaporítása

Az őszi lehalászaskor a csukaanyákat telelőtavakba helyezik megfelelő táplálékhal biztosítása mellett (HORVÁTH & MAGYARY 2007). Az ívási időszak a tavaszi áradások idején kezdődik, jégolvadás után, amikor a víz hőmérséklet eléri a 8-12°C-ot, melytől kezdődően általában egy hónapig tart (CASSELMAN & LEVIS 1996; MINGELBIER et al. 2008). A természetesvízi ívás megindulásának kezdete előtt keltetőházba szállítják a halakat, amelyek jól ellenőrzött feltételeket biztosítanak az anyahalak felkészítésétől kezdve egészen az előnevelt ivadék előállításáig (BOKOR et al. 2020). Az ikrások szaporodásbiológiai állapota összefüggésben áll az ikra termékenyülésével. Ezért a keltetőházi szaporítás előtt általában hormonális indukciót alkalmaznak a szakemberek (BOBE 2015; LUBZENS et al. 2017; KRISTAN et al. 2020). A pontyfélékhez hasonlóan 3-4 mg/testtömeg kg pontyhipofízis hormonkezeléssel már kiváltható az ovuláció, a termékenyülés döntően közepes minőségű lesz (PECHA et al. 1992). Ponty hipofízis alkalmazásakor a szaporodásra

teljesen fel nem készült egyedektől a gyors hormonszint növekedés hatására gyengén termékenyülő ikra nyerhető ki. A hirtelen bekövetkező hormonális változás megbontja a végső oocita érés és az ovuláció természetes folyamatát. A csuka hideg vízben ívó halfaj, így a lezajló hormonális változásoknak hosszabb időre van szüksége, a pontyfélékhez képest (SZABÓ 2011). A hatékonyabb ovuláció indukálás érdekében számos tanulmányban vizsgálták a pontyhipofízis helyettesítését, azonban nem érték el pozitív eredményt (BILLARD & MARCEL 1980; SZABÓ 2001, 2003, 2008). Az ovuláló csukaikrások aránya és annak hatékonysága növelhető nyújtott hatóanyag leadású vivőanyagba kevert hormonok szervezetbe juttatásával (SZABÓ 2011; BONDARENKO et al. 2015a). A depó hatású karbopol-hidrogél (971P karbopol típus) 2,5%-os vizes diszperziójában szükséges homogenizálni 3-4 mg/ttkg dózisu acetonnal hipofízist. A hasüregbe injektált hormonkezelés fokozatos hatóanyag leadást eredményez, amely jobban illeszkedik a hidegvízi csuka szaporodásbiológiai sajátosságaihoz. Az ikra minőségét befolyásolhatja az ovariális folyadék pH értéke is, melynek átlaga 8,11-8,35 érték között mozog. A pH érték emelkedése korrelációba hozható az ikra termékenyülési eredményeivel is (BONDARENKO et al. 2015a). A 7,4-nél alacsonyabb pH érték rossz ikraminőséget jelezhet, míg a pH 8,44-8,57 érték kiváló minőségű ivarterméket eredményez (LAHNSTEINER et al. 1999). Az alacsony pH érték továbbá negatív hatással van a halsperma motilitási értékeire is a szaporítás során (WOJTCZAK et al. 2007). A gazdaságilag jelentős halfajoknál általában pH 8 vagy magasabb érték megfelelőnek bizonyul (BONDARENKO et al. 2015a). A csuka ikrások fejését általában a klasszikusan alkalmazott hasfal masszírozásával végzik (SZABÓ 1997b). Az ikra minőségének növelése céljából korábban vizsgálták a légpumpás pneumatikus fejést – mint a lazacféléknél alkalmazott ikra kinyerési eljárást – amelyet összevetve a hagyományos fejéssel nem rögzítettek szignifikáns eltérést. A pneumatikus fejés költségei miatt a módszer nem terjedt el a gyakorlatban (CEJKO et al. 2016).

A vadon befogott csuka tejesei keltetőházba szállítása és rövidtávú tartásának hatására stressz válaszreakció lép fel, ami negatív hatással van a spermiumképződésre és a spermiációra (SCHRECK et al. 2001). A sperma fejését pedig megnehezíti a csukahere leánykékre osztott szerkezete és tagoltsága (ROSSEN & ADABJIEVA 2015). A tejeseknél a hasfal masszírozásával végzett fejéssel zömében kis mennyiségű spermát lehet kinyerni, valamint az ivartermék gyakran vizelettel is keveredik, ami csökkenti a spermaminőséget és spontán aktivációt is okozhat. Egy kutatás során a hormonálisan indukált 1547 ± 467 g testtömegű csukatejesektől $1,2 \pm 0,8$ ml spermát

fejték. A halak heretömege 35 ± 5 g volt. Mindez azt feltételezi, hogy az ivarszervben nagyságrendekkel több sperma lehetett, mégsem sikerült azt kinyerni (HULAK et al. 2008a).

A csukasperma gyűjtésére kialakult egy másik módszer: a hasfal felvágását követő here kioperálása, és molnárszitán vagy szitaszöveten végzett átréselése. A technikával nagyobb mennyiségben áll rendelkezésre a szaporításhoz szükséges sperma, azonban ez minden esetben a teljes egyedek leölésével jár (KOWALSKI et al. 2012; BLECHA et al. 2016). A nagyüzemi tenyésztéshez bőségesnek tekinthető spermamennyiségre (5-10 ml/1 kg ikra) van szükség (LAHNSTEINER 2000; SZABÓ et al. 2021). A megfelelő mennyiségű és minőségű rendelkezésre álló sperma hiánya a termékenyítés egyik korlátozó tényezője lehet (CEJKO et al. 2016; KRISTAN et al. 2020). A fejési nehézség így megnehezíti a keltetőházi technológia fejlődését, amelyre megoldást nyújthat akár a sperma rövid távú tárolása vagy mélyhűtése (CEJKO et al. 2018).

Bizonyos halfajoknál kimutatták, hogy a hormonális indukció (általában pontyhipofízissel) pozitív hatással van a sperma termelésére és minőségére, mely a termékenyítéskor mutatkozik meg (KOWALSKI et al. 2012; BLECHA et al. 2016; MYLONAS et al. 2017). A csuka tejesek hormonális kezeléséhez 3-4 mg/ttkg hipofízis elegendő (SZABÓ 2001, 2008). Az egyedek a legnagyobb sperma mennyiséggel általánosságban az ívási időszak közepén rendelkeznek. A spermatermelés folyamatos a szaporodási időszak során, a szeminális plazma mennyisége azonban az ívási időszak végéhez közeledve csökken (SHANGGUAN & CRIM 1999; BONDARENKO et al. 2018).

A csuka ivartermékeinek kinyerése két tényező miatt több időbe telik, mint ahogyan az átlagos keltetőházi gyakorlatban megszokott. Egyrészt a sperma kinyerését általánosan nem fejéssel, hanem a here kioperálásával végzik. Másrészt az ikrát csak lassan lehet lefejni az ikrásokból (a természetben több órán keresztül is elhúzódhat az ikra lerakása) (KRISTAN et al. 2020). Fejést követően az ivarsejtek termékenyítőképesége folyamatosan csökken, így törekedni kell azok gyors felhasználására (LEGENDRE et al. 1996; KRISTAN et al. 2018). Üzemi körülmények között a halgazdaságok átlagosan 40-60% termékenyülési értéket érnek el (HORVÁTH & MAGYARY 2007; KRISTAN et al. 2020). A termékenyülési eredményekben nagy eltérések fedezhetők fel aközött, hogy a szaporítási szezon mely időszakában (pl. elején, közepén vagy végén) és milyen technológiával végezték el a csukaszaporítást. A szaporítási szezon idejének előrehaladtával a csukaikra mérete és

vele párhuzamosan a szikanyag felhalmozódásának mértéke is növekszik, ami szintén a termékenyítési eredmények meghatározó tényező lehet (BENZER et al. 2010). A szezon végéről származó lárvák mérete nagyobb, gyorsabb a növekedésük, a szezon eleji lárvák viszont jobban tolerálják a nem megfelelő táplálkozási feltételeket (MURRY et al. 2008; TRABELSI et al. 2015). Az ívási időszak elején végzett halszaporításnál általánosságban jobb az ikra minősége, a termékenyítési érték és a lárva megmaradás, amit feltételezhetően az ikra magasabb dokozahexaénsav (DHA) koncentrációja okoz. A jelenség nem egyedi a csukánál, más halfajok esetében is megfigyelték (YANES-ROCA et al. 2008; CARNEVALI et al. 2019).

A termékenyüléshez, azaz az ivarsejt egyesüléshez szükséges aktiváció kiváltásához általánosságban tóvizet, Woynárovich-féle oldatot (40 g konyhasó és 30 g karbamid/10 liter víz) (WOYNÁROVICH & WOYNÁROVICH 1980; CEJKO et al. 2016) vagy módosított Woynárovich-féle oldatot (150 g karbamid és 70 g konyhasó/10 liter víz) (HORVÁTH & MAGYARY 2007) használnak. A spermiumok az oldatban tovább megőrzik mozgáskéességüket. A termékenyítési folyamatot többszöri öblítés és fél-másfél órás duzzasztás követi, melyhez akár rázóasztal (4. ábra) is használható (SZABÓ 1999; 2012).



4. ábra: A termékenyített ikratételek duzzasztása rázóasztalon (kép: Molnár József).

Az ikrát ezután Zuger-üvegbe helyezik. Az inkubáció kezdeti fázisában alacsony a szik körüli tér, amely miatt az ikra a külső mechanikai behatásokra érzékeny (SZABÓ 2016b). A Zuger-üvegben ezért minimális vízátfolyást kell biztosítani az

adott időtartamban (kb. 0,2 l/perc). Az ikraszemek gyorsan összetapadnak, ellenben oxigénigényük alacsony (LÉVAI & HORVÁTH 1980). Két nap elteltével szükséges emelni a vízáramlást, és szétkeverni az összetapadt ikrát (HORVÁTH & MAGYARY 2007). A csukaikra inkubációja széles hőmérsékleti tartományon belül végbemehet (4-23°C), a szélső értékek azonban nagyarányú lárvadeformitáshoz vezethetnek (HASSLER 1982). Az embrionális fejlődés szempontjából ideális érlelővíz hőmérséklete 6-10°C közötti értékek közé tehető (BONDARENKO et al. 2015b; POSPISILOVA et al. 2019). Cseh kutatók vizsgálták a csukaikra fejlődését hat állandó hőmérsékleti tartományban 9-14°C között. A különböző hőmérsékleti csoportokban nem találtak mérhető eltéréseket a lárvafejlődési rendellenességek megjelenésével kapcsolatban. A hőmérséklet nagymértékben befolyásolja az ikra fejlődését, és az ikrában lejátszódó biológiai folyamatok sebességét. A kelési idő 9°C-on közel 13 nap volt, míg 14°C-on viszont lecsökken 6 napra. A széles hőmérsékleti tartományok miatt a napfok/órafokban kifejezett inkubációs idő kevésbé becsülhető pontosan (POSPISILOVA et al. 2019). Az embriogenezis során az ikra élénksárga színről fokozatosan sötétbarnává válik. A termékenyülési érték már a termékenyítést követő napon, a szedercsíra fejlődési fázistól megállapítható mikroszkóp alatt (SZABÓ 2016b). A víz megfelelő környezetet nyújt a vízi penészgombák (*Saprolegnia spp.*) gyors szaporodásához, amely élőlények könnyen átterjedhetnek a fertőzött ikraszemmel közvetlenül érintkező egészséges ikrára. Az infekció negatív hatással bír az embrionális fejlődésre, vagy akár a teljes ikratétel pusztulásához is vezethet. A folyamat mérséklése vagy megállítása érdekében tehát elengedhetetlen a penészesedés elleni kezelés. Korábban napi szintű malachitzöld kezelést alkalmaztak 3-5 mg/l koncentrációban (HORVÁTH & MAGYARY 2007; HOCHLEITHNER 2015). A gombaölő hatású vegyület használata manapság korlátokba ütközik, helyette egyéb fertőtlenítő és parazitamentesítő hatású oldatokat alkalmaznak, mint például a DETOX (NÉMETH et al. 2012), a formalin (RACH et al. 1997; WARD 2020) vagy a Szaprostop (TATÁR et al. 2020). Az ikra keltetését az első szabadon úszó lárva megjelenésekor ajánlott elkezdeni. A vízátfolyást ekkor olyan módon kell beállítani, hogy az ikra a Zuger-üvegben éppen csak hullámozzon. A Zuger-üvegben lévő ikrát hozzávetőlegesen másfél óra múlva lapos tálba kell szívni úgy, hogy csak néhány centiméter víz maradjon az ikra felett. A tálát meleg fényre vagy napfényre helyezve a kelés felgyorsul, mely folyamatot a kelési enzim is nagymértékben fokozza. Ideális körülmények között 10-15 perc alatt kel ki a lárva (LÉVAI & HORVÁTH 1980).

2.3.2. A csukalárva keltetőházi előnevelési technológiája

Napjainkban a keltetőházi előnevelési módszere dinamikus fejlődésen megy keresztül (KUCSKA 2016). Kelést követően a csukalárvát általánosan 5000-10000 db/100 liter egyedsűrűségben tartóedénybe (pl. óriás Zuger, lárvanevelő vályú, medence) helyezik, amely megfelelő vízfolyás mellett maximum 200000 db/m³ kihelyezési sűrűségig növelhető (HORVÁTH & MAGYARY 2007). A kelést követően, a nem-táplálkozó lárvaszakasz időtartama a víz hőmérséklet függvénye. Keltetőházi körülmények között megfelelő hőmérsékleti tartományban (9-14°C) egy-két hétig (100-120 napfok) tart, azonban szélsőséges hőmérsékleti viszonyok között az időtartam változhat (POSPISILOVA et al. 2019). A természetes környezetben kikelt csukalárva táplálkozásának megkezdése előtt a vízalatti növényekre függeszkedik a homlokmirigye által termelt váladék segítségével (HINER 1961). A függeszkedő lárvák környezeti igényeinek eleget téve a keltetőházakban a lárvatartó medencében megfelelő mennyiségű mesterséges szubsztrátot szükséges biztosítani. A gyakorlatban műanyag hálókát vagy függönyanyagot helyeznek függőlegesen a medencébe, amelyek biztosítják az elegendő méretű kapaszkodásra alkalmas felületet (KUCSKA 2016). Az egyedek ebben a lárvastádiumban endogén táplálkozást folytatnak a szikzacskóban tárolt tápanyagból (POSPISILOVA et al. 2019). A halak függeszkedésének befejeztével azonnal el kell kezdeni a megmaradt ikrahéj és elpusztult egyedek eltávolítását a medence aljzatáról, mivel a bomló szervesanyag tökéletes táptalajt biztosít a vízi penészgomba fajok számára. A halgondozási feladat ellátásának hiányában napokon belül kialakulhat a medence alját teljesen betérítő vékony „penészpaplan”. Ha a zsenge lárvák beleúsznak ebbe a penészrétegbe, belegabalyodik és általában elpusztul (SZABÓ 2016b).

A nem-táplálkozó lárvaszakaszt a táplálkozó lárvaszakasz követi, amikor az egyedek már önállóan képesek a helyváltoztatásra és a táplálékszerzésre. Testhosszuk ekkor már 12-13 mm között van (SZABÓ 2016b). A lárvák elúszása nem egységes időpontban történik, azonban az elúszást követően azonnal elkezdnek táplálkozni. A lárvák táplálkozása előtt érdemes fokozatosan emelni a víz hőmérsékletét legalább 14-15°C-ra, fokozva ezzel az egyedek anyagcseréjét, azaz étvágyukat is (WOLNICKY & GORNI 1997). Ha a lárvák rövid időn belül nem jutnak táplálékhoz, szervezetükben egyirányú folyamatok indulnak be, alkalmatlanná válnak a táplálékfelvételre, ami a pusztulásukhoz vezet. A csuka kezdeti takarmányozására alkalmas az élő, tenyésztett vagy gyűjtött 200-500 µm méretű zooplankton, például az evezőlábú rákok (*Copepoda*) és az ágascsapú rákok (*Cladocera*) (TAMÁS 1970; HORVÁTH et al.

2009; SZABÓ 2016b). A csuka rendkívüli étvágya miatt a zooplankton gyűjtés és etetés nagyon munkaigényes folyamat, valamint könnyedén behurcolhatók vele betegségek is. Napjainkban dinamikusan fejlődnek a lárva- és ivadéknevelő tápok, érdemes ezeket etetni a zooplankton helyett. Több gazdaság manapság már a teljes értékű takarmánykeverékre alapozott előnevelést alkalmazza a keltetőházában. A csukalárva emésztőrendszere elúszást követően már fejlett annyira, hogy nem szükséges élő eleséggel kezdeni az etetést, akár az első táplálékfelvételtől is alkalmazhatóak a száraz tápok (SZCZEPKOWSKI 2009; KUCSKA 2016). A csuka csak a süllyedő tápot fogadja el, a vízfenékről már nem fogyasztja el azt. A takarmányt javasolt szárazon adagolni, mivel a nedvesítés hatására, beszívja magába a vizet és a víztartalmának köszönhetően gyorsabban süllyed a vízfenékre. Az el nem fogyasztott takarmány eltávolítására gondosan ügyelni kell. A csukalárva gyorsan megtanulja a táp felvételét, akár 90-95%-ban mesterséges takarmányra szoktatható (KUCSKA 2016). A csuka rendkívül falánk állat. Az etetését érdemes 3-5, de legalább 15 percenként végezni napi 15 órán keresztül, ugyanis a gyakori etetéssel csökkenthető a nevelés időtartama (WESTERS & STICKNEY 1993). Az ideális azonban a rendkívül intenzív, akár napi 24 órás etetés (KUCSKA 2007). A faj esetében nagyon gyakori a kannibalizmus, melynek mértéke a kezdeti életszakaszban még csökkenthető a tápos etetéssel. A 3 cm teljes testhossz elérése után azonban egyre nő a kannibalizmus mértéke, így ettől a mérettől javasolt tavi környezetbe kihelyezni az előnevelt ivadékot. A nevelés teljes időtartama általában 3-4 hetet vesz igénybe (GILES et al. 1986; KUCSKA et al. 2005, 2007).

2.4. A sperma mélyhűtése

A spermamélyhűtés az állattenyésztésben is alkalmazott, a hímivarú egyedek genetikai tartalékainak megőrzésére és gyakorlati felhasználására irányuló biotechnológiai eljárás (HAGEDORN et al. 2018; HEZAVEHEI et al. 2018; KHAN et al. 2021). A technológia tágabb értelmezésében magába foglalja az ivartermék gyűjtését, a kezdeti spermaminőség vizsgálatát, a hígítót, a védőanyagokat, a fagyasztást és a felolvasztás utáni spermaminőség értékelését. A célja az ivarsejtek fenntartása és megőrzése (LEE & YOSHIZAKI 2016; HARJANTI et al. 2020). A sikeres mélyhűtés a felolvasztott sperma motilitási és termékenyítési eredményeiből állapítható meg (BILLARD et al. 1995; CIERESZKO et al. 1996; TSVETKOVA et al. 1996; TORRES et al. 2016). A spermafagyasztásra irányuló kutatások történeti áttekintése több mint 200 évre nyúlik vissza, amikor felfedezték, hogy a hóban lehűlt,

inaktív spermiumok (pl.: ember, ló, béka) melegítés hatására mozgásra képesek lehetnek (WHITTINGHAM et al. 1972). PHILLIPS & LARDY (1939) használtak először tojás sárgája „védőanyagot” a bikasperma fagyasztásakor a hősokk elleni védelem érdekében. Brit kutatók 1949-ben azt tapasztalták, hogy a glicerín megvédi a sperma strukturális integritását a fagyasztás közben és a felolvasztást követően mozgó sejteket észleltek, amivel egy új korszak nyílt meg a spermamélyhűtés technológiájának fejlődésében (POLGE et al. 1949; MARTIN et al. 2000). Az első fagyasztási eredmény Blaxter nevéhez fűződik, 1953-ban sikeresen tárolt hering (*Clupea harengus*) spermát szárazjégen, -79°C-on (BLAXTER 1953). Jelenleg már több mint 200 halfajnál mélyhűtöttek spermát (CABRITA et al. 2010). A legtöbb kutatás édesvízi halfajaink közül elsősorban tokfélékre (HORVÁTH et al. 2008), lazacfélékre és pontyfélékre irányult (CABRITA et al. 2010; CALDEIRA & SOLER 2018). Napjainkban ugyan számos állatfajnál alkalmazzák a módszert üzemi szinten szárazföldi emlősöknél, azonban a halaknál kevésbé terjedt el (TIERSCH 2008; NYNCA et al. 2021). A halsperma hosszútávú megőrzésének módszere javarészen fajonként és rendenként eltérő. A tudományos irodalmat áttekintve megállapítható, hogy a halsperma mélyhűtési kutatások egyik aktuális megoldandó feladata a technológia egységesítése (CABRITA et al. 2014; NYNCA et al. 2017; CALDEIRA & SOLER 2018). A mélyhűtött halsperma kereskedelmi forgalomba hozatala emiatt, jelenleg is korlátozott (ASTURIANO et al. 2017; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2017). A halsperma mélyhűtés gyakorlati alkalmazásához szükség van személtváltásra is. Ki kell dolgozni azokat a módszereket, amelyek segítségével a fagyasztott sperma tenyésztéstechnológiai alkalmazása könnyen ismételhetővé és egységessé válhat (CABRITA et al. 2010). A hímivarsejtek konzervációjának előnyei közé tartozik, hogy a szaporítás folyamán a sperma felhasználás optimalizálható, így kevesebb a spermavesztés (CABRITA et al. 2010; CALDEIRA & SOLER 2018). A szaporítási időszak alatt a tejesek és az ikrások között a legjobb minőségű ivartermék kinyerésének időpontja gyakran nem teljesen egyezik (BORYSHPOLETS et al. 2009; BLECHA et al. 2015; SAMARIN. et al. 2015a, b, c). A mélyhűtés lehetőséget nyújt az ivarsejtek korlátlan idejű tárolására, amely segítséget nyújthat a szinkronizációs problémákban is (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2009). Különösen fontos tényező ez a fajvédelemben, a védett és a kihalással fenyegetett halfajok megőrzésében (SZABÓ et al. 2004). Az ivarsejtek fagyasztásának előnyei közé tartozik továbbá, hogy a spermátételek biztonságosan szállíthatók az egyes halgazdaságok között. Az egyes halfajspecifikus technológiák kidolgozásával kevesebb tejes fenntartására lenne

szükség (CABRITA et al. 2010; CAFFEY & TIERSCH 2000). A módszer lényegesen növelheti a tenyésztett halfajok mesterséges szelekciójának módját is (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2009). Az egységnyi sperma felhasználás hatékonysága növelhető, míg a beltenyésztettség okozta kockázat és a genetikai sodródás csökkenthető lenne, mindemellett költséghatékonyabbá válhatna a fajmegőrzés (CABRITA et al. 2010; CAFFEY & TIERSCH 2000).

A sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*) osztályba tartozó halfajok többségénél az ikrás egyedek később érik el a tenyészérettséget, valamint nagyobbra nőnek, mint a tejesek, ezért a halgazdaságokban általában az ikrás halak fenntartási költsége a magasabb. A mélyhűtés szempontjából a tejesektől származó sperma megőrzése terjedt el. Az ikra és az embrió fagyasztása jelenleg nem megoldott, mely legfőképpen az alacsony membrán permeabilitással, az ikra méretével, nagy szikanyag- és víztartalmával magyarázható. A leírt tényezők a mélyhűtés során sejten belüli kristályosodási folyamatokat indítanak el, melyek roncsolják a sejteket mind a fagyasztás, mind a felolvasztás közben is (TIERSCH 2001; DIWAN et al. 2020). A spermiumok ikrával összevetett mérete nagyságrendileg kisebb. A halszaporításban például 5-10 ml sperma akár 1 kg ikra termékenyítéséhez is elegendő. A tárolás szempontjából tehát a sperma tárolása célszerűbb, mint az ikráé (CAFFEY & TIERSCH 2000; THOLKE et al. 2019).

2.4.1. A spermamélyhűtés fizikai és kémiai alapjai

A sejtek 0°C alatt kezdenek megfagyni. A jégképződés először az extracelluláris térben következik be. A sejtmembrán révén a jégkristályok nem növekednek a sejtben, a sejt és a citoplazma ekkor még előreláthatóan nem fagy meg. A sejtek és azt körülvevő közeg halmazállapot változása várhatóan -5°C hőmérsékleten következik be az oldott anyagok és a védőanyagok okozta fagyáspontsüllyedés miatt (MAZUR 1977). A fagyáspont csökkenés magyarázata az ozmotikus viszonyokat szabályozó, féligáteresztő hártvaként funkcionáló sejtmembrán működése, mely a kisebb molekulákat átengedi, mint például a víz, a nagyobb molekulákat ellenben nem. Amikor megkezdődik a jégkristályképződés a sejtközzötti térben, az extra- és intracelluláris tér között ozmolalitás különbség alakul ki (AFRIANI et al. 2021). Az ozmózis elv alapján a sejtben lévő hígabb oldatból a nyomáskiegyenlítődéskövetkeztében vízkiáramlás kezdődik meg a sejten kívüli töményebb oldat felé (LEIBO 1980). A hűtés során ideális esetben -10°C és -40°C közötti hőmérsékleten a

sejtekből történő vízkiáramlás megszűnik. A túl magas hűtési sebesség megválasztásának hatására jégkristályképződés játszódhat le sejten belül, ami ozmotikus stresszhez, sejtroncsolódáshoz és a sejtmembrán károsodásához vezethet (HU et al. 2006; MAZUR 1977). Túlságosan alacsony hűtési sebességet alkalmazva a vízkiáramlás a sejtekből túlzott mértékű lehet, ami dehidratációt okozhat (TIERSCH & GREEN 2011). A bemutatott, sejtekre ható destruktív folyamatok megelőzése érdekében fajspecifikus, pufferezt és különböző ionokat tartalmazó hígító oldatot használnak (HOAR et al. 1983). A hígítóhoz szükséges különböző védőanyagok hozzáadása is, melyeknek két típusa különíthető el. A sejtekbe behatoló kis molekulájú, azaz intracelluláris védőanyagok, valamint külső, extracelluláris védőanyagok (HAGEDORN & KLEINHANS 2000; LAHNSTEINER 2000; CLOUD & PATTON 2009; SULTANA et al. 2010). A sejtekbe be nem hatoló, nagy molekulájú extracelluláris védőanyagok a sejtmembránhoz kapcsolódva azok stabilitásáért felelnek (HAGEDORN & KLEINHANS 2000; CABRITA et al. 2001; HORVÁTH et al. 2006a). Az intracelluláris anyagok pedig csökkentik a homogén magképződési hőmérsékletet, csökkentik a víz diffúziójának sebességét az intracelluláris térből az extracelluláris térbe, emelik a vitrifikációs hőmérsékletet, stabilizálják a sejtmembránt, valamint szerepet játszanak a sejtkárosodás elkerülésében és mérséklésében is (HARVEY & ASHWOOD-SMITH 1982). A fagyasztás során a vízkiáramlás közvetlenül függ a hőmérséklet csökkenés sebességétől, ezen túlmenően a különböző típusú sejtek méretétől, a sejten kívüli térben lévő vízmennyiségtől, a membrán vízáteresztő képességétől és a sejtek oldott anyag tartalmától (HASSAN et al. 2015; DELGADO-BERMÚDEZ et al. 2022). Megoldásként készült matematikai modell is a mélyhűtés optimális sebességének becsléséhez, ami minimálisra csökkenti a sejten belüli jégkristály képződés esélyét (CABRITA et al. 2010). A fontosabb hatótényezők közé tartozik továbbá az extra- és intracelluláris védőanyagok típusa és koncentrációja is (BOKOR et al. 2008). A hűtési sebesség mellett a felolvasztást is megfelelő sebességgel, esetenként fajspecifikusan kell elvégezni, hogy a hőmérséklet emelkedése közben fellépő fagyási sokkot elkerülhessük (CABRITA et al. 2010).

2.4.2. Spermamintavétel

A halgazdaságokban és kutatóintézetekben a csukaspermat általában kétféle módszerrel nyerik ki (KRISTAN et al. 2020). A szaporodásra felkészült tejeseknél a klasszikusan alkalmazott hasfal masszírozásával végzett fejési módszerrel a sperma

gyűjthető pohárba fejve vagy akár fecskendőbe is felszívható (CEJKO et al. 2018). A módszer hátránya azonban, hogy az ivartermék vizelettel vagy vérrel szennyeződhet, amitől a sperma aktiválódhat, csökkentve ezzel a szaporítás hatékonyságát (BILLARD 1978; HULAK et al. 2008a). Az említett fejési módszerrel csak kevesebb mennyiségű sperma nyerhető ki, amelynek feltételezhető oka a here anatómiai sajátosságaiban rejlik. A szakirodalom azonban csak általánosságban ír arról, hogy a csukahere lebenyekékre osztott szerkezete lehet a magyarázata a fejés nehézségeinek, részletes válasz tudomásom szerint még nem érhető el (DE MONTALEMBERT et al. 1978; BILLARD & MARCEL 1980; KOLDRAS & MOCZARSKI 1983; BILLARD 1996; CRAIG 1996; LAHNSTEINER et al. 1998; KOWALSKI et al. 2012; ROSSEN & ABADJIEVA 2015; BLECHA et al. 2016; KRISTIANSEN et al. 2020; CEJKO et al. 2016, 2020a).

A csukasperma a fejés mellett kinyerhető a here operálásával is. Az ivarterméket ezután a termékenyítésig hűvös helyen vagy hűtőben tárolják (LAHNSTEINER et al. 1998; HULAK et al. 2008a). A módszerrel a spermakoncentráció nő, és idegen szennyezőanyagtól mentes lesz, azonban hátránya, hogy a hím tenyészegyedek leölésével jár (LEGENDRE et al. 1996; KRISTAN et al. 2020), valamint a here préselése folyamán bizonyos mértékben a mintába kerülnek a here szöveteinek darabjai, sejtközzötti és sejten belüli folyadék, valamint nem érett spermiumsejtek is (LAHNSTEINER et al. 1998). A csukához hasonlóan a harcsafélék (*Siluridae*) heréje szintén lebenyes szerkezetű, amelyek szaporítási módszerei között már megjelent a here egy részének sebészeti eltávolítása is. Az eljárás során kioperálják az egyik herelebenyt, amely után az egyedek életben maradnak, a heréjük begyógyul, így kétszer is tenyésztésbe vonhatók ugyanazok a tejesek. A here másik lebenyének eltávolítása során már nem műtik a halat, hanem fel kell áldozni őket, így azokat további szelekcióra felhasználni már nem lehet (PRONINA & PETRUSHIN 2019).

2.4.3. Spermaminőség vizsgálat

Számos tanulmány foglalkozik a halsperma minőségének értékelésével. A vizsgálatok legfőbb céljai a következők: kereskedelmi célú haltermelés tenyészállományainak javítása (CABRITA et al. 2010), az egyedek szelekciója a spermaminősítés alapján (RURANGWA et al. 2004), az ivartermékek helyes kezelési és tárolási módjának meghatározása a szaporítási technológia fejlesztéséhez (BEIRÃO et al. 2019), a génmegőrzés (LAHNSTEINER et al. 1998) és a halfajok spermaminőségének ellenőrzése (KOWALSKI & CEJKO 2019). Az alapvető

spermaminőséget befolyásoló paraméterek: sperma koncentráció, -morfológia, -motilitás, membrán integritás és az ATP tartalom (FAUVEL et al. 2010). Kowalski & Cejko (2019) szerint a tenyésztést meghatározóbb tényezők továbbá a spermatérfog, valamint a szeminális plazma pH értéke és ozmolalitása. Szűkebb értelmezésben a szaporítás előtti leghatásosabb spermaminősítési módszer a sperma motilitásának (motility) és sebességének (velocity) mérése (RURANGWA et al. 2004; GAGE et al. 2004). A mozgó spermiumok aránya kihathat a termékenyülés eredményére (GALLEGO et al. 2018).

A hímivarsejtek minőségének vizsgálata a 2000-es évektől kezdődően nagymértékű fejlődésen ment keresztül (CASTELLINI et al. 2011; GALLEGO et al. 2013). Időrendi sorrendben a következő módszereket kezdték alkalmazni: fénymikroszkópos, multiexpozíciós fényképezés, a pillanatnyi felvételek sorozatát visszajátszani képes videófelvevételek, spektrofotométer és a számítógép által vezérelt spermavizsgáló rendszer, azaz a CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) (HORVÁTH et al. 2006b). A sperma motilitás vizsgálathoz alkalmazható legmodernebb eszköz a CASA rendszer, amely először az 1980-as években jelent meg az orvosi laboratóriumokban (LARSEN et al. 2000). Felépítését tekintve két egységből áll: a számítógép vezérelte értékelőrendszerből (szoftver) és a vele kapcsolatban álló optikai vizsgáológységből (mikroszkóp) (KIME et al. 1996, 2001; WILSON-LEEDY & INGERMAN 2007). Speciálisan erre a rendszerre kifejlesztett fáziskontraszt objektívvel ellátott mikroszkóppal rendelkezik. Az analóg jelet egy digitális kamera közvetíti a számítógéphez. A rendszer érzékeli bizonyos időintervallum (általában 0,5-1 másodperc) között a sejtek kiindulási és végpontja közötti mozgását, majd egyedileg értékeli azokat (ELLIOT et al. 1973; LIU & WARME 1977; STEPHENS et al. 1988; HOLT & PALOMO 1996; LARSEN et al. 2000). Összefoglalva tehát a rendszer magától megállapítja az eredményt az adott paraméterek mért értékeiből, amelyek azonnal láthatóvá is válnak a felhasználó számára (RURANGWA et al. 2004; HORVÁTH et al. 2006b). Jelenleg a CASA rendszer a legfejlettebb számítógépes spermavizsgáló rendszer. A CASA elemzés során 13 fő értékelési kategóriát különböztetünk meg (1. táblázat).

1. táblázat: A hímivarsejtek mozgási paramétereire utaló 13 fő értékelési kategória CASA rendszeren (HORVÁTH et al. 2006a; MASSÁNYI et al. 2008).

Jelölés	Angol név	Jelentés	Mérték-egység
Mot	motility	motilitás	%
pMOT	progressive motility	progresszív motilitás	%
VCL	curvilinear velocity	sebesség a teljes megtett útvonalra számolva	µm/s
VSL	straight line velocity	sebesség a kiindulási és végpont közötti távolságra számolva	µm/s
LIN	linearity	az útvonal egyenestől számított eltérése	%
VAP	average path velocity	sebesség átlagolt útvonalra számolva	µm/s
ALH	amplitude of lateral head displacement	a fej oldalirányú kitéréseinek átlagos nagysága	µm
BCF	beating cross frequency	a fej kilengésének frekvenciája	Hz
DAP	distance average path	ténylegesen megtett út és kiindulási- és végpontok közötti távolság átlagolt hossza	µm
DCL	distance curved line	ténylegesen megtett út hosszúsága	µm
DSL	distance straight line	megtett egyenes útvonal a mozgás kiindulási- és végpontjai között	µm
WOB	wobble – VAP:VCL	teljes mozgási útvonal átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése	%
STR	straightness	átlagolt mozgási útvonal egyenestől számított eltérése	%

A CASA rendszerrel a leggyakrabban alkalmazott vizsgálati paraméterek a következők:

- nem mozgó,
- helyben mozgó,
- progresszíven mozgó,
- egyenesen és nem egyenesen mozgó,
- körmozgást végző sejtek (HORVÁTH et al. 2006b).

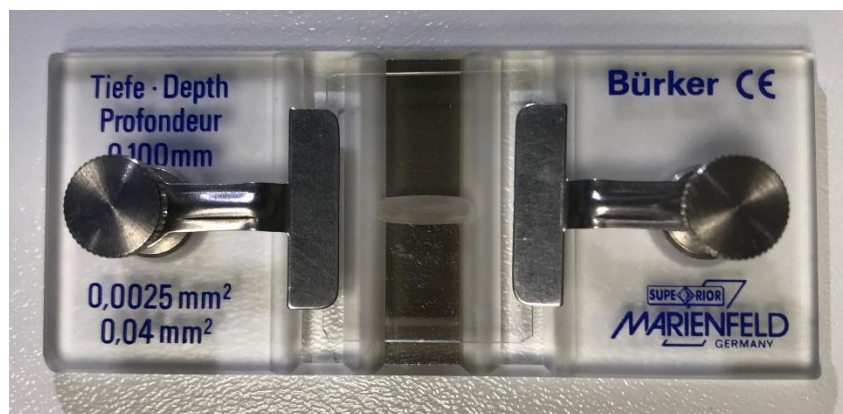
A korábbi vizsgálati módszerekhez képest a CASA rendszerrel az alábbi szempontok alapján mutatkozik meg a fejlődés:

- hímivarsejtenként láthatóvá válnak a mozgó és nem mozgó sejtek,
- a hímivarsejtek mozgása vizuálisan érzékelhetővé válik,
- ismételhető és megbízható pontosságú méréseket végezhetünk (KIME et al. 2001; HORVÁTH et al. 2006b; HOLT et al. 2018).

A legtöbb csontoshal külső megtermékenyítéssel szaporodik (BAKONYI et al. 2003). A spermációt megelőzően a spermiumok nyugalmi, másnéven immobilis állapotban maradnak az ivarsejteket körülvevő szeminális plazmában (SZABÓ et al. 2000; SADEGHI et al. 2017). A CASA rendszeren végzett motilitás vizsgálatához tehát szükséges elősegíteni egy a természetben is lejátszódó folyamatot, az ozmotikus változáson alapuló spermium aktivációt (KRASZNAI et al. 2003; WILSON-LEEDY et al. 2009). Spermációt követően a spermiumok mozgását kiváltó szaporodási közeg, azaz a víz ozmolalitása édesvízi halfajok esetében a szeminális plazmához képest alacsonyabb, sós vízben magasabb (COSSON et al. 1989; de KRETZER et al. 1998; ALAVI & COSSON 2019). A aktivációhoz szükséges ozmolalitási viszonyok legtöbbször családonként és fajonként is eltérőek, így a CASA vizsgálatokhoz specifikus oldatok elkészítése szükséges (BILLARD 1978; ALAVI & COSSON 2005, 2006). Az aktiválódott spermiumok kezdetben magas intenzitással mozognak, de hamar lassulni kezdenek, végül elvesztik mozgási képességüket. Tokfélélknél közel 10 perc is lehet, kistestű pontyfélélknél azonban akár egy percen belül is teljesen megállhatnak a spermiumok (VLADIĆ & JÄRVI 1997; COSSON 2008; GALLEGÓ et al. 2013; SCHERR et al. 2015). Csuka esetében egy perc után már kevés spermaminta éri el a 20%-os progresszív motilitási értéket. A sperma motilitás vizsgálat eredménye tehát függ a vizsgálat gyorsaságától is (HULAK et al. 2008a). A mikroszkópos vizsgálatokhoz alkalmazható egy speciálisan erre a célra kialakított, pl. Makler-típusú sejtszámláló kamra (Spermtrack, Proiser R+D, S. L., Paterna, Spanyolország; Makler, Sefi Medical Instruments, Izrael, MAKLER 1978). Először az aktiváló oldatot kell a kamrára helyezni, majd abba beletölteni és elkeverni a spermamintákat. A minták objektív alá helyezését követően készíthetők el a digitális felvételek. A rendszer automatikusan menti a mozgási paramétereket. A CASA rendszer alkalmazásához szakképzett személyzet szükséges. A munkavégzésnek gyorsnak és precíznek kell lennie. A spermasűrűség általában eltér a különböző fajok, taxonok és egyedek között is, így az alkalmazandó hígítási arány kiválasztása is nagy szaktudást igényel (CAFFEY & TIERSCH 2000).

A sperma minőségi értékeléséhez tartozik a spermasűrűség meghatározása is. Az egyik elterjedt, és rendkívül pontos, a sejtek számolására kifejlesztett eszköz a Bürker-kamra. Az eszköz lényege, hogy a lehetőség szerint egyenletesen elosztatott sejtsuszpenzióból mintát veszünk, és segítségével meghatározható az oldatban lévő sejtszám, amiből következtethetünk az egységnyi térfogatra vetített sejtsűrűsége. A kamra egy vastag (tárgylemezből) üveglemezből és egy vékony fedőlemezből áll. A

Bürker-kamra (5. ábra) négyzethálós beosztással karcolt, amelyre egy fedőlemez helyezve és leszorítva azt pontosan 0,1 mm magas tér keletkezik. A négyzethálós beosztás területegységei szintén ismertek, így tehát a térfogat is kiszámítható, ezáltal benne lévő sejtek száma is meghatározható (PUSKÁS 1993).



5. ábra: A Bürker-kamra (Marienfeld Superior, Paul Marienfeld GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Németország) (kép: Molnár József).

A milliliterenkénti átlagos sejtszám a következő képlettel határozható meg:

$N = X * (\text{Bürker-kamra négyzetének területe (1/25 mm}^2)) * (\text{Bürker-kamra magassága (1/10 mm)}) * \text{hígítási arány} * 1000$ (mértékegység átváltás μl -ről ml-re). Példa a számításhoz:

$$N = X * 25 * 10 * 1000 * 1000$$

Az „N” a minták átlagos sejtszámát, az „X” pedig a Bürker-kamrában számolt sejtek átlagát jelenti μl -ben kifejezve. A mértékegységet szükséges átváltani ml-re, így az értéket meg kell szorozni 1000-el (HORVÁTH 2001; BOKOR et al. 2010).

Sejtszámlálásra szintén alkalmazható a spektrofotométer. Az eszköz a fény meghatározott hullámhossz tartományának intenzitásváltozását méri, amin keresztül képes arányosítani a spermaszuspenzió fényelnyelését a spermakonzentrációval (CIERESZKO & DABROWSKI 1993; TAN et al. 2010). Lehetséges megoldás az áramlási citométer is, amellyel mérhető a sejtszuspenzióban áramló különálló sejtek száma is. A szabványosítási protokollok hiánya azonban rontja a vizsgálatok megbízhatóságát (TORRES et al. 2016). A sejtek számolását végezhetjük CASA rendszeren is, ennek ellenére ezt a módszert még relatív kevesen alkalmazzák. A halspermium sűrűség CASA rendszerre való átültetése jelenleg folyamatban van (DEARING et al. 2013; TALARCZYK-DESOLE et al. 2017; PATAKI et al. 2022).

2.4.4. Hűtőmedium

Hűtőmediumnak, vagy másnéven hígítónak nevezzük a sperma szeminális plazmájának ionösszetételéhez hasonló izotóniás oldatokat, amelyek körülveszik a spermiumokat és a sejtek mélyhűtésére szolgálnak. A hígítók általában faj vagy taxon specifikusak. Az adott ozmolalitással és pH értékkel rendelkező oldatban a spermiumok nem aktiválódnak, mozdulatlanul maradnak és megőrzik az életképességüket. A pH érték stabilizálása pedig a felolvasztással járó pH ingadozás elleni védelemben játszik szerepet (TORRES et al. 2016). Édesvízi halfajok esetén nagyságrendileg 150-400 mOsmol/kg közé tehető az az oldatkoncentráció, amelyben nyugalmi állapotban maradnak a hímivarsejtek, ez azonban taxonómiai besorolás és akár faj szerint változhat (MORISAWA et al. 1983). A csuka szeminális plazmájának ozmolalitása 228–350 mOsmol/kg érték között van (HULAK et al. 2008a, 2008b). A hűtőmediumok úgynevezett védőanyagokat tartalmaznak, melyek szerepe a mélyhűtés és felolvasztás közben történő sejtkárosodás megelőzése és mérséklése. A védőanyagok gátolják meg a sejten belüli jégkristályképződést azáltal, hogy serkentik a sejtek vízleadását, tehát növelik a sejten kívüli víz mennyiségét (FIGUEROA et al. 2015). Megkülönböztetünk külső és belső védőanyagokat. Belső, sejten belüli (intracelluláris) védőanyagok például a dimetil-szulfoxid (DMSO), az etilén-glikol, a propilén-glikol (BEIRÃO et al. 2011), a glicerin, a metanol vagy az 1-2-propándiol (HOAR et al. 1983). A felsorolt vegyületeket általában 5-15% közötti koncentrációban alkalmazzák. Külső, sejten kívüli (extracelluláris) védőanyagok, például a koleszterin, a kálium-lauril-szulfát, a glükóz és a szacharóz. A hűtőmediumok harmadik részét képezik a membránstabilizáló anyagok, amelyeknek a sejtmembránok védelmében van kifejezett funkciójuk, ilyenek például: a tojássárgája, vagy a szarvasmarha szérum albumin (Bovine serum albumin, BSA). Különböző szerzők más-más védőanyagot alkalmaznak halfajtól függően (LAHNSTEINER 2000; TORRES et al. 2016). Egyes hígítók alkalmazhatók egy-egy rendszertani család legtöbb halfajához. Bizonyos fajoknál azonban szükséges egyedi összetételű hígítók kifejlesztése (HOAR et al. 1983; CHRISTENSEN & TIERSCH 1996; LAHNSTEINER et al. 2003; BOZKURT et al. 2009; IRAWAN et al. 2010).

A sperma-hígító arány kiválasztása szintén meghatározó szerepet tölt be. A gyakorlati szempontú mélyhűtés esetében a kutatók lehetőség szerint mindig a legalacsonyabb mennyiségű hígító felhasználására törekednek, hogy az egységnyi kihígított és mélyhűtött oldat minél több spermát tartalmazzon. A hangsúly elsősorban az üzemi felhasználás gazdasági vonatkozásában rejlik. A magasabb spermatartalmú

oldatokból kevesebb műszalma vagy kriocső is elegendő, ezáltal gyorsul a halszaporítás termékenyítési folyamata, mindemellett költséghatékonyabbá válhat a minták tárolása is (HOAR et al. 1983; DONG et al. 2007). A hígítási arány 1:1-től 1:99-es érték között változhat halfajoktól és az eltérő kutatások eredményeitől függően (HOAR et al. 1983; DONG et al. 2007; JUDYCKA et al. 2018; MATTHEWS et al. 2018).

2.4.5. Ekvilibráció

Az ekvilibráció szó szerinti jelentése: egyensúlyba hoz, stabilizál vagy stabilabbá tesz. Tudományterületenként némiképp eltér az értelmezése (DOMJAN 2012). A spermamélyhűtés témakörében ekvilibrációnak nevezzük azt a folyamatot, amely alatt a mélyhűtéshez alkalmazni kívánt ivarsejtet és védőanyagot tartalmazó hígító oldatban a védőanyag koncentráció kiegyenlítődik az intra- és extracelluláris tér között (BELENKY et al. 2020). Az ekvilibrációs idő függ az ivarsejtet körülvevő membrán áteresztő képességétől, a védőanyag molekulaméretén keresztül annak sejtbe hatolási képességétől, valamint a tárolási hőmérséklettől (AFRIANI et al. 2021). Az ekvilibráció később a membrán- integritásban és stabilizálásban, valamint a motilitási paraméterek megőrzésében fejt ki hatását (RODINA et al. 2007; SHAHVERDI et al. 2014; JUDYCKA et al. 2020; LEE et al. 2021; NIU et al. 2022).

2.4.6. A mélyhűtés módszerei

BABIAK et al. (1999) leírták, a szublimációs hőmérséklet elérésével (-79°C) megakadályozható a jelentős mértékű intracelluláris jégképződés. Az ivartermék fagyasztása elvégezhető különböző tárolóegységekben: ampullákban (MOUNIB 1978), műszalmákban (LAHNSTEINER 2011) vagy fagyasztó (krio) csövekben (HEZAVEHEI et al. 2018).

A mélyhűtés módszerei külön értékelhetők hűtőközegek szerint is. A sperma mélyhűtését legelőször szárazjégen végezték el különböző eljárásokkal, például a tört szárazjég közé helyeztek ampullákat (MOUNIB 1978), vagy a szárazjégre rakták a műszalmákat (CHAO et al. 1987), valamint mélyedéseket olvasztottak a szárazjégbe, amelyre cseppentették a mintákat (BILLARD et al. 1993). A módszert egyre kevesebben alkalmazzák, mivel a -79°C-os szublimációs hőmérsékleten még felléphetnek sejtkristályosodási folyamatok, emellett a minták tárolása is nehézségekbe ütközik, valamint kevésbé standardizálható (HORVÁTH 2018).

A fagyasztási technológia fejlődésével a szárazjeget felváltotta a cseppfolyós nitrogén gőzének használata, amellyel a minták hűthetők hőszigetelő tulajdonságú polisztirol dobozba töltött folyékony nitrogén felszínén úszó kereten (LAHNSTEINER 2011; BORYSHPOLETS et al. 2017), kanniszteres szállítóedényben (VIVEIROS & GODINHO 2009), valamint programozható fagyasztó berendezésben (továbbiakban: CRF, controlled-rate freezer) (MAGYARY et al. 1996). A sejtek mélyhűthetők továbbá közvetlenül a cseppfolyós nitrogénben, amelyet vitrifikációnak nevezünk (XIN et al. 2017), vagy akár cseppfolyós nitrogén mentes elektromos programozható fagyasztó berendezésben is (MORRIS et al. 2017; MITCHELL et al. 2017).

Napjainkban szinte minden esetben cseppfolyós nitrogén gőzében mélyhűtenek (HORVÁTH 2018). A halspermát leginkább polisztirol dobozban és programozható fagyasztó berendezésben mélyhűtik. A polisztirol doboz könnyen beszerezhető. A mélyhűtés sebessége függ a doboz méreteitől, a dobozba töltött folyékony nitrogénen úszó keret magasságától, valamint a keretre helyezett minták hűtési idejétől (LAHNSTEINER 2011). A mélyhűtés eredményességét nagymértékben befolyásolják ezek a tényezők. Más-más szerzők eltérő méretű dobozokat, kereteket és kannákat alkalmaznak, amelyek megmutatkoznak a felolvasztás utáni motilitási értékekben. Az említett szempontok alapján az egységesített fagyasztási protokollok kidolgozása lényegesen nehezebb feladatnak ígérkezik (BORYSHPOLETS et al. 2017). A kanniszteres kannákban már egységesebb és gyorsabb a mélyhűtés folyamata, mint a polisztirol dobozban. A mélyhűtés sebessége azonban kevésbé változtatható (VIVEIROS & GODINHO 2009). A legfejlettebb mélyhűtési eszköz a programozható számítógépes berendezés, amely egy hűtőkamrából és egy specifikus szoftverrel felszerelt számítógépből áll. A hűtőkamra szondái külön méri a kamra és a minta hőmérsékletét. A szoftver segítségével előre beállítható a mélyhűtési sebesség, a hűtőkamra pedig a felhasználó által megadott program és a mélyhűteni kívánt minta hőmérséklete alapján tudja változtatni és adagolni a folyékony nitrogént (MELRADO et al. 2002; MORRIS et al. 2006). Állatfajonként jelentős eltérést mutathat a mélyhűtés sebességének sperma motilitási paraméterekre gyakorolt hatása. A programozható fagyasztó berendezésben számos hűtési protokoll beállítható, így az gyakorlatilag minden halfaj spermamélyhűtésére alkalmazható. A berendezés használatával standardizálhatóbbá és optimalizálhatóbbá válhatnak a mélyhűtési protokollok. Negatívumként viszont elmondható, hogy a méretéből adódóan a terepi munkákra kevésbé alkalmas (MAGYARY et al. 1996). A polisztirol doboz azonban

egyszerűbben mozgatható és lényegesen kevesebb eszközt igényel (LAHNSTEINER 2011). A programozható fagyasztó berendezés először az emlős ivarsejtmélyhűtésben kezdett elterjedni (THURSTON et al. 2003; MORRIS et al. 2006), mindamellett gyorsan megjelent számos a világon gazdaságilag értékes tenyésztett halfajnál (CONGET et al. 1996; JUDYCKA et al. 2019; FRANĚK et al. 2019; SANDOVAL-VARGAS et al. 2020), továbbá a hazai kutatások esetében is egyre nagyobb teret nyer (BERNÁTH et al. 2015; VÁRKONYI et al. 2018; BOKOR et al. 2019).

2.4.7. Tárolás és felolvasztás

A fagyasztás során a sejtek biztonságos tárolásának érdekében a közel -70°C -os intracelluláris hőmérsékletnél alacsonyabb tartományra kell hűteni a spermát. A hímivarterméket megőrizhetjük akár szárazjégen pellet formájában (BABIÁK et al. 1999). A -79°C -os hőmérséklet elegendő lehet, de a tárolás korlátozott mértékű, mivel ezen a hőmérsékleten még lejátszódhatnak sejtkristályosodási folyamatok. A molekulák károsodásának megelőzése érdekében a hosszútávú tároláshoz ajánlatos -130°C -nál alacsonyabb hőmérsékleten tartani a mintákat, mivel ezen a hőmérsékleten a molekulák rotációs vagy rezgő mozgáson kívül nem képesek másra. A modern ultramélyhűtők akár a -150°C -os hőmérsékletet is el tudják érni (DIOGO et al. 2018). Napjainkban a legelterjedtebb tárolási mód a folyékony nitrogénnel töltött kanniszteres kanna használata (AGARWAL 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2017), ahol a tárolás idejét csak a kozmikus sugárzás limitálhatja (HORVÁTH 2001; CABRITA et al. 2010). Az említett tárolóegységek közös jellemzője a fagyasztott minták biztonságos tárolása és szállítása. A modern, duplafalú (két fém fal és a közte lévő egyedi abszorbens anyag) eszközök szigetelése garantálja a -196°C -os hőmérsékletet mindaddig, amíg a kannából el nem párolog a nitrogén (DIOGO et al. 2018, 2019; HORVÁTH & URBÁNYI 2020).

Az újrakristályosodás elkerülése érdekében a fagyasztott mintákat viszonylag gyorsan kell felolvasztani. A felolvasztás folyamatát általánosan vízfürdőben végzik, a legtöbb halfaj esetében $30\text{--}40^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten, a mélyhűtési tárolóegységek úrtartalomtól függően meghatározott ideig (CABRITA et al. 2001; HORVÁTH et al. 2012; BOZKURT & YAVAS 2017). A megfelelő hígító felolvasztást követően nem indukálja a sejtek mozgását. Az aktiváció csak megfelelő ozmolalitási viszonyok között jön létre, melyet az erre a célra kifejlesztett aktiváló oldattal érhetünk el (HOAR et al. 1983; XIN et al. 2020).

2.5. A csukaalakúak rendjébe tartozó fajok korábbi spermavizsgálati és -mélyhűtési eredményei

A csukaalakúak (*Esociformes*) rendje mindössze két élő sugarasúszójú halcsaládot foglal magába. Az egyik a pócfélék (*Umbridae*) családja, amelyben 7 faj található, a másik pedig a csukafélék családja a maga 5 halfajával (NELSON et al. 2016). Magyarországon a pócféléket egyedül képviselő lápi póc (*Umbra krameri*) természetes élőhelyén kívüli (*ex situ*) génbanki megőrzése működik (NYESTE 2022). A faj spermamélyhűtési vizsgálatait faj- és populációvédelmi célból már megkezdték, azonban tudomásom szerint az eredményeket magába foglaló publikációk még nem érhetők el (BAJOMI et al. 2013; TATÁR 2017).

A csukaalakúak közé tartozó halfajokról azonban már számos tanulmány megjelent. Hazánkban egyedül a csuka tartozik ebbe a családba. A faj spermavizsgálati eredményeinek bemutatását külön fejezetben részletezem, itt csak a rokon fajokhoz tartozó releváns szakirodalmat ismertetem.



6. ábra: A muskellunge (*Esox masquinongy*) (http1).

LIN et al. (1996a) megállapították a muskellunge (*Esox masquinongy*) (6. ábra) átlagos spermasűrűségét, ahol $1,97 \pm 0,61 \cdot 10^{10}$ spermium/ml értéket rögzítettek. A szerzők meghatározták továbbá a szeminális plazma egyes ionos összetevőit, a fehérje mennyiségét és az ozmolalitást, amelyet a 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat: A muskellungesperma szeminális plazmájának összetétele (LIN et al. 1996a).

A muskellunge szeminális plazmájának összetétele	Átlag érték és szórás
Foszfátion (mM)	7,81±2,17
Kalciumion (mM)	1,72±0,26
Káliumion (mM)	27,88±3,27
Kloridion (mM)	120,32±7,86
Magnéziumion (mM)	1,05±0,11
Nátriumion (mM)	129,17±6,69
Fehérje (mg/ml)	0,538±0,095
Ozmolalitás (mosmol/kg)	289,5±16,8

LIN et al. (1996a) vizsgálták a muskellunge különböző hormonális indukcióinak spermatermelésre gyakorolt hatását. Eredményeikben a 3,3 mg/ttkg ponty hipofízissel $5,36 \pm 3,75$ ml, az 1000 NE/kg hCG-vel (human Chorionic Gonadotropin, Humán Coriogonadotropin) $3,1 \pm 1,52$ ml, a kontroll (0,7%) sóoldattal pedig $3,89 \pm 2,16$ ml spermát sikerült kinyerniük az egyedekből. A kontroll és kezelt csoportok között nem találtak különbséget a spermakoncentrációban, a sperma- fehérje, ionos koncentráció, valamint ozmolalitás és sperma motilitási értékek között. A módszer szerint szárazjégen, 0,1 ml-es és 0,2 ml-es pelletben, 0,6 mM szacharóz, 10% DMSO és 10% tojás sárgájával dolgoztak. A fagyasztott mintákat végül folyékony nitrogénben tárolták. Termékenyítést követően a kontrollhoz $72,9 \pm 8,7\%$ képest $30,1 \pm 3,8\%$ -os eredményt értek el az embriogenezis szempontos fázisában.

GLOGOWSKI et al. (1999) muskellungespermát mélyhűtöttek szárazjégen 0,05 ml-es pelletekben. Négy különböző hígító oldat összehasonlító vizsgálatát végezték el: 15% DMSO; 15% DMSO és 10% tojás sárgája; 15% DMA (dimetil-acetamid), valamint 15% DMA és 10% tojássárgája. Mindegyik oldat tartalmazott 0,45 mM szacharózt is. A friss spermával $63,8 \pm 1,3\%$, míg a mélyhűtött két DMSO csoport, a DMA, valamint a tojássárgáját tartalmazó hígító használatával a kontrollhoz képest 24-25%-al alacsonyabb termékenyülést értek el. A mélyhűtött csoportok kelési arányai 35-40% között mozogtak, a DMA kivételével, melynél szignifikánsan alacsonyabb 7% körüli érték mutatkozott.

CIERESZKO et al. (1999) az előző kutatáshoz hasonlóan szárazjégen, 0,1 ml-es pelletekben mélyhűtöttek muskellungespermát, melyet szintén folyékony nitrogénben tároltak. A lengyel kutatócsoport négy különböző hígítót alkalmazott: 0,6 mM szacharóz, 10% DMSO, 10% tojás sárgája (HOLTZ 1993; CIERESZKO & DABROWSKI 1996; LIN et al. 1996b); 10% DMSO, 10% tojás sárgája (ERDAHL & GRAHAM 1980); 0,3 mM glükóz, 20% glicerín (PIIRONEN & HYVÄRINEN 1983); és módosított Ringer oldat, 10% metanol (RANA & MCANDREW 1989). A fagyasztott spermával végzett szaporítást követően 24,4-35,1% közötti átlagos kelési arányt értek el.

2.6. A csuka korábbi spermavizsgálati és -mélyhűtési eredményei

BONDARENKO et al. (2018) vizsgálták a csukasperma morfológiáját, mennyiségét, sűrűségét és motilitási paramétereit az ívási időszakban, azaz február, március és április hónapokban. A legjobb spermaminőséget márciusban tapasztalták, ekkor volt a legmagasabb értéke az olyan meghatározó paramétereknek, mint a sperma mennyisége, a sperma flagellum hossza ($38,24 \pm 0,37 \mu\text{m}$ és $35,14 \pm 0,26 \mu\text{m}$) és a sperma sűrűsége ($16,2 \pm 0,2 \times 10^{10}$ spermium/ml). A sperma aktivációját követően 10 másodperccel a progresszív motilitás értékeknél nem jegyeztek fel szignifikáns eltérést. A 20-40 másodperc időtartam esetében a szaporodási időszak végi mintáknál tapasztalták a legnagyobb progresszív motilitást. ALAVI et al. (2009) vizsgálták a csukasperma ozmolilitásának hatását a sperma morfológiára, motilitásra és a flagelláris hullám paramétereire vonatkozóan. A spermiumok motilitását és sebességét befolyásolja az aktiváló közeg és az aktivációt követően eltelt idő is. A kutatás során a legmagasabb progresszív motilitást 125-235 mOsmol/kg értékű oldatnál tapasztalták (közel 100%), a sebességet pedig 125-200 mOsmol/kg érték közötti oldatkonzentrációnál mérték, ahol magasabb, mint 200 $\mu\text{m/s}$ -os értéket írtak le. A flagellum mozgását tekintve a hullámok száma és sebessége jelentősen különbözött az aktiváló közeg ozmolalitásának függvényében (0-200 $\mu\text{m/s}$ között). Az aktiváló közeg ozmolalitásának növelése a spermiumok sebességének csökkenésével járt (ALAVI et al. 2009). A spermium sebességét számos extracelluláris (például ozmolalitás), továbbá intracelluláris paraméter (ATP-tartalom és Ca^{2+} koncentráció) befolyásolja (HULAK et al. 2008a; SIDDIQUE et al. 2016). HULAK et al. (2008a) összehasonlító vizsgálatot végeztek a kioperált heréből történő sperma kinyerés és a hagyományos, a hasfal masszírozásával folytatott fejés között. Az eredményeikben a kioperált heréből nyert sperma szeminális folyadékának ozmolalitása (358 ± 77 mOsmol/kg) magasabb volt, mint a fejt spermáé (273 ± 21 mOsmol/kg). A spermakonzentráció értéke a kioperált herében szignifikánsan 30-40%-al volt magasabb a fejés módszeréhez képest. A fejéssel kevesebb spermát tudtak kinyerni, emellett vizelettel szennyeződött, mely csökkentette a spermaminőséget. A fejés okozta vér és vizelet kontamináció a spontán aktiváció mellett csökkent termékenyítőképességet is eredményez (SZABÓ 1997c, 2011; BONDARENKO et al. 2018).

SIDDIQUE et al. (2016) vizsgálták a csukasperma szemínális plazmájának összetételét, mely eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A csukasperma szemínális plazmájának összetétele (SIDDIQUE et al. 2016).

A csuka szemínális plazmájának összetétele	Átlag érték és szórás
Kalciumion (mmol/l)	0,6±0,1
Káliumion (mmol/l)	31,7±7,7
Kloridion (mmol/l)	80±26,4
Magnéziumion (mmol/l)	0,7±0,2
Nátriumion (mmol/l)	82,9±26,1
Glükóz (mmol/l)	0,2±0,2
Fehérje (mg/l)	328,8±132,1
pH	7,7±0,2
Ozmolalitás (mOsmol/kg)	200,9±52,6
Spermasűrűség (10 ¹⁰ sejt/ml)	1,41±4,3

BABIAK et al. (1997) már sikeresen mélyhűtötték a csukaspermát pellet formájában. Egyedi szinten vizsgálták a spermaminőséget mélyhűtés előtt és után. A kontroll spermamintákhoz (60–90%) képest minden esetben szignifikánsan csökkent a progresszív motilitás a mélyhűtött csoportban (10-40%). Megállapították, hogy a spermakoncentráció növekedése pozitív korrelációban áll a friss spermával történő termékenyítési eredményekkel. A spermakoncentráció egy minőségjelző indikátor lehet a mélyhűteni kívánt tenyészegyedek kiválasztásánál. GLOGOWSKI et al. (1997) kísérletükben próbálták meghatározni két hűtési technika (műszalma és pellet) és három védőanyag (DMSO, glicerín és DMA) négy különböző koncentrációjának (5%, 10%, 15%, 20%) hatékonyságát, valamint különböző hígítók (0,3 M glükóz, 0,6 M glükóz, Erdahl és Graham hígítója) alkalmazhatóságát a csukasperma mélyhűtése során. A termékenyítés folyamán a legjobb eredményt a 0,5 ml-es műszalmával történő mélyhűtési technika és 0,6 M szacharóz, 15% DMSO és 10% tojássárgája összetételű hűtőmedium együttes alkalmazása eredményezte. A módszer 90,5±1,9% termékenyülést mutatott a 89,1% kontrollhoz képest.

A legnagyobb volumenben LAHNSTEINER & MANSOUR (2008) mélyhűtötték csukaspermát -150°C-ig 1,2 ml-es műszalma alkalmazásával az alábbi összetételű hígítóval: 103 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 20 mM Hepes (N-2-hidroxi-etil-piperazin-N-2-etánszulfonsav), pH: 7,8 és 10% metanol, 1,5% BSA, valamint 7% tojássárgája. A termékenyítési kísérletek során a friss spermával szemben (71,5±2%) a mélyhűtött spermával aktiváló oldattól függően 56±4,1%-74,3±0,5% eredményt értek el. ZHANG et al. (2011) tesztelték két különböző sperma-ikra arány, valamint négy különböző összetételű hígító hatását a

mélyhűtött sperma termékenyítő képességére nézve: 0,6 mM szacharóz, 15% DMSO; 0,3 mM glükóz, 15% DMSO; 0,6 mM szacharóz, 10% metanol, valamint 0,3 mM glükóz, 10% metanol. Mindegyik hígító tartalmazott még 10% tojássárgáját és 1,7 g/l KCl-ot. A legmagasabb termékenyülést (92,2%) a glükóz alapú és 10% metanolt, 10% tojássárgáját és 1,7 g/l KCl-t tartalmazó hígítóval érték el. DIETRICH et al. (2016) kísérletükben glükóz-metanol és szacharóz-metanol tartalmú hígítóval mélyhűtöttek csukaspermát. A progresszív motilitás a friss sperma esetén 80% körüli értéket mutatott, felolvasztást követően viszont legalább 20%-kal csökkent. A termékenyítés alkalmával nem találtak szignifikáns eltérést a mélyhűtött és a friss sperma termékenyítő képessége között. A kelési arány megállapításánál szignifikánsan magasabb értékeket rögzítettek a glükóz alapú hígítóval (79%-89%) a szacharózzal szemben (74%-84,7%). CEJKO et al. (2020b) trehalózt tartalmazó hígítóval mélyhűtöttek csukaspermát (185 mM trehalóz, 40 mM KCl, 20 mM Tris, pH: 8,5; és 10% metanol). A progresszív motilitás mélyhűtés előtt és felolvasztást követően közel azonos, 30% körüli értéket mutatott. A mélyhűtött spermával statisztikailag igazolhatóan magasabb kelési eredményt (73,5%) értek el, mint a friss spermával (66,7%).

2.7. Nagy mennyiségű halsperma mélyhűtés és a mélyhűtött sperma gyakorlati alkalmazásának eddigi eredményei

Az üzemi szintű spermamélyhűtés gyakorlati alkalmazása és annak fejlődése az 1970-es években kezdődött el. Elsősorban szárazföldi gerincesek (lovak) ivarsejtjeinek fagyasztásával vette kezdetét, és már ekkor is alkalmaztak 1-5 ml-es műszalmákat (MARTIN et al. 1979; LOOMIS et al. 1983; PUGLISI et al. 2016).

Az 1990-es évektől kezdődően sikeresen tesztelték, majd alkalmazták a spermamélyhűtést több halfaj ivartermékén is, laboratóriumi és üzemi körülmények között egyaránt. WHEELER & THORGAARD (1991) lazacfélék spermájának mélyhűtésekor (4,5 ml-es műszalma, polisztirol dobozban) glükóz, tojás sárgája és DMSO alapú hígítójával a kontroll friss spermához viszonyítva átlagosan 49,3%-al alacsonyabb termékenyülést értek el, amelyet pozitív eredményként értékeltek. LAHNSTEINER et al. (1997) lazacféléken tesztelték a 0,5 ml-es, 1,2 ml-es és 5 ml-es műszalmát polisztirol dobozban és 103 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0,8 mM MgSO_4 , 20 mM Hepes, pH 7,8, 1,5% BSA, 7% tojás sárgája és 0,5% szacharóz, valamint 5% DMSO és 1% glicerin, vagy 10% metanol összetételű hígítóval. A szivárványos pisztrángnál a kontroll, a 0,5 ml-es és az 1,2 ml-es műszalma

alkalmazása esetén is közel azonos, 90% körüli termékenyülési eredményt rögzítettek. A szivárványos pisztráng termékenyítése során a kontroll spermával $93,8 \pm 3\%$, a 0,5 ml-es műszalmával $89,8 \pm 2,4\%$ eredményt értek el. Az 5 ml-es műszalmánál két felolvasztási hőmérsékletet alkalmaztak 40 másodperces időtartamban. A 35°C -on felolvasztott ivartermék $46,6 \pm 2,2\%$, míg a 40°C -os hőmérséklet csoporttal $32,6 \pm 5,8\%$ termékenyülést értek el. Tavi pisztrágnál (*Salmo trutta lacustris*) a 0,5 ml-es és 1,2 ml-es műszalmával végzett termékenyítésnél is 90% fölötti kelési eredményeket rögzítettek. A szerzők megállapították, hogy a lazacfélék szaporításánál magas termékenyülési eredmények érhetőek el a 0,5 ml-es 1,2 ml-es és 5 ml-es műszalmák használatával. Sebes pisztrágnál (*Salmo trutta fario*) azonban nem javasolják az 5 ml-es műszalmát, mivel alacsony termékenyülési értékeket írtak le vele. CABRITA et al. (2001) már sikeresen adaptálták az 5 ml-es műszalmát a szivárványos pisztráng spermájának fagyasztása során polisztirol dobozban, Erdahl és Graham hígítójával és 7% DMSO, 10% tojássárgája, valamint 7,5 mg/ml Promine (szójabab fehérje komplex, Central Soya Protein Group Denmark) együttes használatával. Felolvasztást követően a 0,5, 1,8 és 5 ml-es műszalmával termékenyítve, a friss spermához (kontroll) hasonló ($78,4\%$) termékenyülési értékeket rögzítettek.

HORVÁTH et al. (2007) pontysperma mélyhűtését követően 1,2 ml-es és 5 ml-es műszalmával magas termékenyülési értékeket értek el ($86 \pm 12\%$ és $56 \pm 36\%$), ahol 350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8,0 és 8% vagy 10% metanol hígítót, valamint polisztirol dobozt használtak. BOKOR et al. (2019) 20 mM NaHCO_3 , 6% fruktóz és 10% metanol tartalmú hígítóval fagyasztottak harcsa (*Silurus glanis*) spermát. A mélyhűtött csoportokban a progresszív motilitás értéke elmaradt a friss ivartermékkel szemben, a kelési eredmények azonban megfeleltek a keltetőházi gyakorlati eredményeknek (friss: $89 \pm 3\%$ és $68 \pm 4\%$, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $50 \pm 9\%$ és $75 \pm 5\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $53 \pm 12\%$ és $72 \pm 3\%$, CRF 10 ml-es kriocső: $52 \pm 7\%$ és $66 \pm 6\%$).

A nagy volumenű és űrtartalmú tárolóegységekkel végzett mélyhűtési kísérletek eredményeit számos további publikáció részletezi. Összegzésül elmondható, hogy különböző halfajok esetén az eljárások eredményességét a motilitási paramétereken túl, a gyakorlat a termékenyülési és kelési eredmények sikerességében méri. A különböző kutatók és laboratóriumok eltérő módszereket preferálnak, így a mélyhűtési eljárások nem egységesek, azonban hozzá kell tenni, hogy rendkívül gyorsan és dinamikusan fejlődnek (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2017; GALLEGO & ASTURIANO 2019; HEZAVEHEI et al. 2018; JUDYCKA et al. 2019).

2.8. Mélyhűtött spermából származó hallárvák fejlődéstani vizsgálatai

A halsperma mélyhűtés hatására bekövetkező sejtkárosodás és lárva fejlődési rendellenességek feltárása érdekében egyaránt készültek tanulmányok (BOBE & LABBÉ 2009; HORVÁTH et al. 2010; BERNÁTH et al. 2018). A csuka esetén ismereteim szerint még nem állnak rendelkezésre adatok a témában, csak önmagában a faj posztembrionális fejlődési szakaszairól (POSPISILOVA et al. 2019).

A következőkben a más fajok esetében bemutatott vizsgálatokat szeretném ismertetni. HORVÁTH & URBÁNYI (2000) programozható fagyasztó berendezés, 0,25 ml-es műszalma és harcsa hígító használatával mélyhűtöttek afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) spermát, majd vizsgálták a DMSO és DMA védőanyag hatását a lárvák morfológiai elváltozásaira. Kutatásukban azt tapasztalták, kontrollhoz képest a DMSO és DMA csoportokban megnövekedett a rendellenesen fejlődő egyedek száma. LABBÉ et al. (2001) a spermamélyhűtés szívárványos pisztráng fejlődésére gyakorolt hatását tanulmányozták. A hímivarterméket 0,5 ml-es műszalma, polisztirol doboz, Mounib hígító (125 mM szacharóz; 6,5 mM redukált glutation; 100 mM KHCO_3) és 10% tojássárgája, valamint 10% DMSO használatával fagyasztották. A morfológiai elemzés után nem találtak különbséget a kezelések fejlődési rendellenességeinek arányai között. A lárvamegmaradást szintén nem, míg a DNS stabilitást kismértékben befolyásolta a mélyhűtés. MISKOLCZI et al. (2005) mélyhűtött spermát felhasználva végeztek afrikai harcsa szaporítást. A fagyasztási módszer polisztirol doboz, 0,25–1,2 ml-es műszalma, harcsa hígító, valamint 10% metanol vagy DMSO védőanyag volt. A szerzők hasonló kelési arányt értek el a kontroll ($59,1 \pm 25,8\%$) és a fagyasztott csoportban ($53 \pm 28,9\%$). A lárvadeformitásban a legmagasabb értéket a 0,5 ml-es műszalma és DMSO alkalmazásával jegyezték fel (friss: $28,3 \pm 15,3\%$; mélyhűtött: $44,2 \pm 29,9\%$), azonban nem találtak szignifikáns eltérést a különböző kezelések között. HORVÁTH et al. (2007) a ponty spermát polisztirol dobozban, 5 ml-es műszalmával, cukor alapú hígítóval (350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH: 8) és 10% metanol használatával fagyasztották. Kelést követően a lárva deformitási vizsgálatokban nem találtak számottevő eltérést a friss ($15 \pm 9\%$) és a mélyhűtött ($13 \pm 7\%$) csoportok között. BOKOR et al. (2015) harcsaspermát mélyhűtöttek polisztirol doboz, 5 ml-es műszalma, harcsa hígító (6% fruktóz, 1 M NaHCO_3 , pH: 7,73) és 10% metanol alkalmazásával. A fagyasztás után felolvasztott spermamintákat indukált szaporításban használták fel, melyet követően 10 napos lárvanevelési vizsgálatot végeztek el (3 nap nem-táplálkozó- és 7 napos táplálkozó lárvaszakasz). A nem-táplálkozó lárvaszakaszban statisztikailag igazolhatóan magasabb nedves testtömeget

és testhosszt rögzítettek a mélyhűtött csoportban ($10,09 \pm 0,37$ g és $0,96 \pm 0,05$ cm), a friss csoporthoz képest ($9,02 \pm 0,3$ g és $0,94 \pm 0,05$ cm). A táplálkozó lárvaszakaszban szintén szignifikánsan magasabb testhosszt tapasztaltak a mélyhűtött ($1,92 \pm 0,13$ cm) csoportban a kontrollal ($1,89 \pm 0,14$ cm) szemben.

BERNÁTH et al. (2018) jászkeszeg (*Leuciscus idus*) spermát mélyhűtöttek polisztirol doboz, 0,5 ml-es műszalma és pér hígító (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH: $8,0 \pm 0,2$), valamint 10% metanol alkalmazásával és vizsgálták a mélyhűtésből származó lárvák morfológiáját. A kelési arány nem különbözött a friss ($22 \pm 15\%$) és fagyasztott ($33 \pm 18\%$) csoportokban. A fejlődési rendellenességet mutató egyedek aránya mindkét csoportban megegyezett ($12 \pm 4\%$).

A mélyhűtött spermából származó lárvavizsgálat a mélyhűtési technológiákhoz hasonlóan folyamatosan fejlődik. A fagyasztott hímivartermék használata általában nem okozza a lárvák rendellenes fejlődését. A deform egyedek arányának esetleges növekedése feltételezhetően inkább technológiai problémákra vezethető vissza, melyek például a fagyás közben fellépő membránsérülések, vagy a védőanyagok, melyek jellemzően „szobahőmérsékleten” idézik elő genotoxikus hatásukat (MÜLLER 2021). A vizsgálatok tervezésénél továbbá különös figyelmet kell fordítani a jövőben a mélyhűtött spermából származó táplálkozó lárvá fejlődésének és életképességének monitoringjára, mely a fagyasztás keltetőházi gyakorlatba történő integrációjának alapfeltétele. Példa lehet erre BOKOR et al. (2023) kutatása, akik mélyhűtött spermából származó ponty lárvá elő-és utónevelését végezték el tógazdasági körülmények között. Kísérletük végén nem találtak szignifikáns eltérést a friss és mélyhűtött spermából származó egyedek megmaradása és azok növekedési tendenciája között. A csuka esetében végezetül minden új ismeretanyag elősegítheti a faj szaporítási és lárvanevelési technológiájának fejlesztését.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérleti állományok tartási körülményei, kezelése

A kísérleteket a MATE-SZIC/1742-1/2022 iktatószámú „Különböző halfajok spermaminősítési és -mélyhűtési technológiájának kutatási, ökológiai, horgászati génmegőrzési és üzemi fejlesztése” című állatkísérleti igazolás jóváhagyásával végeztem.

A vizsgálatokhoz szükséges anyaállomány ($N=67$) a Szegedfish Kft. tógazdaságából származott. A spermavizsgálatok kísérletsorozatra 2018-ban Gödöllőn, a Szent István Egyetem (a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem jogelődje), Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszékén végeztem el 54 db tejjel (átlagos testtömeg: 751 ± 549 g; átlagos testhossz: 41 ± 8 cm). Az egyedek 2018. február közepén érkeztek Gödöllőre. A kísérletek egy héttel a beérkezés után kezdődtek, és március első harmadában értek véget. A halakat zárt, intenzív recirkulációs rendszer 1 m^3 -es műanyag medencéjében tartottam. A rendszer vizének fizikai tisztítását egy TM 45/23133 sűrűségű szivacsoszűrő (Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország), mint mechanikai szűrő biztosította. A biológiai szűrést egy mozgóágyas biomédia szűrőegység (RK Biomedia, Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) végezte. A csíramentesítést egy ultraibolya szűrő (Aqua Medic Helix Max, 36W, Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) biztosította. A víz forgatását, és egy felső kiegyenlítő tartályba emelését egy Pedrollo PQ 60 típusú külső szivattyú (Pedrollo S.p.A., San Bonifacio, Olaszország) látta el. A kiegyenlítő tartály a haltartó medence felett helyezkedett el, így a víz a gravitációs nyomásnak köszönhetően folyt a medencébe. Az oxigénellátásért egy Resun ACO 006 típusú légpumpa (Aquarium Kutsera Kft., Érd, Magyarország) felelt. A vízhőmérsékletet a PLC (Programmable Logic Controller) monitor (Unitronics VS70, Velinor Kft., Budapest, Magyarország) által vezérelt vízklima és akváiumi vízfűtő segítségével állítottam be. Folyamatosan működő szondarendszer (MIQ/TC 2020 XT, WTW, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Németország) segítségével követtem nyomon a vízhőmérsékletet és a víz oldottoxigén tartalmát. A kísérletek alatt a vízhőmérséklet $15\pm2^\circ\text{C}$, az oldott oxigén 8 ± 1 mg/l volt. A vizsgálatok során nem etettem a halakat. A napi megvilágítás 14 óra volt, alacsony fényintenzitás (10 lux) mellett.

A csukaszaporítási kísérletsorozatot 2019. március első hetében végeztem, amikor 5 db ikrás (átlagos testtömeg 6340 ± 1260 g) és 5 db tejes (átlagos testtömeg 1365 ± 172 g) egyeddel dolgoztam a Szegedfish Kft. keltetőházában (Szeged

külterületén). Az anyaállomány a hormonális kezelést megelőző napon került a keltetőházba. A halakat ivar szerint elkülönítve, átfolyóvízes medencékben tartották 14°C vízhőmérséklet és $9 \pm 0,5$ mg/l oxigénszint mellett. A keltetőház csőrendszere biológiailag inaktív anyagokból készült. A lefolyó hálózaton keresztül a haltartó egységekbe érkező víz gravitációs áramlását a keltetőház tetőjén elhelyezett kiegyenlítőtartály biztosította. Az oxigénellátást egy oldalcsatornás légbefúvó végezte. Az egyedek beérleléséhez természetes megvilágítást alkalmaztam. A kísérleti halállományt a vizsgálatok ideje alatt nem etettem.

A kísérleti halak hormonális kezelését és az ivartermék kinyerését megelőzően Gödöllőn a SZIE Halgazdálkodási Tanszéken 0,3 ml/l rendszervíz koncentrációjú 2-fenoxietanollal (99,5%) bódítottam el az egyedeket (KUCHARCZYK et al. 1998; VELÍŠEK & SVODOBOVÁ 2004), míg Szegeden a halgazdaság gyakorlata szerint 60 ml/100 l rendszervíz koncentrációjú 2-fenoxietanol (99,5%) oldatban végeztem az altatást.

3.1.1. A halak hormonális kezelése

A tejes egyedeket 48 órával a sperma kinyerését megelőzően hipofizáltam. A spermiáció serkentésére Gödöllőn és Szegeden is egyaránt 3,5 mg/testtömeg kg acetonnal, kiszáritott ponty hipofízist alkalmaztam. A hormonkészítményt elporítottam dörzsmozsárban, majd 3,5 mg/ml nátrium-kloridos sóoldat (0,65%-halfiziológiás sóoldat) töménységben oldottam fel. A hormont a hasúszó tövéénél, egyszeri alkalommal injektáltam be a halak hasüregébe. A tejeseket két, az ikrásokat négy nappal az ivartermék kinyerése előtt indukáltam hormonálisan SZABÓ (2001, 2008) kísérleti módszereit alapul véve. A hideg vízben ívó csuka szaporodásbiológiai sajátosságaihoz alkalmazkodva, a jobb minőségű ikra ovulációjának elősegítése érdekében nyújtott hatóanyag leadású vivőanyagban homogenizáltam az acetonnal, száritott hipofízist. A 971P karbopol polimertípus 2,5 %-os vizes diszperziója hatására fokozatosan szívódik fel a hipofízis a halakban (SZABÓ 2011). A 3,5 mg/testtömeg kg hipofízis hatóanyagú homogenizátumot 0,5 ml/kg dózisban injektáltam a halak hasüregébe.

3.1.2. Az ivartermékek gyűjtésének módszere

A csuka tejesek esetében a spermát, kísérleti beállítástól függően egyik módszer szerint fejés közben 5 ml-es steril fecskendőbe szívтам fel, hogy elkerüljem a vízzel, vizelettel, ürülékkel vagy vérrrel történő kontaminációt. A másik módszer esetében a here operálásával nyertem ki a spermát (CLOUD & PATTON 2009). Az egyedek túlaltatása után felvágtam a hasfalat (7. ábra). Eltávolítottam a herét, szárazra töröltem, majd feldaraboltam, és egy 200 µm szembőségű szitaszöveten préseltem át 5 ml-es Eppendorf csövekbe. A vizsgálatok megkezdéséig a mintákat olvadó jégre (4°C) helyeztem (BOBE & LABBÉ 2008; BOKOR et al. 2010).



7. ábra: A here kioperálását (fent) követően a heréket szárazra töröltem (lent) (kép: Bokor Zoltán).

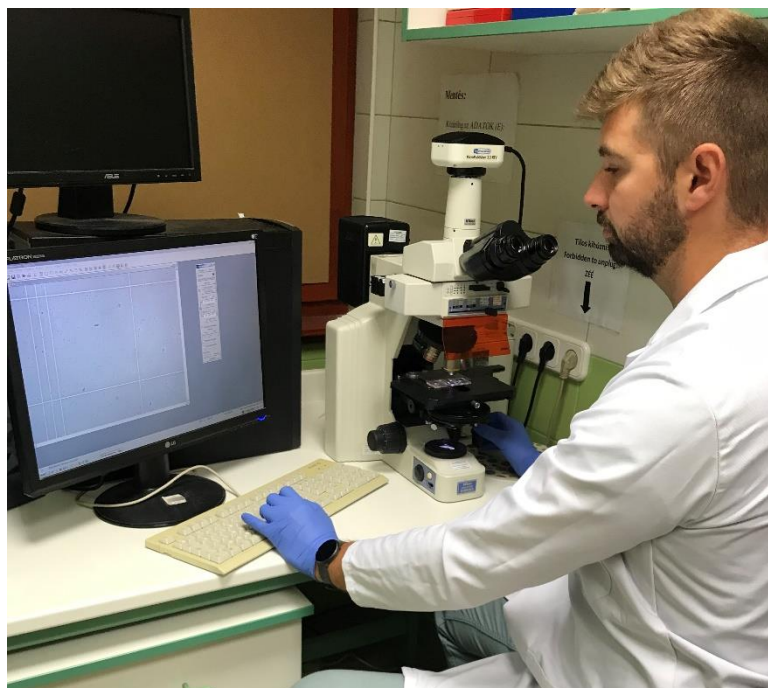
Az ikrát a klasszikusan alkalmazott fejési módszerrel nyertem ki (8. ábra). A hal fejét kismértékben megemelve a hasfal masszírozásával egy asztalra süllyesztett tálba fejtem az ivarterméket (SZABÓ 2000; CEJKO et al. 2016). Az ikrát, lefedve keltetőházi hőmérsékletén ($14 \pm 0,5^\circ\text{C}$) tároltam felhasználásig.



8. ábra: Az ikrát asztalba süllyesztett tálba fejtem (kép: Szabó Tamás).

3.2. *A spermasűrűség meghatározása*

A spermasűrűség meghatározását 54 teljes operált heréjéből préselt spermamintáinak felhasználásával a Bürker-kamrás sejtszámláló (Marienfeld Superior, Paul Marienfeld GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Németország) segítségével végeztem (HULAK 2008a; GUNETTI et al. 2012). A spermamintákat a doktori munkám alatt kifejlesztett csuka hígítóban tartottam nyugalmi (immobilizált) állapotban 1:999 arányban. A kihígított oldatokból 8-8 μl -t töltöttem a Bürker-kamra mindkét oldalára. A sejtszámláló kamrát ezután behelyeztem egy QImaging microPublisher 3.3 RTV kamerával felszerelt mikroszkópra (Nikon Eclipse E600 sztereo mikroszkóp, Apokromát Kft., Budapest, Magyarország). A mikroszkópon 20*-os nagyítás, 0,5 numerikus rekesznyílás, 10 mm fókusztávolság, 2,1 mm munkatávolság, 22 mm látótér, fáziskontraszt 1, valamint automata fehér egyensúly beállítást alkalmaztam. Spermamintánként 20 db cellát fényképeztem le QCapture Pro 5.1 (QImaging, Surrey, Kanada) szoftver segítségével (9. ábra).



9. ábra: A Bürker-kamrában kihígított sejtek fotózása (kép: Nagy Borbála).

A spermiumok számát ImageJ szoftver (ImageJ for Windows, National Institutes of Health, Egyesült Államok) alkalmazásával számoltam. A milliliterenkénti átlagos sejtszámot BOKOR et al. (2010) korábbi munkája alapján határoztam meg (lásd: 2.4.3. fejezet).

3.3. A sperma motilitás vizsgálata

A friss, illetve a mélyhűtést követően felolvasztott spermaminták motilitási vizsgálatait CASA rendszerrel végeztem (BERNÁTH et al. 2017a). Az adatokat Sperm Vision™ v. 3.7.4. (Minitube of America, Venture Court Verona, Egyesült Államok) szoftverrel értékeltem ki. A spermiumok aktiválásához LAHNSTEINER et al. (1998) által kifejlesztett csuka aktiváló oldatot (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH: 8) alkalmaztam. A spermiumok letapadásának elkerülése érdekében az oldathoz 0,5% szarvasmarha szérum albumint (BSA) adtam.



10. ábra: Sperma motilitás vizsgálat CASA rendszerrel (kép: Bernáth Gergely).

A CASA rendszerrel a sperma mozgására utaló paraméterek közül az alábbiakat vizsgáltam (10. ábra) (minden esetben két ismétlésben): progresszív motilitás (pMOT – Progressive motility, %), a hímivarsejt sebessége a ténylegesen megtett teljes mozgási útvonalára számolva (VCL – Curvilinear velocity, $\mu\text{m/s}$) és a hímivarsejt átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése (STR - Straightness, %) (RURANGWA et al. 2004; WILSON-LEEDY & INGERMANN 2007).

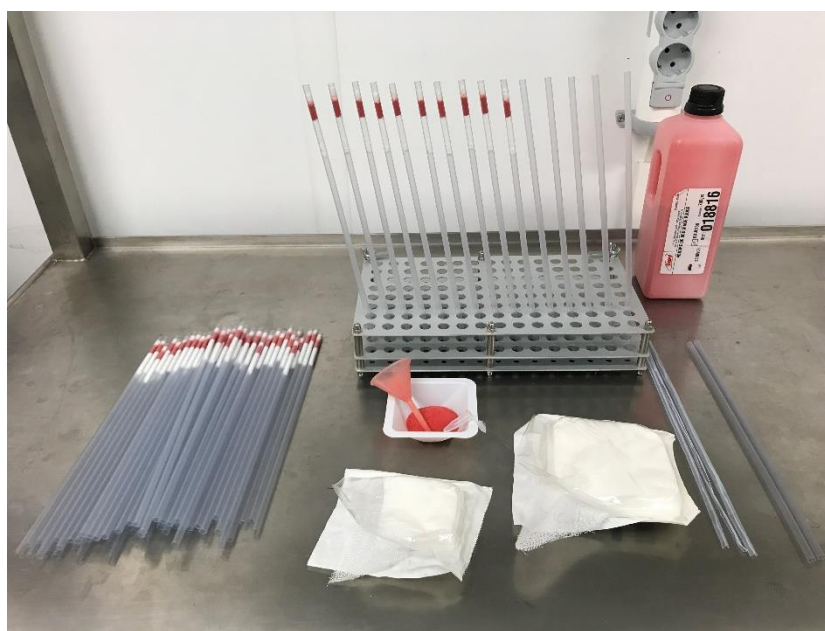
3.4. *Spermamélyhűtési vizsgálatok*

3.4.1. A spermamélyhűtési és a felolvasztási kísérletek általános folyamatai

A vizsgálatok követhetősége érdekében elsőként a mélyhűtés általános menetét ismertetem. Az egyes specifikus kísérleti beállításokat az adott vizsgálati leírásokban mutatom be. A kontroll sperma kifejezés minden esetben a friss spermát jelöli. A mélyhűtéseket egy specifikusan a csukasperma fagyasztására, a doktori munkám során megalkotott hígítóval végeztem, melynek komponenseit a csuka közeli rokona, a muskellunge sperma szeminális plazmájának összetétele alapján (lásd: 2.5. fejezet) (LIN et al. 1996a) állítottam össze: 150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH $8 \pm 0,02$.

Kísérleti beállítástól függően irodalmi adatokat felhasználva 150 mM glükózt vagy trehalózt, mint sejten kívüli védőanyagot adtam a hígítóhoz (ALAVI et al. 2009; LIN et al. 1996a). Intracelluláris védőanyagként 10% végső oldat koncentrációjú metanolt alkalmaztam (LAHNSTEINER 2000; HORVÁTH et al. 2015). A sperma aktiváló- és hígító oldatok készítéséhez elszívófülkében (Labortrend Kft. Budapest, Magyarország) elhelyezkedő mágneses keverőt (HSC Heating Magnetic Stirrer, Labsystem Kft. Budapest, Magyarország) és pH mérőt használtam (Five Easy FE20, Mettler Toledo, Budapest, Magyarország). Bizonyos kísérletekben három különböző hígítási arányt hasonlítottam össze: (sperma:hígító) 1:1, 1:9, valamint 1:19-et (HOAR et al. 1983; BOKOR et al. 2010). A fagyasztás közben a folyadékok térfogata változik, így az 5 ml-es műszalmába 4 ml, míg a 10 ml-es kriocsőbe 8 ml térfogatig töltöttem a kihígított spermamintákat. A 0,5 ml-es műszalmánál a folyadék mennyiségén nem csökkentettem. A műszalmák egyik végét fontos lezárni, hogy a befecskendezett sperma ne folyhasson át rajta a fagyasztás, majd felolvasztás közben. A 0,5 ml-es műszalma egyik vége gyárilag lezárt, míg az 5 ml-es műszalma záró kupak nélkül szerezhető be, így annak egyik végét egyedileg töltöttem és tömörítettem az alábbi anyagokkal és sorrendben: 10*10 cm-es gézlap, 0,5 ml töltőanyag (fedőpor, IMV Technologies, Franciaország) és 6*6 cm-es gézlap (BERNÁTH & HORVÁTH 2018) (11. ábra).



11. ábra: Az 5 ml-es műszalma egyik végének lezárása (kép: Molnár József).

Minden vizsgálatban megmértem a sperma motilitást (pMOT, %; VCL, $\mu\text{m/s}$; STR, %) mélyhűtés előtt és felolvasztást követően (lásd: 3.3. fejezet).

A mélyhűtést kísérleti beállítástól függően polisztirol dobozban (méretek: szélesség: 25,5 cm, hosszúság: 36 cm, belső falmagasság: 22 cm és falvastagság: 2,5 cm) és/vagy programozható fagyasztó berendezésben hajtottam végre (controlled-rate freezer, CRF, IceCube 14s, IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria) meghatározott programok szerint (4. táblázat). A folyékony nitrogénben tárolt spermaminták felolvasztása minden esetben 40°C-os vízhőmérsékletű vízfürdőben történt (Thermo Haake P5, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok).

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

Mélyhűtési programok tárolóegységek szerint

0,5 ml-es műszalma:

- polisztirol dobozba töltött folyékony nitrogén felett 3 cm-el, 3 perc (HORVÁTH et al. 2003),
- CRF, 7,5°C $\rightarrow$ -160°C, hűtési sebesség: 56°C/perc (BERNÁTH et al. 2015).

5 ml-es műszalma:

- polisztirol dobozban a folyékony nitrogén felett 3 cm-el, 7 perc (BOKOR et al. 2010),
- CRF, 4°C $\rightarrow$ -160°C, hűtési sebesség: 15°C/perc (BOKOR et al. 2019).

10 ml-es kriocső:

- CRF, 4°C $\rightarrow$ -160°C, hűtési sebesség: 15°C/perc (BOKOR et al. 2019).

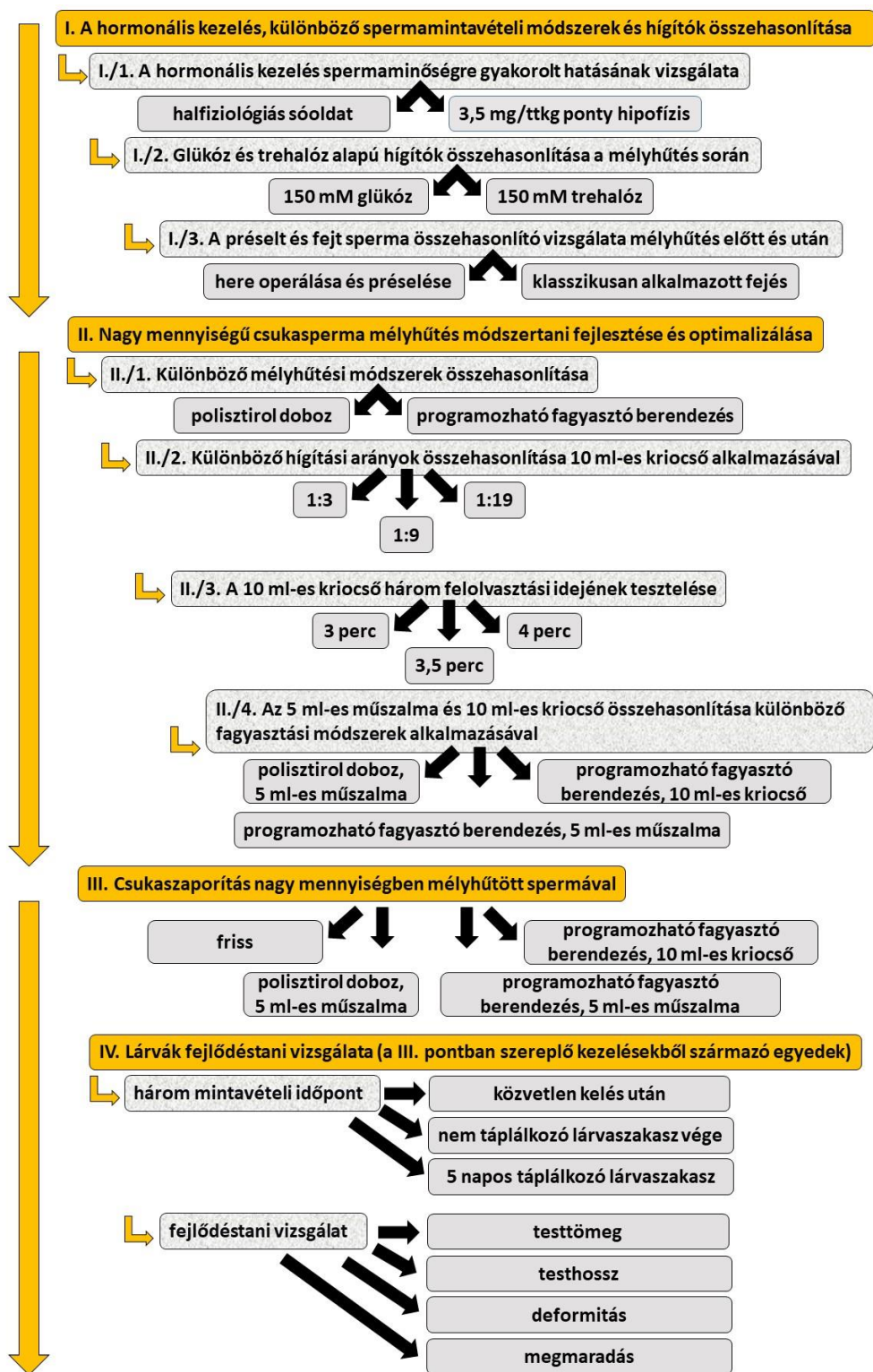
A felolvasztási időtartamok tárolóegységtől függően

- 0,5 ml-es műszalma: 13 mp (HORVÁTH et al. 2012),
 - 5 ml-es műszalma: 35 mp (VÁRKONYI et al. 2019),
 - 10 ml-es kriocső: kísérletesen lett meghatározva.
-

A mélyhűtéshez felhasznált vegyszereket a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország), Reanal (Budapest, Magyarország) és a Diagnosticum Zrt. (Budapest, Magyarország) cégektől szereztem be.

3.4.2. Kísérleti elrendezés

A doktori munkám egymásra épülő kísérletsorozatból állt. Az egyes kísérleti beállításokat mindig az előző vizsgálat(-ok) eredményeit alapul véve terveztem tovább (12. ábra).



12. ábra: A doktori munkám kísérleti tervének vázlatos elrendezése.

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

A hormonális kezelés spermaminőségre gyakorolt hatásának vizsgálata

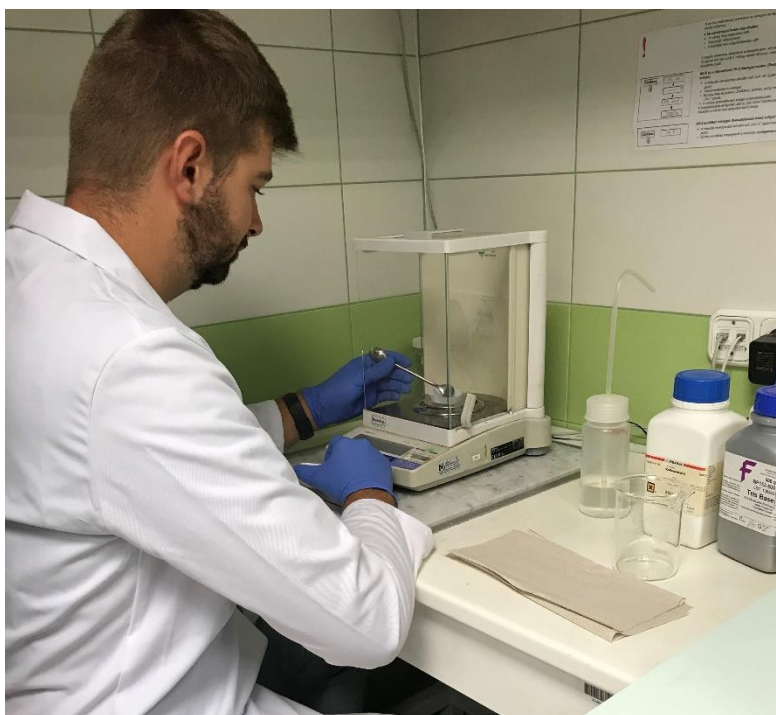
A mélyhűtéshez kapcsolódó kísérleti tervem első részében az ívási időszakban vizsgáltam a hormonális indukció hatását a sperma motilitására nézve. Két csoportot határoztam meg ($N=5-5$). A kontroll csoportban halfiziológiás sóoldatot fecskendeztem az egyedek hasüregébe 1 ml/testtömeg kg mennyiségben (13. ábra). A kezelt csoportban 3,5 mg/testtömeg kg mennyiségű ponty hipofízist adtam a sóoldathoz. A sperma kinyerését a hagyományos fejési módszerrel végeztem.



13. ábra: Csuka tejes hormonális kezelése (kép: Izsák Tibor).

Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlítása a mélyhűtés során

Az előző vizsgálat eredményei alapján a továbbiakban minden esetben a 3,5 mg/ttkg ponty hipofízis hormondózist alkalmaztam. A spermát a here operálásával és préselésével nyertem ki. A kísérleti beállítás szerint az általam fejlesztett csuka hígítóhoz 150 mM glükózt vagy 150 mM trehalózt adtam hozzá (14. ábra), extracelluláris védőanyagként (ALAVI et al. 2009; LIN et al. 1996a). A mélyhűtést 0,5 ml-es műszalmában, polisztirol dobozban végeztem 1:3, 1:9 és 1:19 hígítási arányok alkalmazásával ($N=5$).



14. ábra: A hígító oldatok alkotóelemeinek kimérése (kép: Bartucz Tamás).

Két spermakinyerési módszer összehasonlítása a mélyhűtés során, 0,5 ml-es műszalma alkalmazásával

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

3.4.4. Nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának vizsgálatai

A következőkben a 3.4.3. fejezet kísérleti eredményeinek értékelése alapján egységesen alkalmaztam a hormonális kezelést, a spermakinyeréshez a here operálását és a mélyhűtéshez a glükóزالapú csukahígítót. A vizsgálatoknál 1:9 sperma:hígító arányt használtam, kivéve ott, ahol az egyes hígítási arányokat vetettem össze.

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

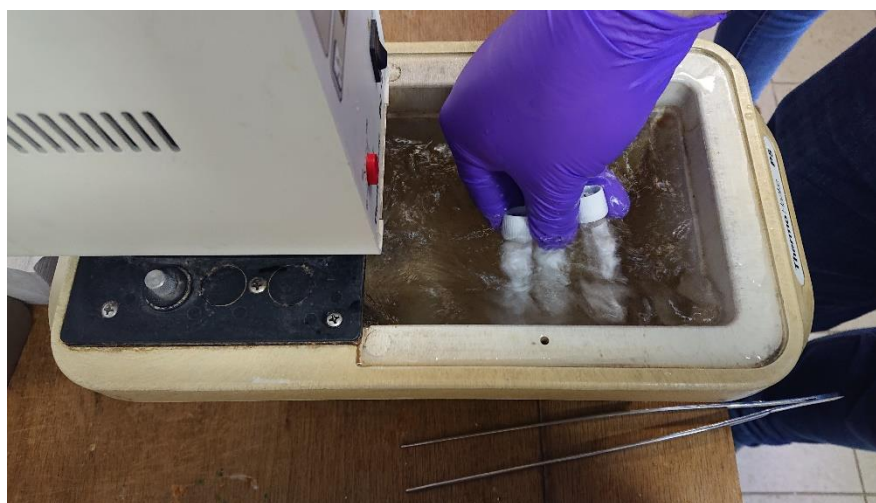
A mélyhűtés intenzifikálásának és optimalizálásának kísérleteit a polisztirol doboz és a programozható fagyasztó berendezés eszközök összehasonlításával kezdtem meg, amelyekben a 0,5 ml-es műszalmákba töltött spermamintákat fagyasztottam le ($N=7$).

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

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

Három különböző felolvasztási időtartam tesztelése 10 ml-es kriocső esetén

A 10 ml-es kriocső mélyhűtési módszerének tesztelése után a felolvasztás időtartamának optimalizálását tűztem ki célul (15. ábra). Kísérletemben három különböző felolvasztási intervallumot hasonlítottam össze: 3 perc, 3,5 perc és 4 perc ($N=9$).



15. ábra: A kriocsövek felolvasztása vízfürdőben (kép: Várkonyi Levente).

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

Keltetőházi körülmények között hasonlítottam össze az 5 ml-es műszalmát, polisztirol dobozban és CRF-ben, valamint a 10 ml-es kriocsövet a mélyhűtés eredményessége szempontjából (16. ábra) ($N=5$).



16. ábra: A sperma mélyhűtése programozható fagyasztó berendezésben és polisztirol dobozban keltetőházi körülmények között (kép: Molnár József).

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

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

Az ivartermékek előkészítése a szaporításhoz

Először a spermát nyertem ki a here kioperálásával (lásd: 3.1.2. fejezet). Csoportonként 5 tejes mintájával dolgoztam (friss és 3 mélyhűtött csoport). A spermát előkészítés után fagyasztottam le három különböző spermamélyhűtési eljárással: 5 ml-es műszalma polisztirol dobozban és CRF-ben, valamint 10 ml-es kriocső CRF-ben. A mélyhűtési kísérletek során nem találtam statisztikailag igazolható eltérést az 1:3 és 1:9 hígítási arány között, azonban irodalmi adatok javaslataira hivatkozva (HOAR et al. 1983; BOKOR et al. 2010) az 1:9 hígítási arányt választottam. A sperma mélyhűtése után fejtem le az ikrásokat (lásd: 3.1.2. fejezet), majd olvasztottam fel a spermamintákat (lásd: 3.4.1. fejezet).

Termékenyítés

Az optimális sperma:ikra arány kiválasztásához korábbi vizsgálatokban előzetesen megállapítottam az átlagos sperma sejtsűrűséget: $2,99 \cdot 10^{10}$ spermium/ml ($N=54$). Az eredményemet és LAHNSTEINER (2000) munkáját alapul véve határoztam meg a termékenyítési egységet: 2112 μ l sperma:250 g ikra. A csuka indukált szaporítását száraz termékenyítéssel végeztem el. A friss és a három mélyhűtött csoportban 5-5 ismétlést alkalmaztam. Az 5 ml-es műszalma 4 ml, a 10 ml-es kriocső 8 ml sejtszuspenziót tartalmazott. Kiszámoltam, hogy 1-1 db 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső hány ml spermát tartalmaz, így a 2112 μ l sperma:250 g ikra arány eléréséhez az alábbi mennyiségben adagoltam az ikratételekhez a mélyhűtött mintákat:

- 5 ml-es műszalma: 5 db műszalma és 1 db 28%-a,
- 10 ml-es kriocső: 2 db kriocső és 1 db 64%-a.

Az ikra és a sperma összekeverését követően rendszervíz hozzáadásával 20 másodperc aktivációs időtartamot alkalmaztam. A termékenyített ikrát kézzel keverve 10 percre duzzasztottam rendszervízzel (WOYNÁROVICH & WOYNÁROVICH 1980), majd véletlenszerű sorrendben, kezelésként elkülönítve helyeztem a 9 literes Zuger-üvegbe az egyes ikratételeket. Csersavas kezelést nem alkalmaztam.

Az ikra inkubációja

Az ikra inkubációja során a vízhőmérséklet $15,5 \pm 0,85^\circ\text{C}$, az oldott oxigén szint pedig $8,85 \pm 0,2$ mg/l volt. A víz hűtésére nem volt lehetőségem, így a keltetőházba érkező víz hőmérséklete az időjárástól függött. Az ikra érlelése 5 napig tartott. Mivel a Zuger-üvegbe helyezett termékenyített csukaikra az inkubáció kezdeti fázisában érzékeny a mechanikai sérülésekre, így kezdetben alacsony vízátfolyást biztosítottam (0,2 l/perc) (LÉVAI & HORVÁTH 1980). Az ikra ebben az időszakban jellemzően összetapad. Az inkubáció második napján emeltem a víz áramlásának mértékén, és felkevertem a letapadt ikratételeket. A penészesedés megelőzése érdekében naponta egyszer DETOX (4,5% perecetsav és 20% hidrogén-peroxid oldat; NÉMETH et al. 2012) kezelést végeztem. A penészesedésgátlót a keltetőház gyakorlata szerint 10 ml/10 l oldat töménységűre hígítottam, amelyből alkalmanként 250 ml-t juttattam be minden Zuger-üvegbe. A penészes, illetve elpusztult ikraszemeket nem távolítottam el az inkubáció alatt annak érdekében, hogy a kelési arányt meg tudjam határozni (17. ábra).



17. ábra: Vízátfolyás emelése a Zuger-üvegekben (bal), majd az ikra kezelése penészesedés ellen (jobb)(kép: Láng Levente Zete).

Kelési arány meghatározás

A kelési arányt közvetlenül a kelés pillanatában határoztam meg (18. ábra). Kezelési csoportonként és ismétlésenként szivornya segítségével mintát vettem a Zuger-üvegekből ($N=20$) oly módon, hogy az legalább 100 ikraszemet tartalmazzon. Az ikratételeket 100 mm átmérőjű Petri-csészére helyeztem. A posztembrionális élet megkezdése pillanatában az egyedekről fényképet készítettem és ImageJ szoftverrel számoltam meg az élő lárvákat, valamint az élettelen ikraszemeket. A Zuger-üvegekből ezután a keltetőházi gyakorlati módszer szerint egy szivornya segítségével leszívtam az elpusztult ikraszemeket.



18. ábra: Az ikra mikroszkópos ellenőrzése (kép: Izsák Tibor).

Az ikra keltetése

A keltetést az általánosan alkalmazott módszerrel végeztem, a halgazdaság gyakorlata szerint (SZABÓ 2000). Az első lárvák megjelenése után vártam a lárvák tömeges kelésének kezdetére. Ekkor szivornya segítségével nagyméretű tálakba szívtam le az ikratételeket csoportonként elkülönítve. Az ikra 2-3 sorban helyezkedett el egymás felett, amelyen 2-3 cm-es vízmagasságot állítottam be. Melegebb épületrészbe vittem az ikratételeket és lámpával megvilágítottam azokat. Nagyságrendileg 20 perc elteltével kikeltek a lárvák. A tálakba vizet öntöttem, felkavartam, majd a lárvák pár másodperc alatt lesüllyedtek az aljára. Az ikrahéj kisebb fajsúlyánál fogva lebegett, így azt könnyen szét tudtam választani és óvatosan leönteni a lárvák felől. A módszert 5 alkalommal ismételt meg.

Lárvanevelési vizsgálat

Kelést követően a kialakított négy csoport egyedeit két ismételtsben 1100 db lárva/ketrec mennyiségben helyeztem ki az átfolyóvizes rendszerbe (19. ábra). A haltartó egység méretei: 49 cm * 80 cm * 28 cm, háló szembőség: 0,5 mm volt. A vizsgálat során a víz hőmérséklet $15,22 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$, az oldott oxigén szint $9,67 \pm 0,46 \text{ mg/l}$ volt.



19. ábra: A lárvák kihelyezése átfolyóvizes rendszerbe helyezett ketrecekbe (kép: Izsák Tibor).

A vizsgálat 10 napig tartott, ahol három különböző lárvafejlődési stádiumban vizsgáltam az egyedek növekedési paramétereit és a morfológiai elváltozásait:

- közvetlen kelés után (20. ábra),
- a nem-táplálkozó lárvaszakasz végén (kelést követő 5. nap végén) (21. ábra),
- 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban (a kelést követő 10. nap végén) (22. ábra).



20. ábra: Csukalárva közvetlen kelés után (kép: Molnár József).



21. ábra: Csukalárva a nem-táplálkozó lárvaszakasz végén (kép: Molnár József).



22. ábra: Csukalárva 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban (kép: Molnár József).

A táplálkozás megkezdését követően a halakat 15 percenként takarmányoztam (Skretting NUTRA Pro ivadéknevelő táppal) *ad libitum*, a teljes nap folyamán. Napi két alkalommal, szivornya segítségével eltávolítottam a ketrecek aljára került tápot és bélsarat, valamint ekkor rögzítettem az elhullást is.

A három lárvafejlődési stádiumban lévő ivadékot az adott stádium elérésének napján Gödöllőre szállítottam a Halgazdálkodási Tanszékra, majd meghatároztam a nyolc lárvanevelési egységből ketrecenként 50-50 egyed nedves testtömegét és teljes testhosszát, valamint 50-50 egyed morfológiai elváltozásait. Mindhárom mintavételi napon összesen 100-100 db lárvát vettem ki a ketrecek közül a fejlődéstani vizsgálatokhoz. A teljes testhosszt mm-ben megadva vonalzóval, a nedves testtömeget

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

3.5. Az adatok elemzése és értékelése

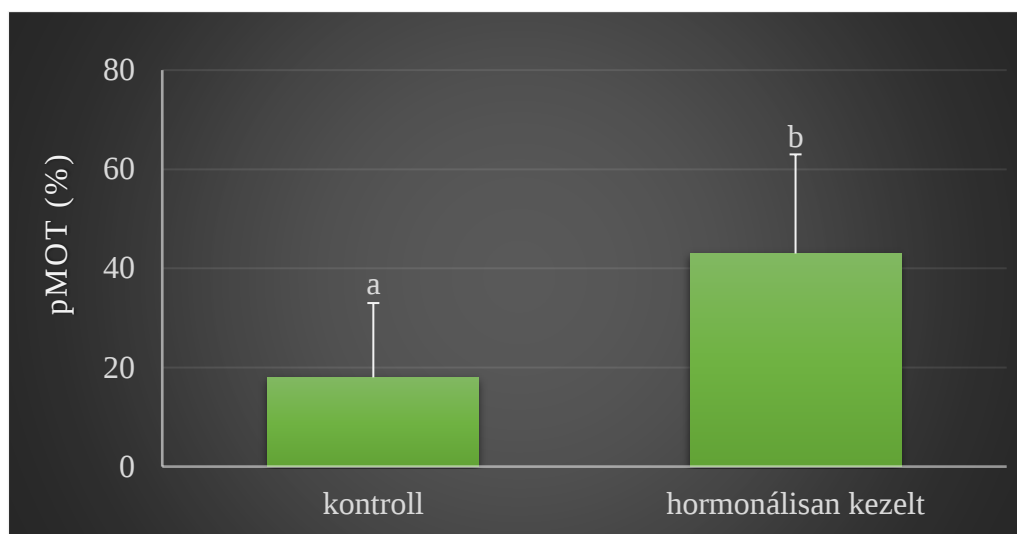
Az adatok rögzítéséhez és kiértékeléséhez Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok) szoftvert alkalmaztam. Az adatokat GraphPad Prism 5.0 for windows (GraphPad Software, La Jolla, California, Egyesült Államok) és SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Egyesült Államok) statisztikai programmal elemeztem. A friss és a mélyhűtést követően felolvasztott spermiumok motilitási paramétereit (pMOT, VCL, STR) egy- és kétszemponos ANOVA, valamint Tukey, Dunnett T3, Bonferroni post-hoc teszttel, valamint független kétmintás T-próbával hasonlítottam össze. Minden statisztikai elemzés esetében $p < 0,05$ szignifikancia szintet alkalmaztam. A normál eloszlás vizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztem, ahol a nem normál eloszlású adatsorokat arkusz-szinusz négyzetgyök és logaritmus függvényekkel transzformáltam. A lárvanevelési vizsgálatok során csoportonként két-két ismételéssel (lárvatartó ketrec) dolgoztam. Mintavételi alkalmanként az egyes csoportokon belüli ismételések adatait összevontan értékeltem. A nedves testtömeg és a teljes testhossz elemzését és összehasonlítását kétszemponos varianciaanalízissel (two-way ANOVA), valamint páronkénti összehasonlítás (Bonferroni „post hoc”) teszttel végeztem. A megmaradás kiértékelését a csoportok esélyhányadosának („Odds ratio”) összehasonlításával hajtottam végre. A lárvatorzulási adatokat Kruskal-Wallis nem paraméteres próba (páronkénti összehasonlítás Dunn „post hoc” teszt), valamint egyszemponos varianciaanalízis (one-way ANOVA, páronkénti összehasonlítás Tukey „post hoc” teszt) módszerével értékeltem ki (REICZIGEL et al. 2007).

4. EREDMÉNYEK

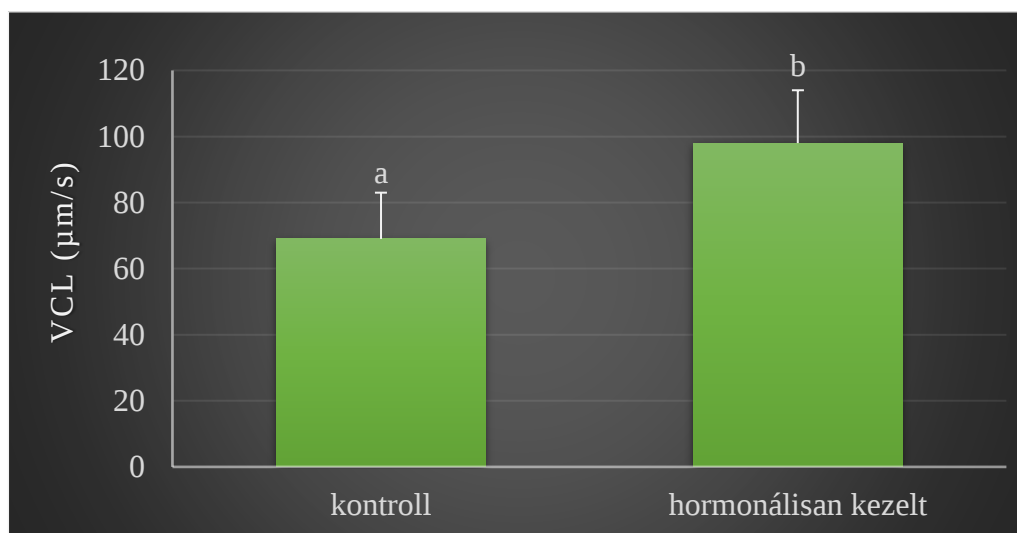
4.1. A hormonális kezelés, különböző spermamintavételi módszerek és hígítók összehasonlításának eredményei

A hormonális kezelés spermaminőségre gyakorolt hatásának eredményei

Szignifikánsan magasabb pMOT ($43 \pm 20\%$) és VCL ($98 \pm 16 \mu\text{m/s}$) értéket rögzítettem a hormonálisan kezelt csoportban, a kontrollhoz viszonyítva (pMOT: $18 \pm 15\%$; VCL: $69 \pm 14 \mu\text{m/s}$) (23. és 24. ábra).



23. ábra: A kontroll és a hormonálisan kezelt csukasperma pMOT eredményei ($N=5-5$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

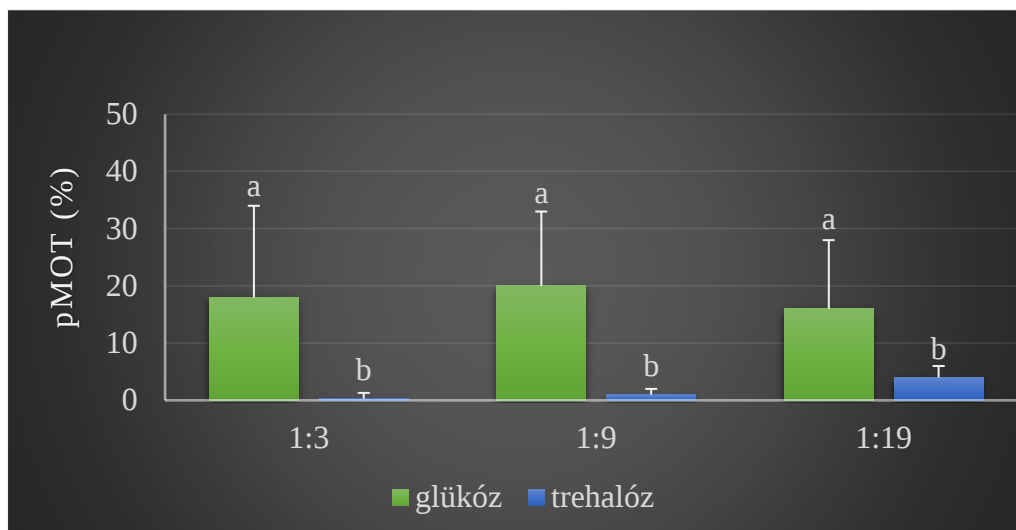


24. ábra: A kontroll és a hormonálisan kezelt csukasperma VCL eredményei ($N=5-5$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

Az STR esetében nem találtam szignifikáns különbséget a kontroll ($83 \pm 3\%$) és a hormonálisan kezelt ($79 \pm 2\%$) csoport között.

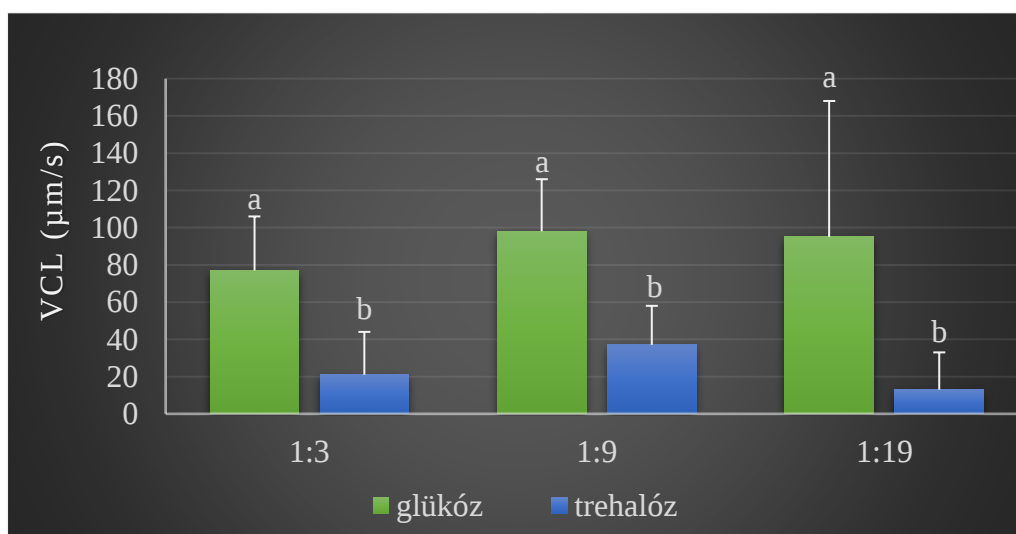
Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlításának eredményei a mélyhűtés során

Statisztikailag igazolhatóan magasabb pMOT értéket rögzítettem (25. ábra) a glükóz alapú hígító alkalmazásával minden hígítási arány tekintetében (1:3: $18 \pm 16\%$, 1:9: $20 \pm 13\%$, 1:19: $16 \pm 12\%$) összehasonlítva a trehalóz alapú hígítóval (1:3: $0,3 \pm 1\%$, 1:9: $1 \pm 1\%$, 1:19: $4 \pm 2\%$). A glükóz egyes hígítási arányai között nem tapasztaltam számottevő különbséget, így irodalmi adatokra hivatkozva az 1:9 hígítási arányt (HOAR et al. 1983; BOKOR et al. 2010) alkalmaztam tovább a vizsgálatokban.



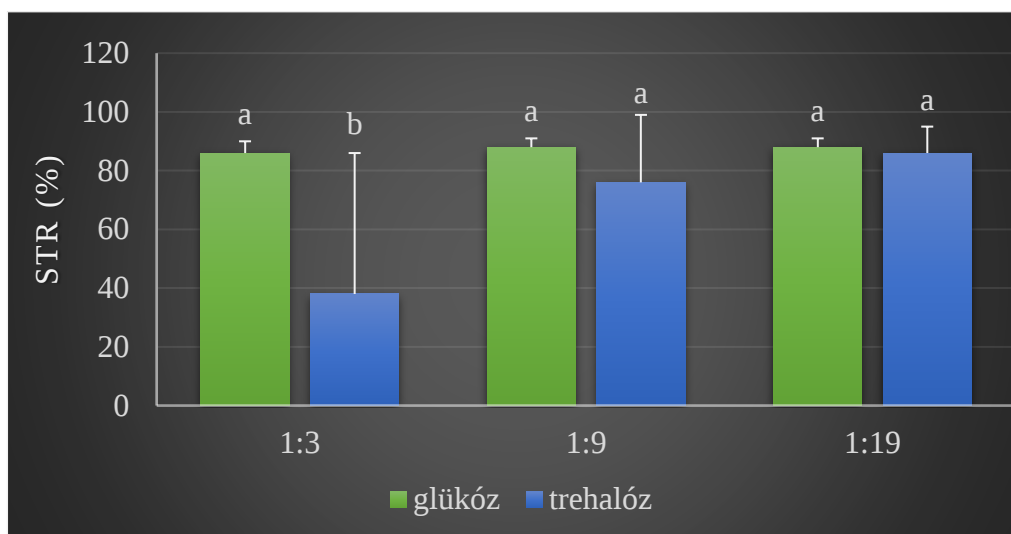
25. ábra: Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlításának pMOT eredményei felolvasztás után (N=5). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

Az 1:3 és 1:9 hígítási aránynál szignifikánsan magasabb VCL-t mértem a glükóz csoportban ($77 \pm 29 \mu\text{m/s}$ és $98 \pm 23 \mu\text{m/s}$) a trehalóz alapú hígítóhoz képest ($21 \pm 28 \mu\text{m/s}$ és $37 \pm 21 \mu\text{m/s}$) (26. ábra).



26. ábra: Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlításának VCL eredményei felolvasztás után (N=5). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

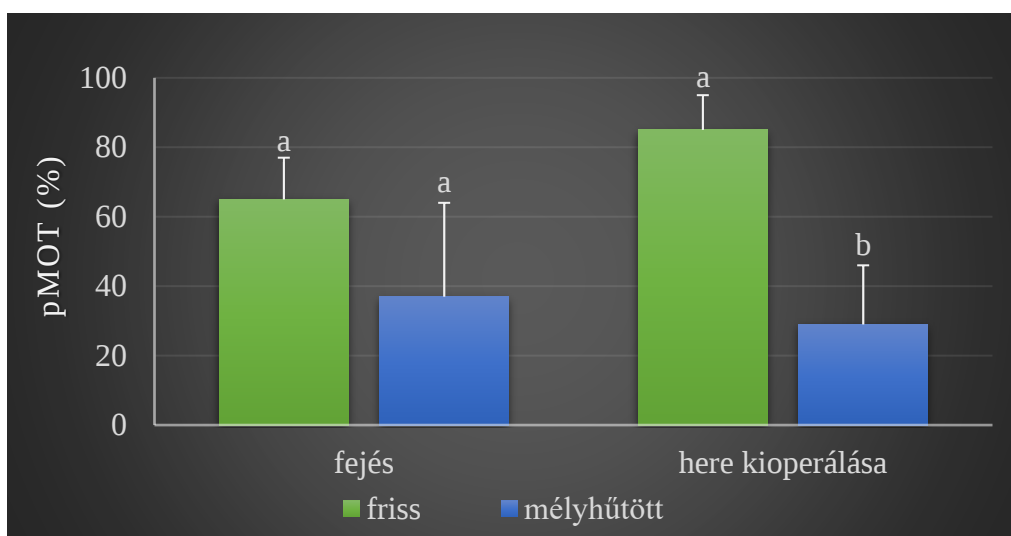
Az STR paraméternél az 1:3 hígítási arány szignifikánsan magasabb értéket mutatott a glükóz ($86\pm4\%$) esetén a trehalóz ($38\pm48\%$) tartalmú hígítóval szemben (27. ábra).



27. ábra: Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlításának STR eredményei felolvasztás után ($N=5$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

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

A fejés és here kioperálása csoportok pMOT értékei között nem találtam statisztikailag igazolható eltérést mélyhűtés előtt és után sem. A here operálás, mint spermakinyerési módszerrel gyűjtött spermaminták felolvasztása után ($29\pm17\%$) azonban szignifikánsan alacsonyabb eredményt mértem a friss sperma progresszív motilitásához képest ($85\pm10\%$). A fejt sperma esetén nem különült el igazolhatóan a friss ($65\pm12\%$) és mélyhűtött csoport ($37\pm27\%$) progresszív motilitása (28. ábra).



28. ábra: A fejéssel és here kioperálásával végzett spermakinyerési módszer pMOT eredményei ($N=5-5$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

A mélyhűtés hatására nem találtam szignifikáns eltérést a VCL és STR értékekben (kontroll, fejés: $129 \pm 10 \mu\text{m/s}$ és $81 \pm 5\%$; kontroll, kioperált here: $128 \pm 23 \mu\text{m/s}$ és $77 \pm 6\%$; mélyhűtött, fejés: $95 \pm 23 \mu\text{m/s}$ és $90 \pm 4\%$; mélyhűtött, kioperált here: $87 \pm 27 \mu\text{m/s}$ és $87 \pm 3\%$).

4.2. Nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés módszertani fejlesztésének és optimalizálásának eredményei

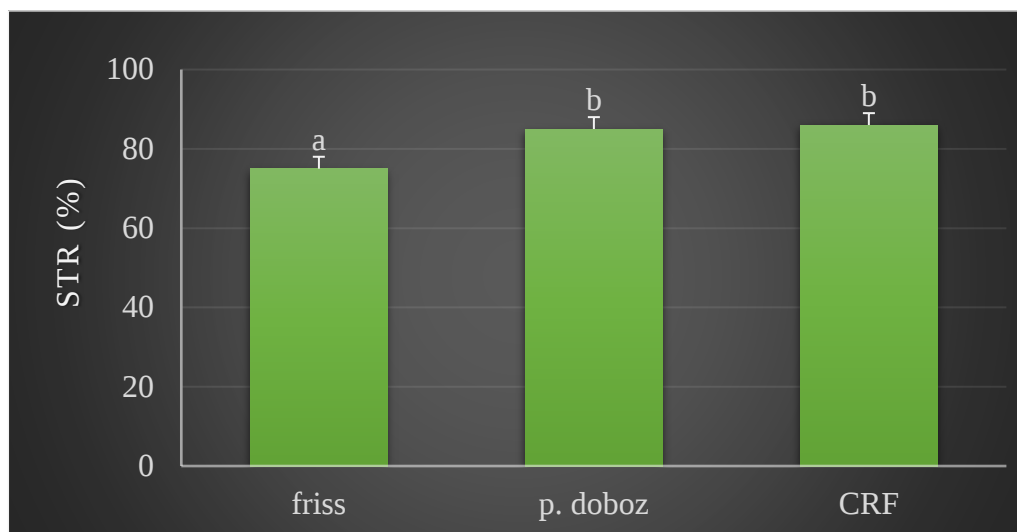
A polisztirol hűtődoboz és a programozható fagyasztó berendezés összehasonlításának eredményei 0,5 ml-es műszalma esetén

A polisztirol doboz és a CRF mélyhűtési módszer esetén is hasonlóan magas progresszív motilitási értéket rögzítettem (polisztirol doboz: $45 \pm 11\%$, CRF: $42 \pm 17\%$). Felolvasztást követően a pMOT mindkét csoportban szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest ($69 \pm 4\%$) (29. ábra).



29. ábra: A polisztirol doboz és a programozható fagyasztó berendezés összehasonlításának pMOT eredményei 0,5 ml-es műszalma esetén ($N=7$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

Az STR statisztikailag igazolhatóan alacsonyabb volt a kontroll csoportban ($75\pm 3\%$), mint a polisztirol doboz ($85\pm 3\%$) és CRF (86 ± 3) esetén (30. ábra).

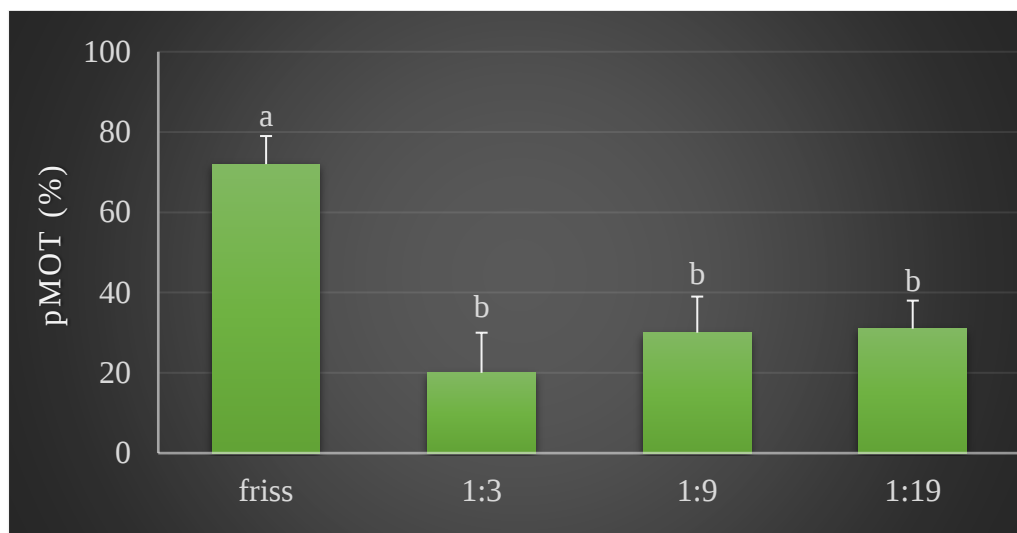


30. ábra: A polisztirol doboz és a programozható fagyasztó berendezés összehasonlításának STR eredményei 0,5 ml-es műszalma esetén ($N=7$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

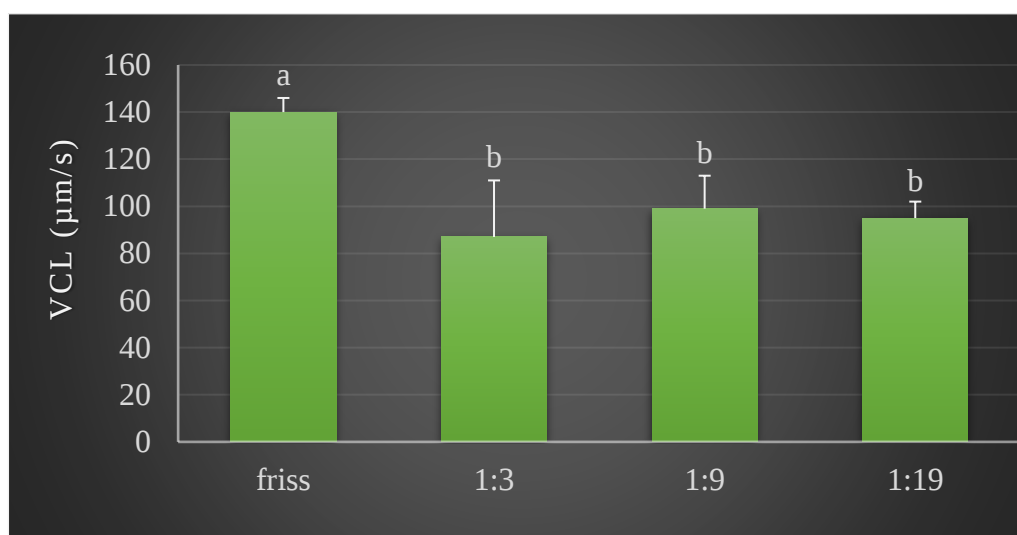
A VCL értékek nem mutattak szignifikáns eltérést a különböző csoportok között (kontroll: $137\pm 7 \mu\text{m/s}$; polisztirol doboz 0,5 ml-es műszalma: $136\pm 13 \mu\text{m/s}$; CRF 0,5 ml-es műszalma: $122\pm 23 \mu\text{m/s}$).

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

A felolvasztást követően nem találtam statisztikailag igazolható eltérést a három különböző hígítási arány motilitási paramétereit között (pMOT: 1:3- $20\pm 10\%$, 1:9 - $30\pm 9\%$, 1:19 - $31\pm 7\%$; VCL: 1:3 - $87\pm 24 \mu\text{m/s}$, 1:9 - $99\pm 14 \mu\text{m/s}$, 1:19 - $95\pm 7 \mu\text{m/s}$). A friss csoporthoz (pMOT: $72\pm 7\%$, VCL: $140\pm 6 \mu\text{m/s}$) képest azonban szignifikánsan csökkent a mélyhűtött csoportok pMOT és VCL értéke (31. és 32. ábra). A következő vizsgálatokban a 10 ml-es kriocső esetében az 1:9 hígítási arányát alkalmaztam tovább.



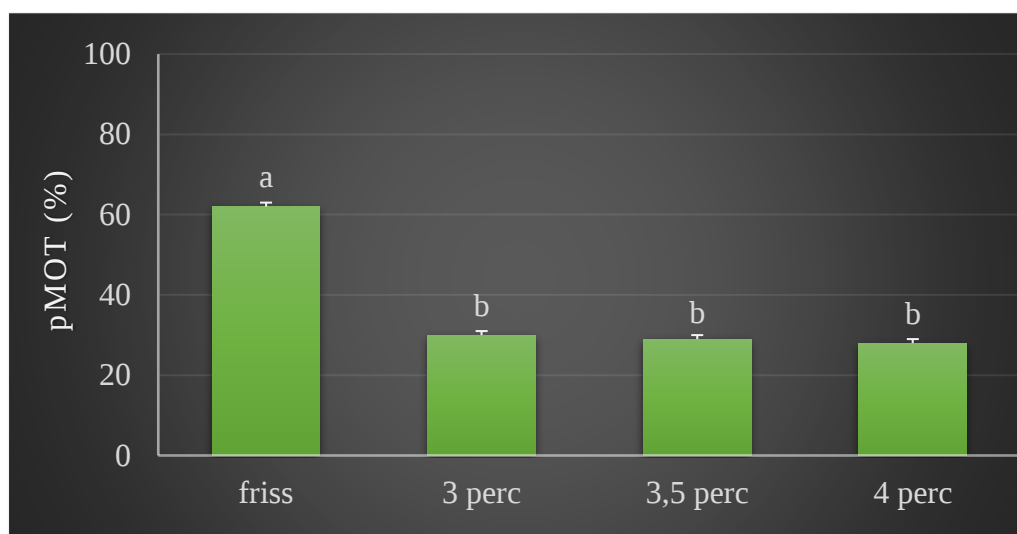
31. ábra: Különböző hígítási arányok összehasonlításának pMOT eredményei programozható fagyasztó berendezés és 10 ml-es kriocső alkalmazásával ($N=7$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).



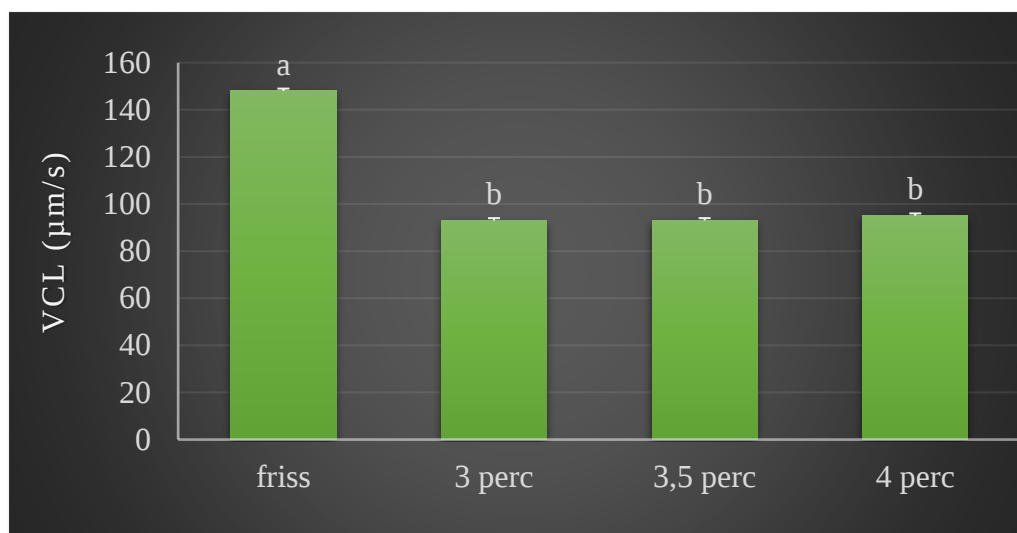
32. ábra: Különböző hígítási arányok összehasonlításának VCL eredményei programozható fagyasztó berendezés és 10 ml-es kriocső alkalmazásával ($N=7$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

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

A pMOT és VCL értékeknél nem találtam szignifikáns eltérést a mélyhűtött 10 ml-es kriocső három különböző felolvasztási ideje között (pMOT 3 perc: $30 \pm 6\%$, 3,5 perc: $29 \pm 6\%$, 4 perc: $28 \pm 8\%$; VCL: 3 perc: $93 \pm 9 \mu\text{m/s}$, 3,5 perc: $93 \pm 10 \mu\text{m/s}$, 4 perc: $95 \pm 9 \mu\text{m/s}$). A kontroll csoporthoz képest (pMOT: $62 \pm 11\%$ és VCL: $148 \pm 11 \mu\text{m/s}$) szignifikánsan alacsonyabb volt mindhárom kezelt csoport pMOT és VCL értéke (33. és 34. ábra). A további vizsgálatokban a 10 ml-es kriocsőben tárolt mintákat 3 perc időtartamban olvasztottam fel.



33. ábra: A 10 ml-es kriocső három felolvasztási időtartamának pMOT eredményei ($N=7$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

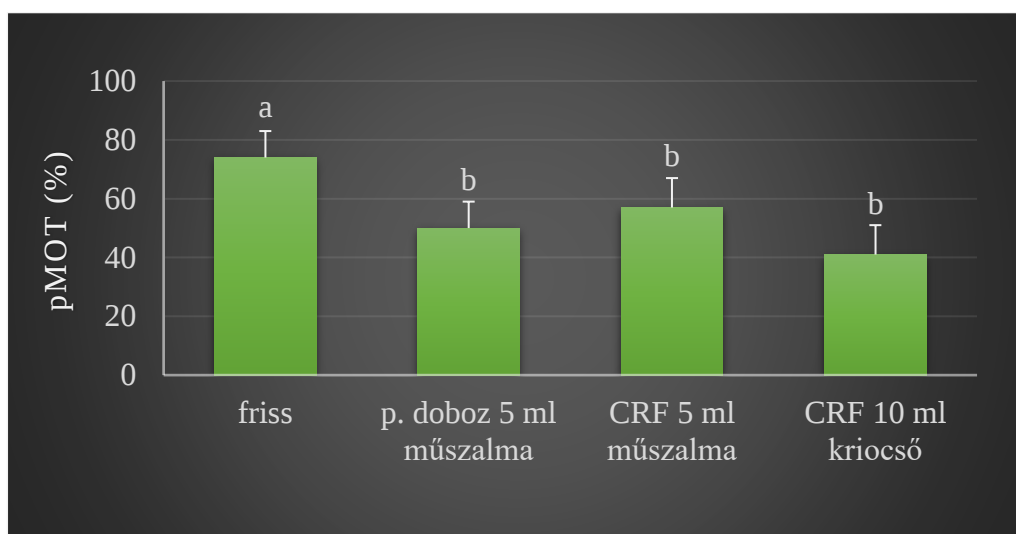


34. ábra: A 10 ml-es kriocső három felolvasztási időtartamának VCL eredményei ($N=9$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

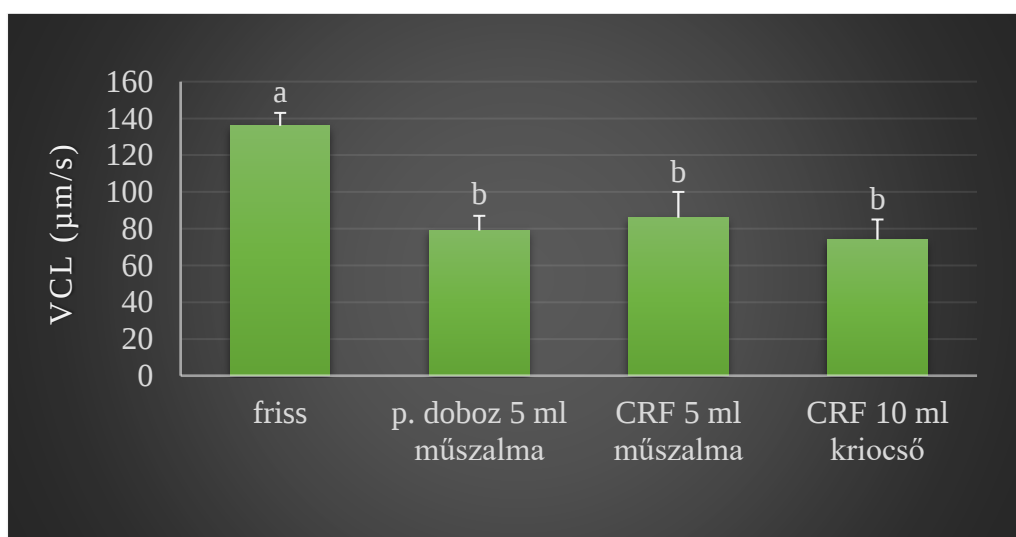
Az STR értékek nem mutattak szignifikáns eltérést a minták felolvasztását követően (1:3: $85 \pm 3\%$; 1:9: $87 \pm 3\%$; 1:19: $87 \pm 2\%$).

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

A fagyasztott minták felolvasztása után a pMOT és a VCL tekintetében nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($50\pm 9\%$ és $79\pm 8\ \mu\text{m/s}$), a CRF 5 ml-es műszalma ($57\pm 10\%$ és $86\pm 14\ \mu\text{m/s}$) és a CRF 10 ml-es kriocső ($41\pm 10\%$ és $74\pm 11\ \mu\text{m/s}$) csoportok motilitási értékei között. A fagyasztás után felolvasztott mintákkal összevetve a kontroll sperma esetén statisztikailag igazolhatóan magasabb pMOT ($74\pm 7\%$) és VCL ($136\pm 7\ \mu\text{m/s}$) értékeket rögzítettem (35. és 36. ábra).



35. ábra: Friss és három különböző módszerrel mélyhűtött sperma összehasonlításának eredményei ($N=5$). Az ábrán a pMOT átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

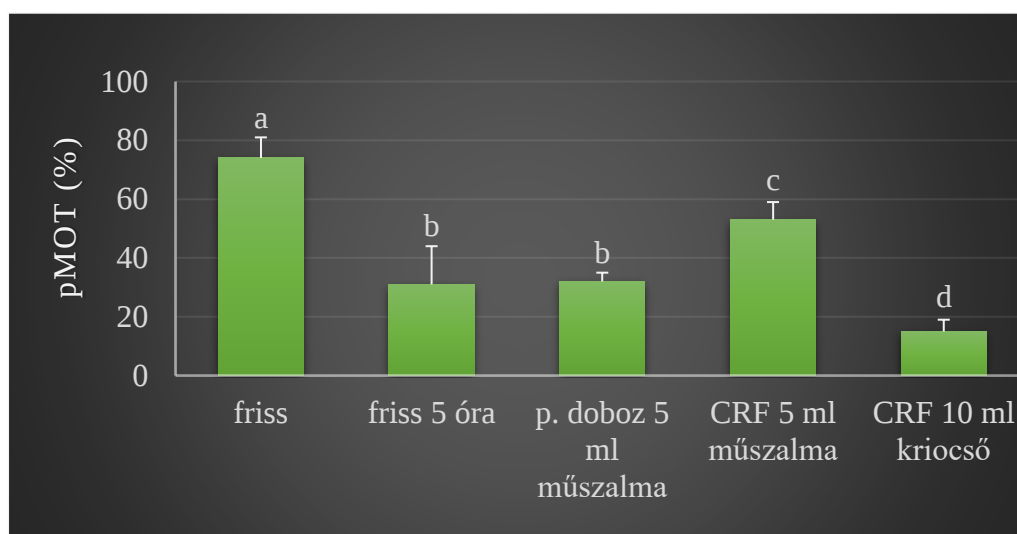


36. ábra Friss és három különböző módszerrel mélyhűtött sperma összehasonlításának eredményei ($N=5$). Az ábrán a VCL átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

Az STR esetében nem rögzítettem statisztikailag igazolható eltérést a kontroll ($87\pm 2\%$), polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($90\pm 1\%$), CRF 5 ml-es műszalma ($89\pm 2\%$) és CRF 10 ml-es kriocső ($89\pm 2\%$) csoportok között.

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

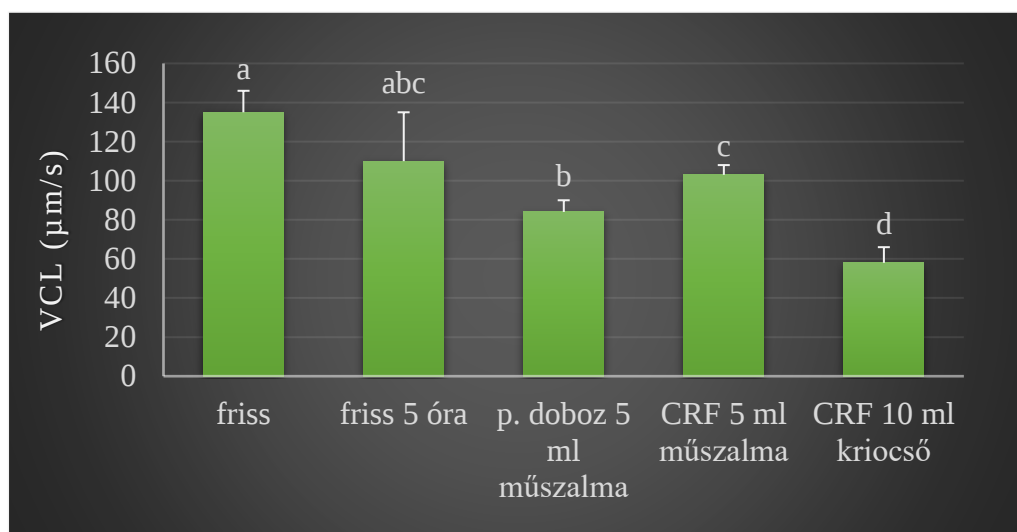
A kísérlet elején mért sperma szignifikánsan magasabb pMOT értéket mutatott ($74\pm 7\%$), mint 5 órával később, azaz a kísérlet végén ($31\pm 13\%$) és mint a három mélyhűtött csoport (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $32\pm 3\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $53\pm 6\%$, CRF 10 ml-es kriocső: $15\pm 4\%$). A kísérlet végén mért sperma és a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma csoport szignifikánsan magasabb progresszív motilitást mutatott, mint a 10 ml-es kriocső csoportja. A CRF 5 ml-es műszalma csoport esetén statisztikailag igazolhatóan magasabb eredményt rögzítettem összehasonlítva a kísérlet végén mért sperma, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma és CRF 10 ml-es kriocső csoportokkal (37. ábra).



37. ábra: Két friss és három különböző módszerrel mélyhűtött sperma összehasonlítása keltetőházi körülmények között ($N=5$). Az ábrán a pMOT átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

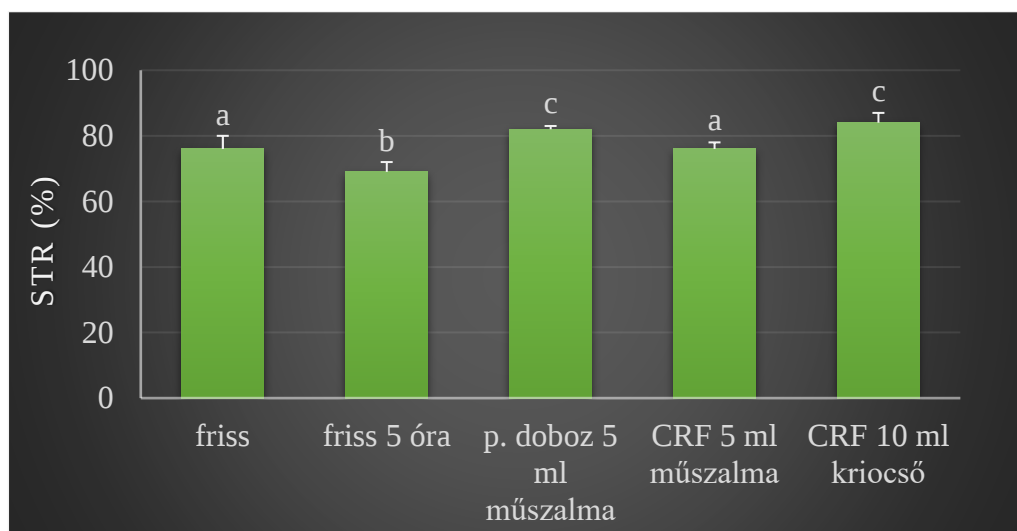
Szignifikánsan magasabb VCL eredményt rögzítettem a friss sperma esetén ($135\pm 11 \mu\text{m/s}$), mint a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($84\pm 6 \mu\text{m/s}$), CRF 5 ml-es műszalma ($103\pm 5 \mu\text{m/s}$) és CRF 10 ml-es kriocső ($58\pm 8 \mu\text{m/s}$) értékeinél. A CRF 5 ml-es műszalma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

mélyhűtött csoportokban. A kísérlet végén mért spermaminta VCL értéke ($84 \pm 25 \mu\text{m/s}$) nem különült el szignifikánsan a friss, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma és CRF 5 ml-es műszalma csoportoktól (38. ábra).



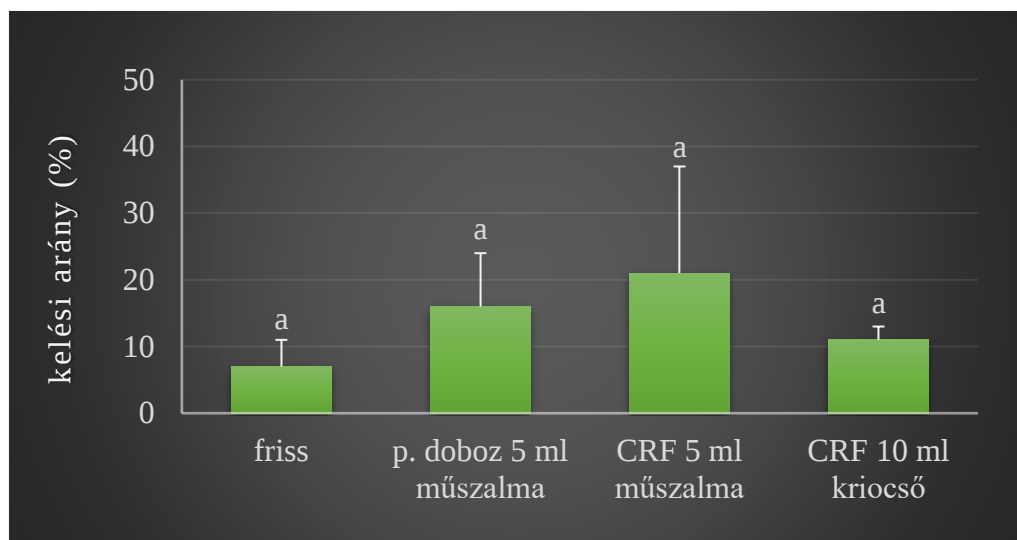
38. ábra: Két friss és három különböző módszerrel mélyhűtött sperma összehasonlítása keltetőházi körülmények között ($N=5$). Az ábrán a VCL átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

A polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($82 \pm 1\%$) és CRF 10 ml-es kriocső ($84 \pm 3\%$) csoportokban statisztikailag igazolhatóan magasabb STR értékeket rögzítettem, mint a kísérlet kezdetén mért kontroll spermaminta ($76 \pm 4\%$), 5 óra múlva mért kontroll minta ($69 \pm 3\%$) és CRF 5 ml-es műszalma ($76 \pm 2\%$) csoportok esetén. A kísérlet elején mért kontroll és a CRF 5 ml-es műszalma csoportokban szignifikánsan magasabb eredményt írtam le, mint a vizsgálat végén mért kontroll csoportban (39. ábra).



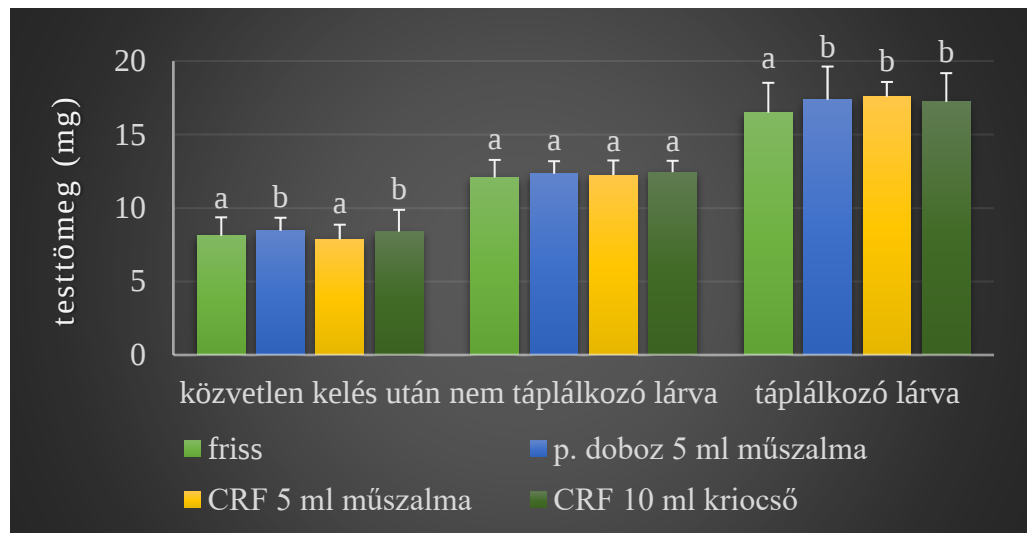
39. ábra: Két friss és három különböző módszerrel mélyhűtött sperma összehasonlítása keltetőházi körülmények között ($N=5$). Az ábrán a STR átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

A kelési arány meghatározásakor nem rögzítettem statisztikailag igazolható eltérést a friss csoport értékeiben ($7\pm4\%$), a mélyhűtött polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($16\pm8\%$), a CRF 5 ml-es műszalma ($21\pm16\%$) és a CRF 10 ml-es kriocső ($11\pm2\%$) csoportokhoz képest (40. ábra).



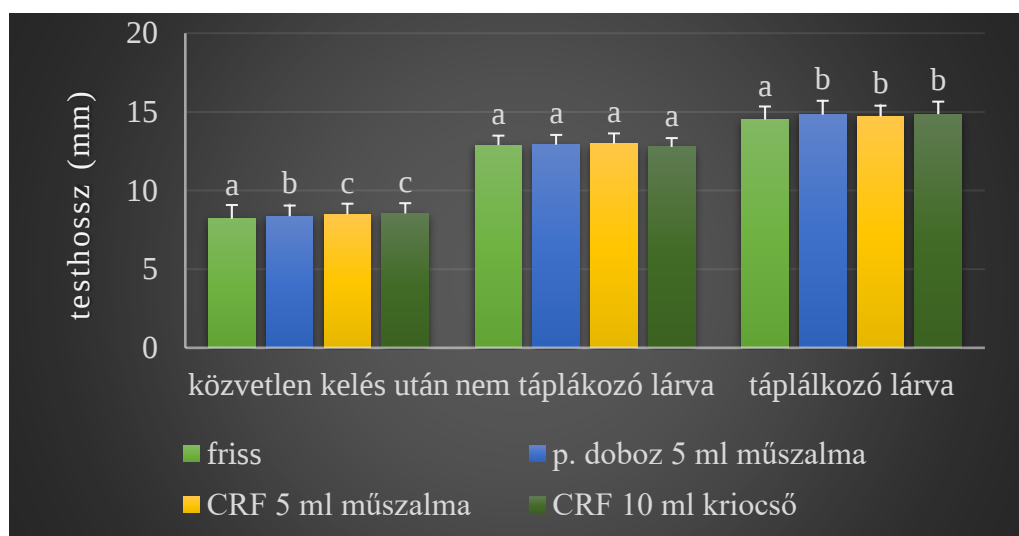
40. ábra: A friss és három különböző módszerrel fagyasztott sperma keltetőházi alkalmazásának kelési eredményei ($N=7050$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

A testtömeg adatok alapján, közvetlen kelés után statisztikailag igazolhatóan magasabb értéket tapasztaltam a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma ($8,45\pm0,89$ mg) és a CRF 10 ml-es kriocső ($8,39\pm1,49$ mg) csoportokban, mint a kontroll ($8,11\pm1,26$ mg) és a CRF 5 ml-es műszalma ($7,87\pm0,85$ mg) esetén (41. ábra). A nem-táplálkozó lárvastádium végén nem találtam szignifikáns eltérést a négy különböző csoport testtömeg adatai között. Az 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban szignifikánsan magasabb értéket rögzítettem a mélyhűtött csoportokban (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $17,38\pm2,25$ mg; CRF 5 ml-es műszalma: $17,58\pm2,18$ mg; CRF 10 ml-es kriocső: $17,28\pm1,95$ mg) a kontroll csoporttal ($16,48\pm2,04$ mg) összevetve.



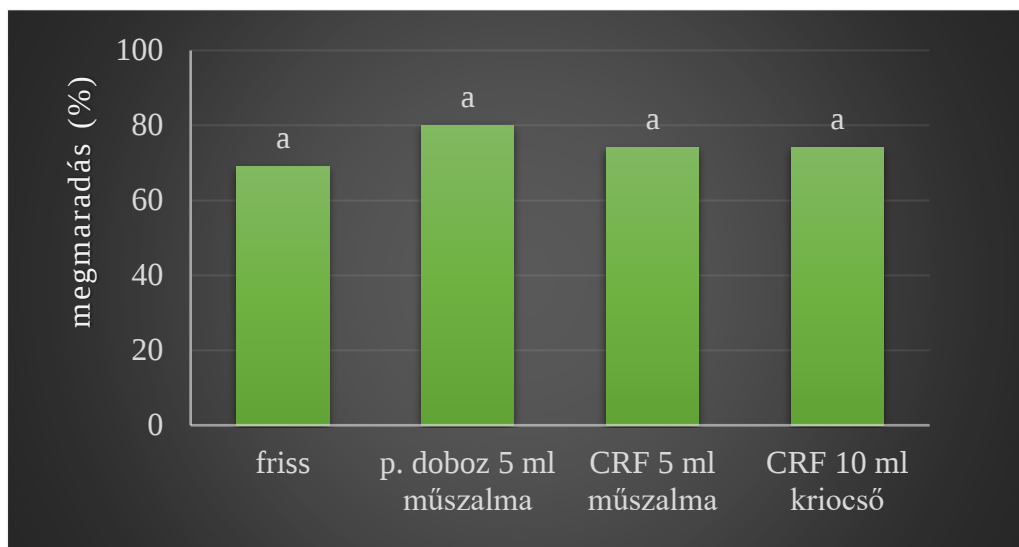
41. ábra: Friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárvák testtömegadatai rövidtávú lárvanevelési kísérlet során ($N=400$ /mintavételi időpont). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p<0,05$).

A testhossz adatok értékelésénél közvetlen kelés után a mélyhűtött csoportokban szignifikánsan magasabb értéket rögzítettem (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $8,37\pm0,68$ mm, CRF 5ml-es műszalma: $8,49\pm0,67$ mm és CRF 10 ml-es kriocső: $8,54\pm0,66$ mm), mint a kontroll csoportban ($8,22\pm0,86$ mm). A CRF 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső csoportjai továbbá szignifikánsan magasabbak voltak, mint a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma csoportja. A nem-táplálkozó lárvaszakasz végén nem találtam statisztikailag igazolható eltérést a kontroll ($12,89\pm0,65$ mm) és a mélyhűtött csoportok között (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $12,91\pm0,70$ mm, CRF 5ml-es műszalma: $12,98\pm0,64$ mm és CRF 10 ml-es kriocső: $12,77\pm0,67$ mm). Az 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban szignifikánsan magasabb testhosszt rögzítettem a mélyhűtött csoportokban (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $14,83\pm0,86$ mm, CRF 5 ml-es műszalma: $14,71\pm0,67$ mm és CRF 10 ml-es kriocső: $14,86\pm0,94$ mm), mint a kontroll esetén ($12,89\pm0,65$ mm) (42. ábra).



42. ábra: Friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárvák testhosszadatai rövidtávú lárvanevelési kísérlet során (N=400/mintavételi időpont). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók ($p < 0,05$).

A rövidtávú lárvanevelés során nem jegyeztem fel szignifikáns eltérést a friss (69%) és a három mélyhűtési módszerrel fagyasztott spermából származó (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: 80%, CRF 5 ml-es műszalma: 74%, CRF 10 ml-es kriocső: 74%) lárva megmaradás értékei között (43. ábra).



43. ábra: A friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárvák megmaradásának eredményei (N=4755). Az ábrán átlagértékek láthatók ($p < 0,05$).

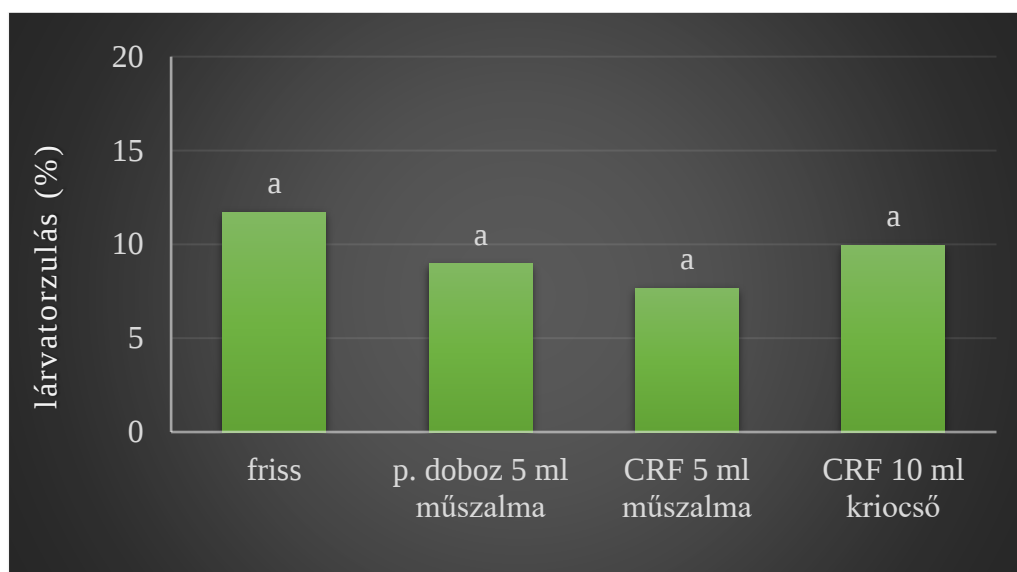
A lárvamorfológiai vizsgálatok eredményei

A lárvamorfológiai mintavételezések során technikai okok miatt a vizsgált mintaelemszám némiképp eltért a 100 db egyed/csoport/mintavételi időpont kísérleti tervtől. A lárvák szállítása közben megsérült a kontroll 5 napos táplálkozó lárva csoport halszállító zsákja, így az egyedek elpusztultak (5. táblázat).

5. táblázat: A lárvamorfológiai mintavételezés során vizsgált lárva egyedszámok (db) mintavételi időpontonként és csoportonként.

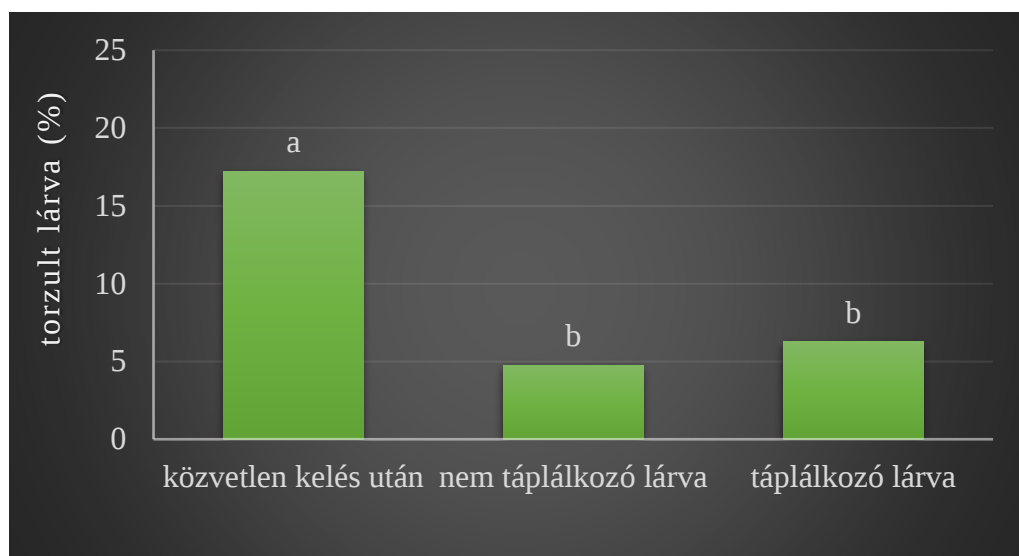
Lárva egyedszáma (db)	Kontroll	Polisztirol doboz 5 ml-es műszalma	CRF 5 ml-es műszalma	CRF 10 ml-es kriocső	Lárva összesen
Közvetlen kelés után	101	101	100	99	401
Nem-táplálkozó lárvaszakasz vége	100	100	100	100	400
5 napos táplálkozó lárva	50	100	100	100	350
10 napos lárvafejlődési szakasz összesen	251	301	300	299	1151

A kezelési csoportokat értékelve a friss és mélyhűtött spermából származó lárvák torzulási arányai között nem találtam szignifikáns eltérést (friss: 11,71%, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: 8,97%, CRF 5 ml-es műszalma: 7,66%, CRF 10 ml-es kriocső 9,96%) (44. ábra).



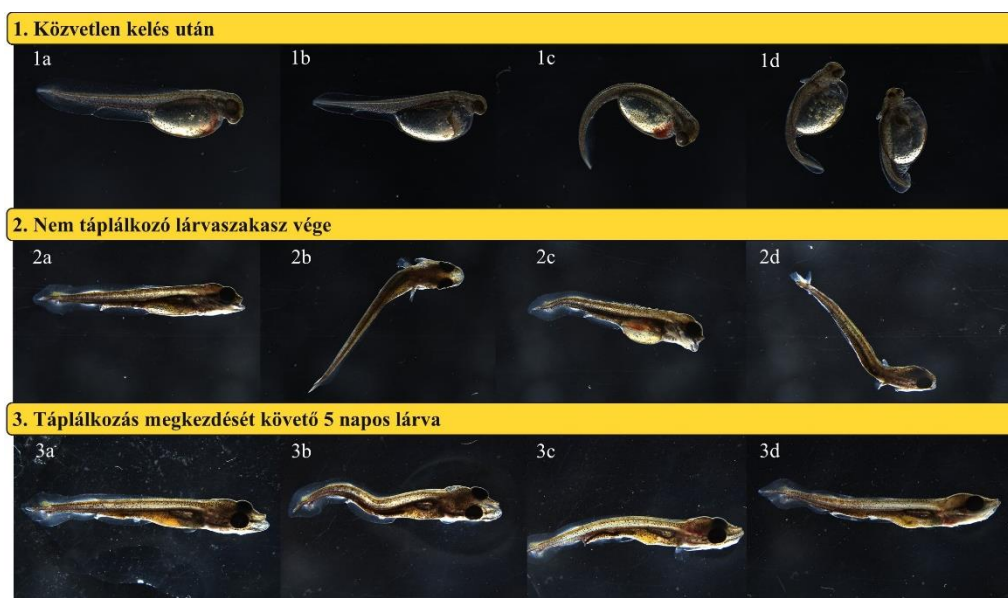
44. ábra: A friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárva torzulásának eredményei ($N=1151$). Az ábrán átlagértékek láthatók ($p<0,05$).

A lárvamorfológiai vizsgálatok kiértékelése során szignifikánsan több torzult lárvét jegyeztem fel közvetlenül a kelést követően (17,2%), a nem-táplálkozó lárva (4,75%) és az 5 napos táplálkozó lárva stádiumhoz (6,28%) képest (45. ábra).



45. ábra: A friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárva torzulásának eredményei (N=1151). Az ábrán átlagértékek láthatók ($p < 0,05$).

A lárvamorfológiai vizsgálatok kiértékelése során esetenként több szervi elváltozás is megfigyelhető volt egy egyeden (46. ábra).



46. ábra: A kísérlet során előforduló fejlődési rendellenességek különböző lárvafejlődési szakaszokban. Az 1a, 2a és 3a-val jelölt képeken a kontroll, egészséges egyedek láthatóak. A főbb torzulások a jelölések szerint az alábbiak: 1b: kraniofaciális deformitás és ödéma; 1c: test görbülete; 1d: kraniofaciális deformitás, szem deformitás, ödéma, szomita eltérés, eltérés a szik alakjában, faroktorz; 2b: test görbülete; 2c: kraniofaciális deformitás, ödéma, test görbülete, faroktorz; 2d: kraniofaciális deformitás, test görbülete, eltérés a szik alakjában, szomita eltérés; 3b: kraniofaciális deformitás, test görbülete, hematóma; 3c: kraniofaciális deformitás, test görbülete, szomita eltérés, 3d: kraniofaciális deformitás, test görbülete, faroktorz, szomita eltérés (kép: Molnár József).

Közvetlen kelés után nem találtam statisztikailag igazolható különbséget a lárvadeformitási arányok között, azonban a legmagasabb értéket a kontroll csoportban rögzítettem. Az ödéma előfordulása volt a leggyakoribb alaktani elváltozás, amely leginkább a kontroll és CRF 5 ml-es műszalma csoportokban volt szembetűnő (6. táblázat).

6. táblázat: Különböző szervi elváltozások megfigyelésén alapuló lárvatorzulási vizsgálatok eredményei közvetlen kelés után. A táblázat a kezelés esetében a különböző torzulások előfordulásainak számát fejezi ki (N=401).

Lárva egyedszáma (db)	Kontroll	Polisztirol doboz 5 ml-es műszalma	CRF 5 ml-es műszalma	CRF 10 ml-es kriocső
összes egyed	101	101	100	99
ebből torzult egyed	27	17	12	13
test görbülete	8	3	6	3
faroktorz (hiány, rövidülés)	9	7	4	5
szem deformitás (alak, lencse)	4	5	0	0
eltérés a szik alakjában	1	2	1	0
kraniofaciális deformitás	3	5	2	2
ödéma (szik és szív)	17	8	5	14
szomita eltérés (alak, szám)	4	2	1	0

A nem-táplálkozó lárvaszakasz végén mindegyik csoportban alacsony számban tapasztaltam lárvatorzulást (7. táblázat), valószínűleg az idő múlásával kiszелеktálódtak a torzult egyedek. A testi elváltozással rendelkező lárvák száma kiegyenlített értéket mutatott az egyes csoportok között.

7. táblázat: Különböző szervi elváltozások megfigyelésén alapuló lárvatorzulási vizsgálatok eredményei a nem-táplálkozó lárvaszakasz végén. A táblázat a kezelés esetében a különböző torzulások előfordulásainak számát fejezi ki (N=400).

Lárva egyedszáma (db)	Kontroll	Polisztirol doboz 5 ml-es műszalma	CRF 5 ml-es műszalma	CRF 10 ml-es kriocső
összes egyed	100	100	100	100
ebből torzult egyed	5	5	4	5
test görbülete	2	1	2	1
faroktorz (hiány, rövidülés)	0	0	0	1
szem deformitás (alak, lencse)	0	0	0	2
eltérés a szik alakjában	1	1	0	2
kraniofaciális deformitás	0	2	0	2
ödéma (szik és szív)	2	4	2	1
szomita eltérés (alak, szám)	0	1	0	0

Az 5 napos táplálkozó lárva morfológiai vizsgálata során a nem-táplálkozó lárvaszakaszhoz hasonlóan alacsony számban tapasztaltam deformált egyedeket (8. táblázat). A CRF 5 ml-es műszalma és CRF 10 ml-es kriocső csoportokban a lárvatorzulás mértéke habár nem szignifikáns mértékben, de mérsékeltem magasabb volt, mint a kontroll és a polisztirol doboz 5 ml-es műszalma csoportokban. Az 5 napos táplálkozó lárva állapotban megjelent egy új típusú, akár fizikai sérülés hatására is kialakuló fejlődési rendellenesség, a hematóma, amely minden csoportban megfigyelhető volt.

8. táblázat: Különböző szervi elváltozások megfigyelésén alapuló lárvatorzulási vizsgálatok eredményei az 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban. A táblázat a kezelés esetében a különböző torzulások előfordulásainak számát fejezi ki (N=350).

Lárva egyedszáma (db)	Kontroll	Polisztirol doboz 5 ml-es műszalma	CRF 5 ml-es műszalma	CRF 10 ml- es kriocső
összes egyed	50	100	100	100
ebből torzult egyed	3	5	7	7
test görbülése	0	2	3	3
faroktorz (hiány, rövidülés)	0	0	0	2
szem deformitás (alak, lencse)	0	0	0	1
eltérés a szik alakjában	0	0	3	1
kraniofaciális deformitás	0	0	0	1
ödéma (szik és szív)	0	0	0	0
szomita eltérés (alak, szám)	0	0	0	0
hematóma	3	3	2	3

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Következtetések

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

A hormonális kezelés és a két spermakinyerési módszer spermaminőségre gyakorolt hatásának eredményeiből levonható következtetések

A csukasperma sűrűségének meghatározásánál átlagosnak tekinthető értékeket állapítottam meg ($2,99 \cdot 10^{10}$ spermium/ml), összehasonlítva korábbi közleményekben leírtakkal ($1,4\text{--}5,76 \cdot 10^{10}$ spermium/ml; GINZBURG 1968; DE MONTALEMBERT et al. 1980; KOLDRAS & MOCZARSKI 1983; LINHART 1984; HULAK et al. 2008b; CEJKO et al. 2020b).

A megfelelő spermakinyerési mód kiválasztásánál a spermaminőség állt a vizsgálatok középpontjában. A hormonális indukció segítségével szignifikánsan magasabb motilitási eredmények érhetők el. Az általam rögzített értékeket (kontroll pMOT: $43 \pm 20\%$ és VCL: $98 \pm 16 \mu\text{m/s}$; hormonálisan kezelt: pMOT: $18 \pm 15\%$ VCL: $69 \pm 14 \mu\text{m/s}$) megerősítik korábbi tanulmányok leírásai (HULAK et al. 2008a; CEJKO et al. 2018) is. A klasszikusan alkalmazott fejéssel a sperma vizelettel és vérrel kontaminálódhat, amely rontja a spermaminőséget, és spontán aktivációhoz is vezethet. A kioperált here alkalmazásával viszont elkerülhetjük ezt (SZABÓ 1997c, 2011; HULAK et al. 2008a; BONDARENKO et al. 2018). Kutatásomban a progresszív motilitásban nem találtam szignifikáns eltérést a fejés és a kioperált here módszere között mélyhűtés előtt (fejés: $65 \pm 12\%$, kioperált: $85 \pm 10\%$) és után (fejés: $37 \pm 27\%$, kioperált here: $29 \pm 17\%$). A fagyasztott sperma felolvasztását követően viszont szignifikánsan csökkent a kioperált here csoport pMOT értéke. A két spermakinyerési módszer közül javaslom a here kioperálását, mivel így akár tízszeres nagyságrenddel több sperma nyerhető ki a fejéshez képest. A keltetőházakban bevett gyakorlat a tejes egyedek feláldozása. Egyelőre nem áll rendelkezésre olyan, a halak számára kíméletes módszer, amely megoldást nyújt a fejési nehézségekre (DE MONTALEMBERT et al. 1978; BILLARD & MARCEL 1980; LAHNSTEINER et al. 1998; ROSSEN & ABADJIEVA 2015; KRISTIANSEN et al. 2020).

HULAK et al. (2008a) vizsgálatai megerősítik eredményeimet, szintén nem találtak különbséget a friss sperma két kinyerési módszerének motilitás értékei között (MOT: 59-91%, VCL: $\sim 163 \pm 40 \mu\text{m/s}$ – $173 \pm 39 \mu\text{m/s}$). CEJKO et al. (2020a) a fejt spermát rendszervízzel aktiválták, és 60-80% körüli motilitást értek el. Woynárovich

oldatot használva azonban 95% feletti motilitást rögzítettek, a VCL és VSL értéket tekintve pedig hozzávetőlegesen 280 $\mu\text{m/s}$ és 200 $\mu\text{m/s}$ értékeket írtak le, a pMOT azonban 30% körül alakult. Megállapították, a sperma aktivációs közege és annak ozmolalitása összefüggésben áll a spermiumok mozgási képességével. A sperma mélyhűtését munkámhoz hasonló módszerrel végezték polisztírol dobozban, csak 0,25 ml-es műszalmában és 185 mM trehalóz, 40 mM KCl, 20 mM Tris, pH 8,5 és 10 % metanolt tartalmazó hígítóban. A fejt sperma mélyhűtését követően a progresszív motilitás értékek között nem találtak szignifikáns eltérést (közel azonos 30% pMOT mindkét csoport esetén) a friss spermához képest, amely szintén igazolja eredményeimet. Megállapították továbbá, hogy felolvasztást követően a sperma motilitási értékei nagyban összefüggenek a hígító oldat összetételétől. DIETRICH et al. (2016) szintén leírták, miként szükséges egy fajspecifikus hígító fejlesztése.

Glükóz és trehalóz alapú hígítók összehasonlításának eredményeiből levonható következtetések

Sikeresen kidolgoztam a keltetőházi körülmények igényeihez alkalmazkodó és optimalizált csukasperma mélyhűtési technológiát. A módszert egy új, fajspecifikus hígító kifejlesztésével alapoztam meg, amely üzemi szinten is bizonyította hatékonyságát. A munkám során kidolgozott 386 mOsmol/kg ozmolalitású hígító (150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH $8 \pm 0,02$) a csuka szeminális folyadékához hasonló környezetet teremtett, és megakadályozta a spermiumok aktiválódását. LIN et al. (1996a) tanulmánya alátámasztja, miszerint 340 mOsmol/kg ozmolalitás meggátolta a muskellunge spermiumok mozgását. ALAVI et al. (2009) leírták, hogy a 375 mOsmol/kg ozmolalitás nyugalmi állapotban tartotta a spermiumokat csuka fajnál. BABIAK et al. (1997) kísérleteiben a felhasznált tejesek spermájának minőségétől függően a glükóz tartalmú hígítókkal 6,6-96% termékenyülést tudtak elérni. DIETRICH et al. (2016) mélyhűtött spermával végeztek szaporítási kísérletet laboratóriumi körülmények között. Magas kelési arányt írtak le a glükóz és metanol (79%-89%), valamint szacharóz és metanol alapú hígítójuk (74%-84,7%) alkalmazásával. Eredményeimmel ellentétben CEJKO et al. (2020b) trehalózt tartalmazó hígítóval (185 mM trehalóz, 40 mM KCl, 20 mM Tris, pH: 8,5, és 10% metanol) mélyhűtött sperma felhasználásával írtak le statisztikailag igazolhatóan magasabb kelési arányt (73,5%, friss sperma esetében: 66,7%). Vizsgálataimban szignifikánsan magasabb progresszív motilitási értéket állapítottam meg a glükóz

hozzáadásával készített hígítóval mindhárom hígítási arány mellett, összevetve a trehalózt tartalmazóval. Korábbi vizsgálatokat értékelve a hígítók cukortartalma jelentős tényező a csukasperma mélyhűtésében. A spermamélyhűtés során munkámban a glükóz jobb extracelluláris védőanyagnak bizonyult.

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

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

A polisztirol dobozban a környezeti tényezők, mint például az eltérő doboz méret, a külső hőmérséklet és a levegőmozgás befolyásolhatják a fagyasztási hőmérsékleti viszonyokat. A CRF ugyanakkor lehetőséget nyújt sztenderd és optimalizált körülmények között végezni a mélyhűtést. Teljes mértékben kontrollált közegben és egyedileg tervezett program alapján működtethetjük, növelve a mélyhűtési protokollok ismételhetőségét (THURSTON et al. 2003; MORRIS et al. 2006). A mélyhűtési technológiát éppen ezért szerettem volna átültetni a programozható fagyasztó berendezéshez

Sikeresen mélyhűtöttem csukaspermát 0,5 ml-es műszalmában polisztirol dobozban és CRF-ben egyaránt. Az összehasonlító vizsgálat során a spermaminták felolvasztása után nem találtam szignifikáns eltérést a mért mozgási paraméterek (pMOT, VCL STR) értékei között. A két kezelt csoportban vizsgált értékek közel azonosak voltak, így bebizonyosodott, a CRF alkalmas a csukasperma mélyhűtésére 0,5 ml-es műszalmában.

Csukaspermát korábban csak polisztirol dobozban és 0,25-1,2 ml közötti űrtartalmú műszalmákban fagyasztottak (LAHNSTEINER et al. 1998; LAHNSTEINER 2000; ZHANG et al. 2011; DIETRICH et al. 2016; BERNÁTH et al. 2017b; CEJKO et al. 2020b). Programozható fagyasztó berendezésben tudomásom szerint még nem mélyhűtöttek csuka hímviverterméket, így az eredményeimet, azaz az eszköz hatékonyságát, csak más halfajokon végzett vizsgálatokkal volt lehetőségem összehasonlítani.

BERNÁTH et al. (2015) kísérletemhez hasonlóan tesztelték a két mélyhűtési módszer hatását a sügérsperma fagyasztása során, ahol egyaránt magas progresszív motilitást értek el polisztirol dobozban ($62 \pm 15\%$) és CRF-ben ($72 \pm 15\%$) is. A hűtési programjuk munkám egy részével megegyezően $56^\circ\text{C}/\text{perc}$ volt. BERNÁTH et al.

(2016b) pontyon is elvégeztek a vizsgálataimmal összevethető kutatásokat, ahol a pMOT polisztirol doboznál $33\pm 16\%$, CRF-nél $32\pm 13\%$ volt. Termékenyítést követően a friss spermával $73\pm 8\%$, a mélyhűtöttel pedig $32\pm 6\%$ termékenyülést értek el.

A saját és irodalmi adatok összevetése alapján kijelenthető, hogy BERNÁTH et al. (2016a, 2016b) által sügérre és pontyra kifejlesztett CRF-ben végzett mélyhűtési protokoll sikeresen alkalmazható csukasperma esetében is.

Különböző hígítási arányok összehasonlítása programozható fagyasztó berendezés és 10 ml-es kriocső alkalmazásával

A 10 ml-es kriocső felolvasztása után az 1:3, 1:9 és 1:19 hígítási arány között nem találtam szignifikáns eltérést a motilitási paraméterekben. Számos korábbi tanulmány arról számolt be, hogy az alacsony, 1:1-1:5 sperma:hígító arány növelni tudja a csukasperma fagyasztásának hatékonyságát (BABIAK et al. 1995, 1997, 1999; GLOGOWSKI et al. 1997; LAHNSTEINER et al. 1998, LAHNSTEINER & MANSOUR 2008; DZYUBA et al. 2010; ZHANG et al. 2011; DIETRICH et al. 2016). CEJKO et al. (2020b), mindazonáltal sikeresen alkalmazták az 1:9 arányú sperma:hígító arányt és munkámhoz hasonlóan a metanol védőanyagot is. LAHNSTEINER (2000) leírta, hogy lazacfélékben nem hatékony a 0,5 ml-es műszalma alkalmazása, mivel túl sok műszalma szükséges a szaporításhoz, ami alacsonyabb termékenyítési arányhoz vezethet. A túl magas sejtkoncentráció pedig csökkenti a fagyással szembeni ellenálló képességet. Az ozmotikus nyomásváltozás mindamellett spontán aktivációt eredményezhet, ami szintén csökkentheti a termékenyülési értékeket (BERNÁTH et al. 2022). Az általam használt 10 ml-es kriocső magasabb hígítási arány mellett (1:9) is megfelelő mennyiségű spermát tartalmazott, alkalmazhatónak bizonyult a keltetőházi gyakorlatba való átültetésre. A különböző hígítási arányok tesztelésénél (1:3; 1:9; és 1:19) azonban nem találtam szignifikáns eltérést a sperma pMOT értékeiben. A fent leírtak alapján tehát megfontolandó az alacsonyabb, 1:3 sperma:hígító arány jövőbeni tesztelése és adaptálása a keltetőházi gyakorlatba, amellyel hatékonyabbá és gyorsabbá válhatna a szaporítás folyamata (lásd: 2.3.1. fejezet).

A 10 ml-es kriocső három felolvasztási időtartama

A mélyhűtött minták felolvasztási sebességét elengedhetetlen fajonként és mélyhűtési közegenként vizsgálni (TIERSCH & GREEN 2011; CAMPBELL et al. 2021). Az általam választott három felolvasztási periódus (3 perc, 3,5 perc és 4 perc) nem befolyásolta a vizsgált motilitási paramétereket.

Több kutatás vizsgálta a pelletben és műszalmában fagyasztott csukasperma felolvasztásának optimális időtartamát. GLOGOWSKI et al. (1997) a 0,07 ml-es pelletet 30°C-on 12 másodpercig javasoltak felolvasztani, a 0,5 ml-es műszalmát pedig 40°C-on 10-12 másodpercig. LAHNSTEINER et al. (1998) ezzel párhuzamosan 0,5 ml-es műszalmához 25°C-ot és 30 mp-et, 1,2 ml-es műszalmához 30°C-ot és 30 mp-et ajánlottak. CEJKO et al. (2020b) csukasperma fagyasztási kísérletében azt tapasztalták, hogy a 0,25 ml-es műszalma 40°C-on 5 mp alatt hatékonyan felolvad. Összegezve a kutatásokat, nagy variabilitást mutat a különböző technikákkal és volumenben mélyhűtött spermaminták eredményes felolvasztási ideje, melyet befolyásol a sejtsuszpenzió olvasztási közegének hőmérséklete is. A keltetőházi halszaporítások termékenyítései során kulcsfontosságú az ivartermékek felhasználásának gyorsasága, mivel azok minősége fejést követően folyamatosan, nagy sebességgel csökken (LEGENDRE et al. 1996; KRISTAN et al. 2018). Az üzemi körülmények között alkalmazott spermamélyhűtési technológiának pedig alkalmazkodnia kell ezekhez a folyamatokhoz, így a fagyasztott sperma felolvasztásánál is a lehető legrövidebb időtartamot kell kiválasztani. A nagy mennyiségben mélyhűtött csukasperma a tesztek alapján jól tolerálja a gyors hőmérséklet-emelkedést, ami szintén elősegíti a 10 ml-es kriocső üzemi szintű alkalmazhatóságát.

Következtetések az 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső összehasonlításának eredményeiből különböző fagyasztási módszerek alkalmazásával

A tudományos irodalomban eddig LAHNSTEINER et al. (1998) számoltak be a legnagyobb volumenű csukasperma mélyhűtésről. Polisztírol dobozba töltött folyékony nitrogénen úszó 0,5 cm magas kereten, a nitrogén gőzében és 1,2 ml-es műszalmában fagyasztották le a hímivarsejteket -150°C-ig, amelyek alkalmazásával $74,2 \pm 0,6\%$ termékenyülést értek el. Az általam alkalmazott mélyhűtési programot CRF-ben (kiindulási hőmérséklet: 4°C, végpont: -160°C, hűtési sebesség 15°C/perc) már tesztelték korábban más halfajok esetén. VÁRKONYI et al. (2019) például pontyon végzett kísérletükben 10 ml-es kriocső alkalmazásával eredményeimhez

hasonlóan magas progresszív motilitást tapasztaltak ($27\pm6\%$). BOKOR et al. (2019) keltetőházban kiváló eredményeket értek el harcsával szintén 10 ml-es kriocső és CRF használatával. A 10 ml-es kriocső alkalmazásával hasonlóan magas kelési eredményt írtak le ($66\pm6\%$), mint a friss sperma felhasználásával ($68\pm4\%$). A korábbi kutatások és a saját munkám eredménye igazolja, hogy a 10 ml-es kriocső integrálható gazdaságilag értékes halfajok üzemi körülmények között végzett spermamélyhűtéséhez is.

A 10 ml-es kriocső programozható fagyasztó berendezésben végzett mélyhűtése mellett azonban mindenképpen fel kell hívni a figyelmet az 5 ml-es műszalma CRF-ben és polisztirol dobozban való mélyhűtésére. A kutatásomban ugyanis nem találtam szignifikáns eltérést a három különböző módszerből származó sperma motilitási és kelési eredményei között. Kísérleteimhez hasonlóan VÁRKONYI et al. (2019) ponty spermával már bizonyították az említett három fagyasztási mód hatékonyságát, mely megmutatkozik a magas progresszív motilitási eredményeikben is (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $64\pm8\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $37\pm5\%$, CRF 10 ml-es kriocső: $27\pm6\%$). BOKOR et al. (2019) harcsaszaporítás során 200 grammos ikratételek termékenyítéséhez alkalmaztak eredményesen nagy mennyiségű fagyasztott spermát, mellyel hasonló kelési arányt értek el (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $75\pm5\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $72\pm3\%$, CRF 10 ml-es kriocső: $66\pm6\%$), mint a friss spermával ($68\pm4\%$). A bemutatott saját és más szerzők eredményeiből következik, hogy a vizsgált három mélyhűtési módszer hatékony lehet a csuka üzemi szaporításában is.

A halsperma mélyhűtés folyamatosan és dinamikusan fejlődik, ennek ellenére néhány kivételtől eltekintve nem sikerült átültetni a gyakorlatba (TIERSCH 2008; URBÁNYI 2011). A mélyhűtés költségeinek elemzése meghatározó gazdasági tényezőnek tekinthető, hiszen ez az üzemi alkalmazás jelenlegi legfőbb meghatározó szempontja. Szükségszerű kiemelni, hogy az általam kidolgozott fagyasztási módszerek közül az 5 ml-es műszalma polisztirol dobozban is sikeresen mélyhűthető. A programozható fagyasztó berendezéshez hasonló eredmények érhetőek el az 5 ml-es műszalmával polisztirolban mélyhűtve, valamint lényegesen költséghatékonyabb is, ugyanis nem szükséges megvásárolni a rendkívül költséges berendezést, illetve terepi körülmények között hatékonyabban alkalmazható (pl. egyszerűbb szállítás, nem igényel áramforrást). A polisztirol doboz hátránya azonban, hogy kevésbé standardizálható.

Hazánkban a kereskedelmi célú természetesvízi halászat betiltásával nagymértékben lecsökkent az országos éves csukafogás mennyisége, a horgászsportban mindazonáltal folyamatosan fokozódik az igény a halfajra. A hazai halállomány felmérések elemzéséből kiderül, hogy a leggyakoribb hazai ragadozó halfajunk a csuka, már elkülönült kládokba sorolható (TAKÁCS et al. 2017), így a genetikai variabilitás és génmegőrzés szerepe is átgondolandó. A tenyésztés során a gyakorlatban alkalmazott módszer szerint a csuka tejeseket leölik és a here kioperálásával nyerik ki a spermát. A folyamat egyes szaporítási időszakokban a hímivarú egyedek hiányához vezethet. A csukaszaporítás egyik limitáló tényezője a megfelelő mennyiségű hímivarú szülőállat, valamint a kinyerhető sperma mennyisége és minősége (LAHNSTEINER et al. 1998). A mélyhűtött sperma tárolása és keltetőházi alkalmazása alternatív megoldás lehet akkor, ha nem áll rendelkezésre a megfelelő számú tejes az adott időszakokban.

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

Nagy mennyiségben mélyhűtött spermával végzett szaporítás eredményeiből levonható következtetések

Üzemi körülmények között teszteltem a csukasperma mélyhűtéséhez adaptált három különböző fagyasztási technika alkalmazhatóságát. Kutatásomban eltérést tapasztaltam a kísérlet elején és végén mért kontroll spermaminták (5 órával a spermakinyerés után), valamint a különböző mélyhűtési módszerek kísérleti csoportjainak progresszív motilitása között. A kontroll ivartermék szignifikánsan magasabb pMOT értéket mutatott a kísérlet kezdetekor ($74 \pm 7\%$), mint a kísérlet végén ($31 \pm 13\%$) és a három mélyhűtött csoport (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $32 \pm 3\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $53 \pm 6\%$, CRF 10 ml-es kriocső: $15 \pm 4\%$). Kiemelendő, hogy a kísérlet végén mért kontroll sperma pMOT értéke milyen mértékben csökkent, ami hangsúlyozza a szaporítás idejének hatását az ivartermékek minőségére nézve.

A kelési eredményekben azonban nem mutatkozott szignifikáns különbség a kontroll és kezelt csoportok között (friss sperma: $7 \pm 4\%$, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $16 \pm 8\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $21 \pm 16\%$ és CRF 10 ml-es kriocső: $11 \pm 2\%$). A legalacsonyabb értéket a friss csoportban rögzítettem. Az egyes ikratételeket véletlenszerű sorrendben termékenyítettem, így kizárható az a lehetőség, hogy a friss csoport kelése azért rosszabb, mert annak az ismétléseit termékenyítettem utoljára. Korábbi csukaspermával végzett termékenyítéssel kapcsolatos irodalmakban

megjelenik az a jelenség, hogy a mélyhűtött csoportban habár nem szignifikánsan, de magasabb termékenyülési eredményt rögzítenek, például: GLOGOWSKI et al. (1997): friss: 89,1%, mélyhűtött: $90,5 \pm 1,9\%$, LANSTEINER et al. (1998): friss: 74, mélyhűtött: 85%. Az ok-okozat feltárása azonban további vizsgálatokat igényel.

Az alacsony termékenyülési és kelési eredményeket feltételezhetően az ikra alacsonyabb minőségével, esetleg az ivartermékek kinyerése és felhasználása között eltelt túl hosszú idejével lehet magyarázni (KRISTAN et al. 2020). A sperma:ikra arány szerint 2112 μ l spermát adtam 250 gramm ikrához. Az egy kg-ra számolt spermamennyiség 8448 μ l, (közel 8,5 ml), ami megfelel korábbi kutatások alapján leírt értékeknek (SZABÓ 1997c; SZABÓ et al. 2014, 2021; LAHNSTEINER 2000). Feltételezhetően a csuka esetén a mélyhűtött sperma alkalmazásánál a keltetőházi gyakorlathoz képest nagyobb mennyiségű spermával kell termékenyíteni (HOAR et al. 1983). Üzemi szintű termékenyítési egységgel és egyben nagy mennyiségben mélyhűtött csukaspermával elsőként végeztem kísérletet keltezőházi körülmények között. A szakirodalom csak laboratóriumi, alacsony ikra és/vagy kis volumenű mélyhűtött csukasperma felhasználását és vizsgálatait mutatja be (BABIÁK et al. 1995, 1997, 1999; GLOGOWSKI et al. 1997; LAHNSTEINER et al. 1998; LAHNSTEINER & MANSOUR 2008; DZYUBA et al. 2010; ZHANG et al. 2011; DIETRICH et al. 2016; CEJKO et al. 2016, 2020b; KRISTAN et al. 2020).

A termékenyítési egységnek 250 grammos ikratételeket határoztam meg, amely irodalmi források alapján, feltételezhetően legalább 10000-20000 ikraszemet tartalmaz (BILLARD 1996; EINUM & FLEMING 2002; KOTAKORPI et al. 2013; CEJKO et al. 2016). Az adatokból következtethető, hogy az ikraszemek egyesével történő eltávolítása nem kivitelezhető. A keltetőházban ugyan szivornya segítségével leszívják a rossz ikraszemeket, de a folyamattal egészséges ikraszemek is eltávolításra kerülnek. A kelési arány csak akkor állapítható meg egzakt módon, ha nem végzünk szelekciót, így az ikra inkubációja során a penészes és elpusztult ikraszemeket nem távolítottam el. Az elpusztult ikraszemekeken gyorsan elszaporodnak a vízi penészgomba fajok, majd tovább terjednek az egészséges embriókra is (SZABÓ 2016b). SZABÓ (2016b) publikációjához hasonlóan, kísérletemben jelentős mértékben tapasztaltam a vízi penészgombák embrionális fejlődésre gyakorolt negatív hatását, amely az ikraszemek nagymértékű pusztulásával járt. A kelési eredményeim tehát javíthatók lettek volna a penészes ikraszemek eltávolításával (HORVÁTH & MAGYARY 2007; HOCHLEITHNER 2015). Tovább ronthatta a kelési eredményeket a magas, $15,5 \pm 0,85^{\circ}\text{C}$ -os víz hőmérséklet is (az ideális érlelővíz hőmérséklete $6-10^{\circ}\text{C}$

közötti tartományban van (BONDARENKO et al. 2015b; POSPISILOVA et al. 2019), ami szintén pozitív hatással lehetett a penészgombák szaporodására. A keltetőházi ikra érleléshez képest a kis mennyiségű ikratételeknél lehetőség van olyan vízátfolyásos ikra inkubációra is, ahol az ikraszemek különválaszthatók úgy, hogy azok ne érintkezzenek egymással. A penészgomba fajok terjedése így nagymértékben csökkenthető, ezáltal javíthatók a kelési eredmények is. A keltetőházak Zuger-üvegeiben azonban az ikraszemek különválasztására jelenleg nincs lehetőség. A kis mennyiségű ikratételekkel végzett laborkísérletek ismételhetősége tehát akadályokba ütközik (LAHNSTEINER et al. 1998).

A mélyhűtött sperma lárvanövekedésre gyakorolt hatásának vizsgálataiból levonható következtetések

A 10 napos nevelési kísérlet során a három lárvafejlődési stádium közül (közvetlen kelés után, nem-táplálkozó lárvaszakasz vége (kísérlet 5. napja), 5 napos táplálkozó lárv) egyikben sem tapasztaltam a spermamélyhűtésre visszavezethető negatív hatást a lárv növekedési értékeiben. A kísérlet végén a mélyhűtött csoportok egyedeinek növekedési paraméterei (polisztírol doboz 5 ml-es műszalma: $17,38 \pm 2,25$ mg és $14,83 \pm 0,86$ mm; CRF 5 ml-es műszalma: $17,58 \pm 2,18$ mg és $14,71 \pm 0,67$ mm; CRF 10 ml-es kriocső: $17,28 \pm 1,95$ mg és $14,86 \pm 0,94$ mm) nem maradtak el a kontroll csoport értékeitől ($16,48 \pm 2,04$ mg és $12,89 \pm 0,65$ mm). A megmaradás értékekben nem találtam szignifikáns eltérést a kontroll és kezelt csoportok között (friss: 69%, polisztírol doboz 5 ml-es műszalma: 80%, CRF 5 ml-es műszalma: 74%, CRF 10 ml-es kriocső: 74%). Ismereteim szerint nem állnak rendelkezésre nagy mennyiségben mélyhűtött csukaspermából származó lárvák fejlődéstani vizsgálati eredményeit bemutató publikációk. Az eredményemet így friss spermával végzett termékenyítésből származó lárvák növekedési adataival és más hajfajokon végzett mélyhűtésre irányuló kísérletek összehasonlításával értékelem.

POSPISILOVA et al. (2019) részletes lárvafejlődési vizsgálataiban leírják, hogy a csukalárva átlagos testhossza keléskor 8,3 mm, a nem-táplálkozó lárvaszakasz végén 12 mm, amely átlagok megegyeznek az eredményeimmel. Kísérletem 10. napjára (5 napos táplálkozó lárvaszakasz) húzódott vissza teljes mértékben a szikzacskó (lásd: 60. oldal, 22. ábra). A kutatók eredményeiben megtalálható az ehhez a fejlettségi állapothoz tartozó átlagos testhossz (13,7-15 mm), amely szintén megegyezik az eredményeimmel. BOKOR et al. (2015) nagy mennyiségben mélyhűtöttek harcsaspermát keltetőházi körülmények között 5 ml-es műszalmával. A keléstől

számított 10 napos lárvanevelési vizsgálat végén nem találtak szignifikáns különbséget a kontroll és fagyasztott spermával termékenyített csoportok testtömeg ($78,1 \pm 18,1$ mg és $80,2 \pm 17,2$ mg) és testhossz adatai ($1,89 \pm 0,14$ cm és $1,92 \pm 0,13$ cm) között. A mélyhűtött csoport növekedési adatai – ugyan szignifikánsan nem tértek el, de – csekély mértékben meghaladták a friss spermával termékenyített csoport eredményeit. A lárvanevelésnél magas megmaradást ért el a magyar kutatócsoport (kontroll: $94,2 \pm 1,64\%$, mélyhűtött: $93,2 \pm 1,3\%$). LIU et al. (2015) atlanti laposhal (*Hippoglossus hippoglossus*) spermát mélyhűtöttek 5 ml-es kriocsőben. Keléstől számított 64 napos lárvanevelési vizsgálat során nem írtak le statisztikailag igazolható különbséget a friss és fagyasztott spermából származó lárvák növekedése és megmaradás értékei között.

A lárvafejlődési és a megmaradási eredményeinek elemzéséből elmondható, hogy a mélyhűtés nem befolyásolta negatívan a lárvák növekedését és megmaradását a vizsgált fejlődési periódusban. Az összehasonlító vizsgálatok alapján a mélyhűtött csoportok nemhogy elmaradnak, egyes esetekben felülmúlják a kontroll csoport eredményeit is.

A lárvamorfológiai vizsgálatok eredményeiből levonható következtetések

Munkám során szignifikánsan nagyobb volt a lárvatorzulás mértéke közvetlen kelés után (17,4%), szemben a nem-táplálkozó lárvával (4,75%) és az 5 napos táplálkozó lárvastádiummal (6,28%). A három mintavételi időpont átlagában nem találtam számottevő különbséget a kontroll és kezelt csoportok lárvatorzulási értéke között (friss: 11,71%, polisztírol doboz 5 ml-es műszalma: 8,97%, CRF 5 ml-es műszalma: 7,66%, CRF 10 ml-es kriocső 9,96%). Feltételezhetően kelést követően a deformált egyedek elpusztulhattak és emiatt rögzítettem kevesebb fejlődési rendellenességet mutató egyedet a további két vizsgálati időpontban. Az 5 napos táplálkozó lárvakorban jelent meg a hematóma, amely nagy arányban volt jelent a többi szervi elváltozáshoz képest. A hematóma vagy más néven vérömleny általában akkor keletkezik, ha fizikai hatás következtében megsérülnek a vérerek, és vér lép ki a szövetekbe (HUSUM & STRADA 2002; OYETUNJI et al. 2010). A hallárva rendkívül sérülékeny. A keltetőházi gyakorlat szerint a csukalárva többszöri áthelyezést és mozgatást is igényel a különböző lárvaszakaszok között, míg kikerülnek a halastavakba (HORVÁTH & MAGYARY 2007). A halak szállítása Szegedről Gödöllőre szintén okozhatott fizikai sérüléseket.

Eredményeim bizonyítják, az általam alkalmazott mélyhűtési módszerek nincsenek negatív hatással a lárvák morfológiai elváltozásaira sem. A mélyhűtött

spermából származó lárvák fejlődéstani vizsgálatait tudomásom szerint korábban más nem végezte el csuka esetében, így más halfajokon végzett kutatásokkal vetem össze eredményeimet. HORVÁTH & URBÁNYI (2000) programozható fagyasztó berendezés, 0,25 ml-es műszalma és harcsa hígító használatával mélyhűtöttek afrikai harcsaspermát, majd vizsgálták a DMSO és DMA védőanyag hatását a lárvák morfológiájára. A védőanyagok csoportjainak hatására megnövekedett a rendellenes fejlődést mutató egyedek száma a kontrollhoz képest. LABBÉ et al. (2001) a spermamélyhűtés szívárványos pisztráng fejlődésére gyakorolt hatását tanulmányozták. A hímivarterméket 0,5 ml-es műszalma, polisztirol doboz, Mounib hígító (125 mM szacharóz; 6,5 mM redukált glutation; 100 mM KHCO_3), 10% tojássárgája, valamint 10% DMSO használatával mélyhűtöttek. A morfológiai elemzés után nem találtak különbséget a kontroll és a kezelt csoportok fejlődési rendellenességeinek mértéke között. MISKOLCZI et al. (2005) mélyhűtött spermát felhasználva végeztek afrikai harcsa szaporítást. A fagyasztási mód polisztirol doboz, 0,25–1,2 ml-es műszalma, harcsa hígító, valamint 10% metanol vagy DMSO védőanyag volt. A szerzők hasonló kelési arányt értek el a kontroll ($59,1 \pm 25,8\%$) és a fagyasztott csoportban ($53 \pm 28,9\%$). A lárvadeformitásban a legmagasabb értéket a 0,5 ml-es műszalma és DMSO alkalmazásával jegyezték fel (friss: $28,3 \pm 15,3\%$; mélyhűtött: $44,2 \pm 29,9\%$), azonban nem találtak szignifikáns eltérést a különböző kezelések között. HORVÁTH et al. (2007) ponty esetén mélyhűtöttek spermát polisztirol dobozban, 5 ml-es műszalmában tárolva, cukor alapú hígítóval (350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH: 8) és 10% metanol használatával. Kelést követően a lárvadeformitási vizsgálataiban nem találtak számottevő eltérést a friss ($15 \pm 9\%$) és mélyhűtött ($13 \pm 7\%$) csoportok között. BERNÁTH et al. (2018) jászkeszegspermát mélyhűtöttek polisztirol doboz, 0,5 ml-es műszalma és pér hígító (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH: $8,0 \pm 0,2$), valamint 10% metanol alkalmazásával és vizsgálták a mélyhűtött spermából származó lárvák morfológiáját. A kelési arány nem különbözött statisztikailag igazolhatóan a friss ($22 \pm 15\%$) és fagyasztott ($33 \pm 18\%$) csoportok között. A fejlődési rendellenességet mutató egyedek aránya egyaránt $12 \pm 4\%$ volt mindkét csoportban. A mélyhűtött csoportban a szem- és kraniofaciális deformitás, a friss kontroll csoportban a perikardiális és szik ödéma előfordulása volt jelentős. Munkám és a szakirodalmi adatokból következtetve, a spermamélyhűtés lárvafejlődéstani rendellenességekre gyakorolt hatása fajspecifikus, vagy akár mélyhűtési technológiától függő is lehet.

5.2. *Javaslatok*

Javaslatok a csukaszaporításra vonatkozóan:

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

Javaslatok a csukasperma mélyhűtésére vonatkozóan:

- A spermamélyhűtéshez javaslom a munkám során kidolgozott glükóزالapú hígító (150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄*12H₂O, 1 mM MgCl₂*6H₂O, 1 mM CaCl₂*2H₂O, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH 8±0,02) és 10% metanol védőanyag alkalmazását.
- Javaslom az 5 ml-es műszalma mélyhűtését polisztirol dobozban és programozható fagyasztó berendezésben egyaránt, valamint a 10 ml-es kriocső mélyhűtését programozható fagyasztó berendezésben, amennyiben ennek technikai feltételei rendelkezésre állnak (pl. áramforrás).
- A magasabb spermium sejtsűrűség és mélyhűtési volumen elérésének érdekében javaslom a 10 ml-es kriocső 1:3 (sperma:hígító) hígítási arányának tesztelését programozható fagyasztó berendezésben, csukaszaporítási kísérlet során.
- Javaslom a 10 ml-es kriocső 3 perces felolvasztási időtartamának alkalmazását 40 °C-os vízhőmérséklet mellett.
- A fagyasztott hímvartermék minták felolvasztása rendszerint egyesével történik. Az üzemi körülmények között felhasználni kívánt és felolvasztott spermaminták rövidtávú tárolásának csökkentése érdekében javaslom egy olyan egységesített technológia kidolgozását (műszaki fejlesztést), amellyel egyszerre több nagyméretű műszalma, vagy kriocső is felolvasztható.
- Javaslom a csukasperma spermabanki tárolásának megalapozását nagy űrtartalmú tárolóegységben mélyhűtve, amely elérhető a haltermelők számára tenyésztési célú felhasználásra is.
- Javaslom a mélyhűtött spermából származó csukalárvák hosszabb távú fejlődéstani vizsgálatát (például: teljes ivadéknevelési- és éves tavi nevelési periódus).

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

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

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

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

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

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A csuka (*Esox lucius*) jelentős halászati, horgászati és szocio-ökológiai értékkel rendelkezik szerte Euráziában és Amerikában. A túlhalászat és az élőhelyek degradációja folyamatosan csökkenti az életterét és a faj egyedszámát. Az elsősorban horgász sporthal célú kereslet iránta folyamatosan nő. A keltezőházi szaporításának eredményei szezononként nagy variabilitást mutatnak, és nem mindig tudják kielégíteni a telepítőanyag iránti igényeket. A problémát legtöbbször a rendelkezésre álló tejesek száma, ezáltal a megfelelő mennyiségű és minőségű sperma hiánya jelenti. A tejesek heréjének lebenyes szerkezete és a tenyészállatok befogása okozta stressz hatása miatt a klasszikusan alkalmazott fejési technikával csak relatívan kis mennyiségű és alacsonyabb minőségű sperma nyerhető ki. Az általánosan alkalmazott módszer szerint a here kioperálásával nyerik ki a spermát, ami az egyedek leölésével jár.

Munkám összefoglalja a keltetőházban is alkalmazható, üzemi szintű csukasperma mélyhűtési technológiájának a fejlesztését és egységesítését, valamint a fagyasztott spermából származó lárvák rövidtávú (keléstől számított 10 napos) fejlődéstani vizsgálatát. Tudomásom szerint nagy térfogatú tárolóegységben (5-10 ml) még nem mélyhűtöttek csukaspermát és nem vizsgálták a spermafagyasztás lárvá növekedési és morfológiai paramétereire gyakorolt hatását sem.

A mélyhűtés kezdeti szakaszában szükséges volt meghatározni a megfelelő hímivartermék gyűjtési módszert és kifejleszteni egy mélyhűtéshez alkalmas fajspecifikus hígító oldatot. Kísérleteimben teszteltem a hormonális kezelés spermaminóségre gyakorolt hatását. Szignifikánsan magasabb progresszív motilitást (pMOT) rögzítettem a kezelt csoportban ($43 \pm 20\%$) a kontrollhoz képest ($18 \pm 15\%$). A csuka közeli rokona, a muskellungesperma szeminális plazmájának összetétele alapján állítottam össze a hígítót, majd teszteltem a polisztirol dobozban végzett mélyhűtés alatt a glükózzal és trehalózzal kiegészített hígító hatását a sperma motilitási paramétereire nézve. A három hígítási aránnyal a trehalóz nem (1:3: $0,3 \pm 1\%$, 1:9: $1 \pm 1\%$, 1:19: $4 \pm 2\%$), a glükóz alapú hígító viszont alkalmasnak bizonyult (1:3: $18 \pm 16\%$, 1:9: $20 \pm 13\%$, 1:19: $16 \pm 12\%$) a pMOT megőrzésére. Az oldat pontos összetétele: 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, 0,5% BSA, pH $8 \pm 0,02$ és 10% metanol volt. A hígító tesztelése után összehasonlítottam a fejés és here kioperálásának módszerét. A mélyhűtött sperma felolvasztása után a progresszív motilitásban nem

találtam különbséget a fejésből ($37\pm 27\%$), illetve a kioperált heréből ($29\pm 17\%$) származó minták között.

A kutatás következő szakaszában a mélyhűtési volumen intenzifikálását végeztem el, amelyet a programozható fagyasztó berendezés (CRF) csukasperma mélyhűtési alkalmazhatóságának tesztelésével kezdtem. A CRF ellenőrzött és standardizálható körülményeket biztosít a polisztirol dobozzal szemben, amellyel növelhető a mélyhűtés optimalizálása. A 0,5 ml-es műszalma mélyhűtését követően nem találtam igazolható eltérést a polisztirol doboz ($45\pm 11\%$) és a CRF ($42\pm 17\%$) progresszív motilitási értékei között. A fagyasztási úrtartalom növelését a CRF és a 10 ml-es kriocső alkalmazásával folytattam. A három különböző hígítási arány pMOT értékei között nem találtam szignifikáns eltérést (1:3: $20\pm 10\%$, 1:9: $30\pm 9\%$, 1:19: $31\pm 7\%$). A megfelelő mélyhűtési program (kiindulási hőmérséklet: 4°C , végpont: -160°C , hűtési sebesség $15^{\circ}\text{C}/\text{perc}$, 1:9 hígítási arány) tesztelése után a minták felolvasztási időtartamának standardizálását végeztem el. A pMOT nem mutatott statisztikailag igazolható eltérést a vizsgált 3 perc ($30\pm 6\%$), 3,5 perc ($29\pm 6\%$), valamint 4 perc ($28\pm 8\%$) felolvasztási idő között. A 10 ml-es kriocső mélyhűtési technológiájának optimalizálása után összehasonlítottam az eljárást az 5 ml-es műszalma polisztirol doboz és CRF-ben végzett mélyhűtésével. Felolvasztást követően nem tapasztaltam szignifikánsan eltérő pMOT értékeket a polisztirol dobozban mélyhűtött 5 ml-es műszalma ($50\pm 9\%$), CRF-ben mélyhűtött 5 ml-es műszalma ($57\pm 10\%$), és a 10 ml-es kriocső ($41\pm 10\%$) csoportok eredményei között.

A nagy mennyiségű csukasperma mélyhűtés optimalizálását követően keltetőházi körülmények között teszteltem korábbi eredményeimet. A kísérlet kezdetén, kioperált heréből származó kontroll sperma szignifikánsan magasabb pMOT értéket mutatott ($74\pm 7\%$), mint a kísérlet végén (5 órával később) mért kontroll ivartermék ($31\pm 13\%$) és a három mélyhűtött csoporté (polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $32\pm 3\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $53\pm 6\%$ és a CRF 10 ml-es kriocső: $15\pm 4\%$). A kísérlet végén mért pMOT értéke szignifikánsan csökkent a kísérlet kezdetén mért értékhez képest. A sperma progresszív motilitás eltérései mellett a kelési arányokban már nem találtam szignifikáns eltérést a négy csoport értéke között: friss sperma: $7\pm 4\%$, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: $16\pm 8\%$, CRF 5 ml-es műszalma: $21\pm 16\%$ és CRF 10 ml-es kriocső: $11\pm 2\%$).

A keltetőházi körülmények között végzett csukaszaporítást követően vizsgáltam a mélyhűtött spermából származó lárvák fejlődését. A keléstől kezdődő 10 napos kísérletben a vizsgált három lárvafejlődési stádiumban (közvetlen kelés után, a nem-

táplálkozó lárvaszakasz végén és 5 napos táplálkozó lárvaszakaszban) a mélyhűtésből származó lárvák testtömeg és testhossz adatai megegyeztek vagy meghaladták a kontroll csoport növekedését. A három mintavételi időpont átlagában nem találtam számottevő különbséget a kontroll és a kezelt csoportok lárvatorzulási értékei között (7,66-11,71%). A lárva megmaradás elemzésénél a különböző csoportokban statisztikailag igazolhatóan nem eltérő, magas értékeket írtam le: friss: 69%, polisztirol doboz 5 ml-es műszalma: 80%, CRF 5 ml-es műszalma: 74%, CRF 10 ml-es kriocső: 74%.

Összefoglalva eredményeimet, sikeresen kifejlesztettem egy, a csukasperma mélyhűtéséhez alkalmazható hígítót. Adaptáltam a nagy mennyiségű (5 ml-es műszalma, 10 ml-es kriocső) spermafagyasztási módszert a programozható fagyasztó berendezéshez. Optimalizáltam a 10 ml-es kriocső mélyhűtési és felolvasztási technikáját. Sikeres csukaszaporítást hajtottam végre az 5 ml-es műszalmával, illetve a 10 ml-es kriocsővel üzemi körülmények között. A mélyhűtött spermából származó lárváknál nem tapasztaltam negatív hatást azok fejlődésére és megmaradására a kelést követő első 10 napban

Az általam alkalmazott mélyhűtési technológia alkalmasnak tűnik a keltetőházi felhasználásra.

8. SUMMARY

Northern pike (*Esox lucius*) has great economical, fishing and eco-sociological importance as well all over Europe and America. Areas required for reproduction and habitats have been greatly reduced due to overfishing and habitat degradation. There is also a growing angling demand for the species. The results of artificial propagation show great variability season by season. Productive and technological developments are required as pond fish production is currently unable to satisfy the sudden increase in demand. Most of the time, the problem comes from the lack of available males therefore absence of the sufficient quantity and quality of sperm. In males, the general abdominal stripping method is not effective due to the anatomical characteristics of the testis (low volume and quality of sperm). The dissection of the testis is a much more effective sampling method in the hatchery practice. By using this method, in quality and quantity a much higher type of sperm can be obtained although it requires males to be sacrificed in every spawning season.

My research summarises the improvement and standardization of large-scale sperm cryopreservation method in northern pike for hatchery application, as well as the investigation of larval development (10 days from hatching) stem from cryopreserved sperm. As far as I know, northern pike sperms have not yet been cryopreserved in large-amount (5 mL straw, 10 mL cryotube), and the effect of sperm freezing on larval growth and morphological parameters has not been investigated.

Firstly, the optimal sampling method will be defined for pike sperm collection. A specie-specific sperm dilution solution suitable for cryopreservation must be developed. In my experiments, the effect of hormonal treatment on sperm quality was tested. A significantly higher progressive motility (pMOT) was recorded in the treated group ($43\pm 20\%$) compared to the control ($18\pm 15\%$). The extender was developed based on the composition of the seminal plasma of the sperm of the muskellunge (*Esox masquinongy*), a close relative of the pike. The effect of adding glucose and trehalose to the diluent during cryopreservation in a polystyrene box was investigated in relation to sperm motility parameters. With the three dilution ratios, trehalose was not suitable to preserve pMOT (1:3 – $0.3\pm 1\%$, 1:9 – $1\pm 1\%$, 1:19 – $4\pm 2\%$), but the glucose-based extender was operable (1:3 – $18\pm 16\%$, 1:9 – $20\pm 13\%$, 1:19 – $16\pm 12\%$). The exact composition of the extender: 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, and 0.5% BSA, pH: 8.0 ± 0.2 and 10% methanol as cryoprotectant. After testing the extender, the method of stripping

and operation of the testis was compared. After thawing the cryopreserved sperm, similar progressive motility was recorded between stripping ($37\pm 27\%$) and dissection of the testis ($29\pm 17\%$).

In the next phase of my research, the intensification of large-scale sperm cryopreservation has been completed. The applicability of a polystyrene box with 0.5 and 5 mL straws and of a controlled-rate freezer (CRF) with 5 mL straws and 10 mL cryotube were investigated. CRF can provide controlled and standardized conditions in contrast with polystyrene box, which can be used to increase the optimization of cryopreservation. After the cryopreservation of the 0.5 mL straw, in the value of pMOT not any verifiable difference was observed using polystyrene box ($45\pm 11\%$) or CRF ($42\pm 17\%$). The comparison of three different dilution ratios in sperm cryopreservation using 10 mL cryotube was also carried out. No significant difference was measured in pMOT between the three difference dilution ratios (1:3 - $20\pm 10\%$, 1:9 - $30\pm 9\%$, 1:19 - $31\pm 7\%$). After the systematic development and optimization of large-scale cryopreservation method (starting temperature: 4°C , end point: -160°C , cooling rate: $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and 1:9 dilution ratio), the thawing duration of the samples was standardized. Furthermore, a similar result was found in the case of the standardization of the thawing process by the 10 mL cryotube. 3, 3.5, and 4 minutes of thawing showed a similar progressive motility ($30\pm 6\%$ and $29\pm 6\%$ and $28\pm 8\%$). After testing the optimizes of the 10 mL cryotube to CRF, the cryopreservation of 5 mL straw in polystyrene box and in CRF and 10 mL cryotube in CRF were also compared. No significant difference was recorded in pMOT between 5 mL straw cryopreserved in polystyrene box ($50\pm 9\%$), the 5 mL straw frozen in CRF ($57\pm 10\%$) and the 10 mL cryotube ($41\pm 10\%$).

Following the large-scale sperm cryopreservation research, my results were tested under hatchery conditions. Significant pMOT differences were observed in different groups: fresh sperm ($74\pm 7\%$), fresh at the end of the experiment (5 hours later) ($31\pm 13\%$), polystyrene box 5 mL straw ($32\pm 3\%$), CRF 5 mL straw ($53\pm 6\%$), CRF 10 mL cryotube ($15\pm 4\%$). The pMOT measured at the end of the experiment decreased significantly compared to the value measured at the beginning of the experiment. Except for the differences in sperm progressive motility, no verifiable differences were measured in the hatching rates of the four groups: native sperm: $7\pm 4\%$, polystyrene box 5 mL straw: $16\pm 8\%$, CRF 5 mL cryotube: $21\pm 16\%$ and CRF 10 mL cryotube: $11\pm 2\%$).

Northern pike propagation was carried out using fresh and cryopreserved sperm using three different methods (polystyrene box 5 mL straw, CRF 5 mL straw, and 10 mL cryotube CRF). In the next phase of my research, investigation of larvae stem from cryopreservation sperm was performed. The larvae rearing experiment was maintained for 10 days following hatching. Morphological and growth parameters were being monitored immediately after hatching, at the end of the non-feeding larvae stage and in the 5 days of feeding larvae stage. The growth parameters of cryopreserved groups were equal or exceeded the data of the fresh group, which requires further research. In the average of the three sampling times, no verifiable differences were recorded between the larval malformation values of the control and the treated groups (7.66-11.71%). At the end of the experiment, similarly high survival rate was observed in all groups (fresh sperm: 69%, polystyrene box 5 mL straw: 80%, CRF 5 mL straw: 74%, and 10 mL cryotube CRF: 74%).

In conclusion it can be declared that an extender specialized for northern pike species has been developed. The sperm freezing methods (5 mL straw and 10 mL cryotube) were successfully adapted to a controlled-rate freezer. The cryopreservation method and thawing time of the 10 mL cryotube has been standardized. I have successfully propagated northern pike using the 5 mL straw and the 10 mL cryotube under practical conditions. The cryopreservation technology used had no negative effect on the development and survival rate of the larvae during the first 10 days after hatching.

My results indicate that the 5 mL straw and 10 mL cryotube methods seem suitable for use in the hatchery practice.

9. MELLÉKLETEK

M.1. Irodalomjegyzék

- AFRIANI, D., ERIANI, K., MUCHLISIN, Z.A., HASRI, I. (2021): A short review of discovery and development of fish sperm cryopreservation. *Depik Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir dan Perikanan*, 10(1): 11-16. p.
- AGARWAL, N.K. (2011): Cryopreservation of semen fish. *Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation and New Tools in Biotechnology*, 104-127. p.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J. (2005): Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, 29(2): 101–110. p.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J. (2006): Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International*, 30: 1–14. p.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J. (2019): Reproductive biology in male aquatic animals: from stem cells to sperm – foreword. *Theriogenology*, 138: 152-153. p.
- ALAVI, S.M.H., RODINA, M., VIVEIROS, A.T.M., COSSON, J., GELA, D., BORYSHPOLETS, S., LINHART, O. (2009): Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology*, 72: 32-43. p.
- AMARAL, A., LOURENCO, B., MARQUES, M., RAMALHO-SANTOS, J. (2013): Mitochondria functionality and sperm quality. Review. *Reproduction*, 146: 163-174. p.
- ARLINGHAUS, R., KLEFOTH, T., COOKE, S.J., GINGERICH, A., SUSKI, C. (2009): Physiological and behavioural consequences of catch-and-release angling on northern pike (*Esox lucius* L.). *Fisheries Research*, 97: 223-233. p.
- ASTURIANO, J.F., CABRITA, E., HORVÁTH, Á. (2017): Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 245: 69–76. p.
- BABIAK, I., GLOGOWSKI, J., LUCZYNSKI, M.J., KUCHARCZKY, D., LUCZYNSKI, M. (1995): Cryopreservation of the milt of the northern pike. *Journal of Fish Biology*, 46: 819-828. p.
- BABIAK, I., GLOGOWSKI, J., LUCZYNSKI, M.J., LUCZYNSKI, M. (1997): Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. *Aquaculture Research*, 28: 191-197. p.
- BABIAK, I., GLOGOWSKI, J., LUCZYNSKI, M.J., LUCZYNSKI, M., DEMAİNOWICZ, W. (1999): The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology*, 52: 473-479. p.
- BAJOMI, B., TATÁR, S., TÓTH, B., DEMÉNY, F., MÜLLERNÉ TRENOVSZKI, M., MÜLLER, T. (2013): Captive-breeding, re-introduction and supplementation of European mudminnow in Hungary. In: IUCN Global Re-introduction Perspectives: 2013. Further case-studies from around the globe (Eds: Soorae, P.S.), 7. p.
- BAKONYI, G., JUHÁSZ, L., KISS, I., PALOTÁS, G. (2003): Állattan. Mezőgazda Kiadó. Budapest, 805. p.
- BALIK, I., CUBUK, H., ÖZKÖK, R., UYSAL, R. (2006): Reproduction Properties of Pike (*Esox lucius* L., 1758) Population in Lake Karamik (Afyonkarahisar/Turkey). *Turkish Journal of Zoology*, 30: 27-34. p.
- BEIRÃO, J., CABRITA, E., PÉREZ-CEREZALES, S., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., HERRÁEZ, M.P. (2011): Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology*, 62(1): 22–31. p.

- BEIRÃO, J., BOULAIS, M., GALLEGÓ, V., O'BRIEN, J.K., PEIXOTO, S., ROBECK, T. R., CABRITA, E. (2019): Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology*, 133: 161-178. p.
- BEKKEVOLD, D., JACOBSEN, L., HEMMER-HANSEN, J., BERG, S., SKOV, C. (2014): From regionally predictable to locally complex population structure in a freshwater top predator: river systems are not always the unit of connectivity in northern Pike *Esox lucius*. *Ecology of Freshwater Fish*, 24(2): 305-316. p.
- BELENKY, M., ITZHAKOV, D., FREGER, V., ROSEMAN, O., ABEHSERA, S., MILLER, N., BERKOVITZ, A. (2020): Optimizing the protocol for vitrification of individual spermatozoa by adjusting equilibration time. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 1–6. p.
- BENZER, S., GÜL, A., YILMAZ, M. (2010): Breeding properties of *Esox lucius* (L., 1758) living in Kapulukaya Dam Lake (Kirikkale, Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 9(34): 5560-5565. p.
- BERNÁTH, G., HORVÁTH, Á. (2018): Az 5 ml-es műszalma töltési és zárási protokollja, Bernáth Gergely és Horváth Ákos MATE AKI munkatársak szóbeli közlése alapján
- 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: 76–78. p.
- 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, 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., ITTÉS, I., SZABÓ, Z., HORVÁTH, Á., KREJSZEFF, S., LUJIC, J., VÁRKONYI, L., URBÁNYI, B., BOKOR, Z. (2017a): Chilled and post-thaw storage of sperm in different goldfish types. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4): 680–686. p.
- BERNÁTH, G., VÁRKONYI, L., SZANATI, E., MOLNÁR, J., KAJTÁR, A., SOLYMOSI, E., URBÁNYI, B., BOKOR, Z. (2017b): Practical improvement of pike (*Esox lucius*) sperm cryopreservation. Aquaculture Europe, Dubrovnik, Croatia, 17-20. October, 2017. Abstract book, 101-102. p.
- BERNÁTH, G., CSENKI, ZS., BOKOR, Z., VÁRKONYI, L., MOLNÁR, J., SZABÓ, T., STASZNY, Á., FERINCZ, Á., SZABÓ, K., URBÁNYI, B., PAP, L.O., CSORBAI, B. (2018): The effects of different preservation methods on ide (*Leuciscus idus*) sperm and the longevity of sperm movement. *Cryobiology*, 81: 125–131. p.
- BERNÁTH, G., MILLA, S., VÁRKONYI, L., LEDORÉ, Y., GRIFFITTS, J.D., FONTAINE, P., URBÁNYI, B., BOKOR, Z. (2022): The effect of two different experimental rearing temperatures on the quality and the large-scale cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. *Theriogenology*, 185: 127-133. p.
- BERRGREN, H., NORDAHL, O., TIBBLIN, P., LARSSON, P., FORSMAN, A. (2016): Testing for local adaptation to spawning habitat in sympatric subpopulations of pike by reciprocal translocation of embryos. *PLOS ONE*, 11(5): 1-15. p.

- BILLARD, R. (1978): Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, 14: 187–198. p.
- BILLARD, R. (1986): Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1). *Reproduction Nutrition Développement*, 26(4): 877–920. p.
- BILLARD, R. (1996): Reproduction of pike: gametogenesis, gamete biology and early development. In: Pike. Biology and exploitation (Eds: Craig, J.F.), Springer Science and Business Media, B.V. Salisbury, England, 310. p.
- BILLARD, R., MARCEL, J. (1980): Stimulation of spermiation and induction of ovulation in pike (*Esox lucius*). *Aquaculture*, 21: 181–195. p.
- BILLARD, R., COSSON, J., CRIM, L.W. (1993): Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6: 67–75. p.
- BILLARD, R., COSSON, J., PERCHEC, G., LINHART, O. (1995): Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95–112. p.
- BÍRÓ, F. (2016): Állományszerkezet, populációdinamika, állományszabályozás. In: A csuka biológiája és tenyésztése. (Szerk: Szabó T.). Szent István Egyetem Kiadó. Gödöllő, 119–132. p.
- BLAXTER, J. H. S. (1953): Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature (London)*, 173: 1189–1190. p.
- BLECHA, M., KRISTAN, J., SAMARIN, A.M., RODINA, M., POLICAR, T. (2015): Quality and quantity of pikeperch (*Sander lucioperca*) spermatozoa after varying cold water treatments. *Journal Applied Ichthyology*, 31(2): 75–78. p.
- BLECHA, M., SAMARIN, A. M., KRISTAN, J., POLICAR, T. (2016): Benefits of hormone treatment of both sexes in semi-artificial reproduction of pikeperch (*Sander lucioperca* L.). *Czech Journal of Animal Science*, 61(5): 203–208. p.
- BOBE, J. (2015): Egg quality in fish: Present and future challenges. *Animal Frontiers*, 5(1): 66–72. p.
- BOBE, J., LABBÉ, 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., LABBÉ, C. (2009): Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 535–548. p.
- BOJTÁRNÉ LUKÁCSIK, M., KISS, G., GYÖNGY, Á.I., SZIRÁKI, B. (2020): Jelentés a Szervezet működésének 2019. évi eredményeiről. Kiadja: Magyar Akvakultúra és Halászati Szakmaközi Szervezet, Budapest, 52. p.
- BOKOR, Z., HORVÁTH, Á., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B. (2008): Cryopreservation of pike perch sperm in hatchery conditions. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah*, 60(3): 166–169. p.
- 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., ITTÉS, I., MOSONYI, G., KOTRIK, L., MÜLLER, T., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2015): Survival and growth rates of wels catfish (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758) larvae originating from fertilization with cryopreserved or fresh sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 31: 164–168. p.
- BOKOR, Z., BERNÁTH, G., VÁRKONYI, L., MOLNÁR, J., LÁNG, L.Z, 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.
- BOKOR, Z., CSORBAI, B., URBÁNYI, B. (2020): Édesvízi haltenyésztés. In: Halászat, haltenyésztés. (Szerk: Bank Cs.). Hermann Ottó Intézet Nonprofit Kft., Budapest, 47–134. p.

- BOKOR, Z., LÁNG, L.Z., VÁRKONYI, L., FODOR, F., NAGY, B., CSÓKÁS, E., MOLNÁR, J., CSORBAI, B., CSENKI-BAKOS, ZS., IVÁNOVICS, B., GRIFFITTS, J.D., URBÁNYI, B., BERNÁTH, G. (2023): The growth performance of pond-reared common carp (*Cyprinus carpio*) larvae propagated using cryopreserved sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, paper: 3440158, 1-12. p.
- BONDARENKO, V., DROZD, B., POLICAR, T. (2015a): Effect of water temperature on egg incubation time and quality of newly hatched larvae of northern pike (*Esox lucius* L., 1758). *Applied Ichthyology*, 31: 45-50. p.
- BONDARENKO, V., PODHOREC, P., SVINGER, V.W., POLICAR, T. (2015b): Evaluation of treatments for induction of ovulation in northern pike (*Esox lucius* L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15: 581-587. p.
- BONDARENKO, V., BLECHA, M., POLICAR, T. (2018): Changes of sperm morphology, volume, density, and motility parameters in northern pike during the spawning period. *Fish Physiology Biochemistry*, 44(6): 1591-1597. p.
- BORYSHPOLETS, S., DZYUBA, B., DROKIN, S. (2009): Pre-spawning water temperature affects sperm respiration and reactivation parameters in male carps. *Fish Physiology Biochemistry*, 35(4): 661–668. p.
- BORYSHPOLETS, S., SOCHOROVÁ, D., RODINA, M., LINHART, O., DZYUBA, B. (2017): Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm: Impact of seeding and freezing rates on post-thaw outputs. *Biopreservation of Biobanking*, 15: 234–240. 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.
- BOZKURT, Y., ÖĞRETMEN, 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. *Agricultural Science*, 15(3): 277-284. p.
- CABRITA, E., ANEL, L., AND HERRAÉZ, M.P. (2001): Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56: 623–635. p.
- CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRÃO, J., PÉREZ-CEREZALES, S., HERRÁEZ, M.P. (2010): Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 623–635. p.
- CABRITA, E., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., GAVAIA, P.J., RIESCO, M.F., VALCARCE, D.G., SARASQUETE, C., HERRÁEZ, M.P., ROBLES, V. (2014): Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432: 389–401. 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(1): 51-58. p.
- CALDEIRA, C., SOLER, C. (2018): Fish Sperm Assessment Using Software and Cooling Devices. *Journal of Visualized Experiments*, (137): e56823.
- CAMPBELL, L., CLULOW, J., DOODY, J. S., CLULOW, S. (2021): Optimal cooling rates for sperm cryopreservation in a threatened lizard conform to two-factor hypothesis of cryo-injury. *Cryobiology*, 103:101-106. p.
- CARNEVALI, O., MARADONNA, F., SAGRATI, A., CANDELMA, M., LOMBARDO, F., PIGNALOSA, P., BONFANTI, E., NOCILLADO, J., PALMA, P., GIOACCHINI, G., ELIZUR, A. (2019): Insights on the seasonal

- variations of reproductive features in the Eastern Atlantic Bluefin Tuna. *General and Comparative Endocrinology*, 113:216. p.
- CASSELMAN, J.M., LEVIS, C.A. (1996): Habitat requirements of northern pike (*Esox lucius*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(1): 161–174. p.
- CASTELLINI, C., DAL BOSCO, A., RUGGERI, S., COLLODEL, G. (2011): What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility*, 96(1): 24–27. p.
- CEJKO, B.I., SAROSIEK, B., KREJSZEFF, S., JUDYCKA, S., SZCZEPKOWSKI, M., SZCZEPKOWSKA, B., KOWALSKI, R.K. (2016): Effects of different stripping methods of female and activation medium on fertilization success in northern pike (*Esox lucius*). *Czech Journal of Animal Science*, 61(10): 481–486. p.
- CEJKO, B.I., KREJSZEFF, S., ŹARSKI, 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. (2020a): 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.
- CEJKO, B. I., SAROSIEK, B., DRYL, K., JUDYCKA, S., SZCZEPKOWSKA, B., SZCZEPKOWSKI, M., KOWALSKI, R.K. (2020b): The effect of cryopreservation extender on sperm motility and hatch success in northern pike (*Esox lucius*). *Aquaculture* 514: 734482. p.
- CHAO, N.-H., CHAO, W.-C., LIU, K.-C., LIAO, I.-C. (1987): The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *Journal of Fish Biology*, 30: 107–118. 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., DABROWSKI, K. (1993): Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109: 367–373. p.
- CIERESZKO, A., DABROWSKI, K. (1996): Effect of a sucrose-DMSO extender supplemented with pentoxifylline or blood plasma on fertilizing ability of cryopreserved rainbow trout spermatozoa. *Progressive Fish-Culturist*, 58:143–145. p.
- CIERESZKO, A., TOTH, G. P., CHRIST, S.A., DABROWSKI, K. (1996): Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Theriogenology*, 45: 665–672. p.
- CIERESZKO, A., DABROWSKI, K., LIN, F., CHRIST, S.A., TOTH, G.P. (1999): Effect of extender time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128(3): 542–548. p.
- CLOUD, J., PATTON, S. (2009): Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. 237–250. In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species* (Eds: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P.) Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis Group. 549. p.
- CONGET, P., FERNÁNDEZ, M., HERRERA, G., MINGUELL, J. (1996): Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture*, 143(3–4): 319–329. p.

- COOKE, S.J., COWX, I.G. (2004): The role of recreational fishing in global fish crises. *Bioscience*, 54: 857–859. p.
- COSSON, J. (2004): The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquacultural International*, 12: 69–85. p.
- COSSON, J. (2008): Methods to analyse the movements of fish spermatozoa and their flagella. 63-102.. In: Fish spermatology (Eds: Alavi, S. M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G.), Oxford, United Kingdom: Alpha Science International Ltd., 465. p.
- COSSON, M.P., BILLARD, R., LETELLIER, L. (1989): Rise of internal Ca^{2+} accompanies the initiation of trout sperm motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 14(3): 424–434. p.
- CRAIG, J.F. (1996): Pike. Biology and exploitation. Dunscore, Dumfriesshire, Scotland. 298. p.
- CRAIG, J.F. (2008): A short review of pike ecology. *Hydrobiologia*, 601: 5-16. p.
- CRANE, D.P., MILLER, L.M., DIANA, J.S., CASSELMAN, J.M., FARREL, J.M., KAPUSCINSKI, K.L., NOHNER, J.K. (2015): Muskellunge and northern Pike Ecology and Management: Important Issues and Research Needs. *Fisheries*, 40(6): 258-267. p.
- CSORBAI, B., URBÁNYI, B., SZABÓ, T., BOKOR, Z. (2016): Halászati és horgászati hasznosítás. In: A csuka biológiája és tenyésztése. (Szerk: Szabó T.). Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 133-140. p.
- DE KRETZER, D.M., LOVELAND, K.L., MEINHARDT, A., SIMORANGKIR, D., WREFORD, N. (1998): Spermatogenesis. *Human Reproduction* 13(1): 1–8. p.
- DE MONTALEMBERT, G., JALABERT, B., BRY, C. (1978): Precocious induction of maturation and ovulation in the northern pike (*Esox lucius*). *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*, 18: 969–975. p.
- DE MONTALEMBERT, G., MARCEL, J., BILLARD, R. (1980): La spermiation chez le brochet. 1) Evolution de la quantite de sperme recolte au cours de la saison de reproduction. Bull. *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture*, 276: 85–103. p.
- DEARING, C.G., KILBURN, S., LINDSAY, K.S. (2013): Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Human Fertility*, 17(1): 37–44. p.
- DELGADO-BERMÚDEZ, A., RIBAS-MAYNOU, J., YESTE, M. (2022): Relevance of aquaporins for gamete function and cryopreservation. *Animals (Basel)*, 12(5): 573. p.
- DENYS, G. P.J., DETTAI, A., PERSAT, H., HAUTECOEUR, M., KEITH, P. (2014): Morphological and molecular evidence of three species of pikes *Esox* spp. (*Actinopterygii*, *Esocidae*) in France, including the description of a new species. *Comptes Rendus Biologies*, 337: 521-534. p.
- DIANA, J.S. (1983): Growth, maturation, and production of northern pike in three michigan lakes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(1): 38-46. p.
- DIETRICH, G.J., NYNCA, J., SZZEPKOWSKI, M., DOBOSZ, S., SZCZEPKOWSKA, B., CIERESZKO, A. (2016): The effect of cryopreservation of semen from whitefish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability. *Aquaculture*, 464: 60-64. 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*, 44: 1443–1455. p.

- DIOGO, P., MARTINS, G., NOGUEIRA, R., MARREIROS, A., GAVAIA, P.J., CABRITA, E. (2019): Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring skeletogenesis. *Cryobiology*, 91: 115-127. p.
- DIWAN, A.D., HARKE, S.N., GOPALKRISHNA, PANCHE, A.N. (2020): Cryobanking of fish and shellfish egg, embryos and larvae: An Overview. *Frontiers in Marine Science*, 7: article: 251., 18. p.
- DOMJAN, M. (2012): Equilibration. In: Encyclopedia of the Sciences of Learning (Eds: Seel, N.M.), Springer, Boston, MA. 1171. 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(1): 87–98. p.
- DZYUBA, B., BORYSHPOLETS, S., RODINA, M., GELA, D., LINHART, O. (2010): Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze-thawing in different fish species. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 720-725. p.
- EDELIN, E., CARLSON, S.M., STIGE, L.C., WINFIELD, I.J., FLETCHER, J.M., JAMES, J.B., HAUGEN, T.O., VØLLESTAD, L.A., STENSETH, N.C. (2007): Trait changes in a harvested population are driven by a dynamic tug-of-war between natural and harvest selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 15799–15804. p.
- EINUM, S., FLEMING, I.A. (2002): Does within-population variation in fish egg size reflect maternal influences on optimal values? *The American Naturalist*, 160(6): 756-765. p.
- ELKOUBY, Y.M., MULLINS, M.C. (2017): Coordination of cellular differentiation, polarity, mitosis and meiosis – New findings from early vertebrate oogenesis. Review article. *Developmental Biology*, 430: 275-287. p.
- ELLIOT, F.I., SHERMAN, J.K., ELLIOT, E.J., SULLIVAN, J.J. (1973): A photo method of measuring sperm motility. *Journal of Animal Science*, 37: 310. p.
- ENGSTEDT, O., STENROTH, P., LARSSON, P., LJUNGGREN, L., ELFMAN, M. (2010): Assessment of natal origin of pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea using Sr:Ca in otoliths. *Environmental Biology of Fishes*, 89: 547-555. p.
- ERDAHL, D.A., GRAHAM, E.F. (1980): Preservation of gametes of freshwater fish. Ninth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, II, 16-20 June, Madrid, Spain, 317-326. p.
- FARRELL, J.M., LAPAN, S.R. (1996): Notes: egg distribution and spawning habitat of northern pike and Muskellunge in a St. Lawrence River Marsh, New York. *Transactions of the American Fisheries Society*, 125: 127-131. p.
- FAUVEL, C., SUQUET, M., COSSON, J. (2010): Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 636–643. p.
- FIGUEROA, E., VALDEBENITO, I., ZEPEDA, A.B., FIGUEROA, C.A., DUMORNÉ, K., CASTILLO, R.L., FARIAS, J.G. (2015): Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Reviews in Aquaculture*, 9(1): 76–87. p.
- FONYÓ, A., GEISZT, M. (2019): Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 726. p.
- FRANĚK, R., MARINOVIĆ, Z., LUJIĆ, J., URBÁNYI, B., FUČÍKOVÁ, M., KAŠPAR, V., PSĚNIČKA, M., HORVÁTH, Á. (2019): Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLOS ONE*, 14(4): e0205481.
- GAGE, M.J.G., MACFARLANE, C.P., YEATES, S., WARD, R.G., SEARLE, J.B., PARKER, G.A. (2004): Spermatozoal traits and sperm competition in atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology*, 14: 44-47. 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.
- GALLEGO, V., HERRANZ-JUSDADO, J.G., ROZENFELD, C, PÉREZ, L., ASTURIANO, J.F. (2018): Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiology Biochemistry*, 44:1457- 1467. p.
- GALLEGO, V., ASTURIANO, J.F. (2019): Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. *Reviews in Aquaculture*, 11(3): 697-724. p.
- GANDOLFI, A., FORTANETO, D., NATALI, M., LUCENTINI, L. (2015): Mitochondrial genome of *Esox flaviae* (Southern pike): announcement and comparison with other *Esocidae*. Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 27: 3037-3038. p.
- GILES, N., WRIGHT, R.M., NORD, M.E. (1986): Cannibalism in pike fry, *Esox lucius* L.: some experiments with fry densities. *Journal of Fish Biology*, 29: 107–113. p.
- GINZBURG, A.S. (1968): Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. (Translated to english by: Blake., Z). Israel Program for Scientific Translations Ltd. (1972), Jerusalem, 358. p.
- GLOGOWSKI, J., BABIAK, I., LUCZYNSKI, M.J., LUCZYNSKI, M. (1997): Factors affecting cryopreservation efficiency and enzyme activity in northern pike, *Esox lucius*, Sperm. *Journal of Applied Aquaculture*, 7(4): 53-67. p.
- GLOGOWSKI, J., CIERESZKO, A., DABROWSKI, K. (1999): Cryopreservation of muskellunge and yellow perch semen. *North American Journal of Aquaculture*, 61(3): 258–262. p.
- GRIER, H.J. (1981): Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist*, 21: 345–357. p.
- GRIER, H.J., LINTON, J.R. (1977): Ultrastructural identification of the sertoli cell in the testis of the northern pike, *Esox lucius*. Rapid communication. *American Journal of Anatomy*, 149(2): 283-288. p.
- GUILLERAULT, N., LOOT, G., BLANCHET, S., SANTOUL, F. (2018): Catch-related and genetic outcome of adult northern pike. *Journal of Fish Biology*, 93: 1107-1112. p.
- GUNETTI, M., CASTIGLIA, S., RUSTICHELLI, D., MARESCHI, K., SAVANIO, F., MURARO, M., SIGNORINO, E., CASTELLO, L., FERRERO, I., FAGIOLI, F. (2012): Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102W device, an alternative practical approach for cell counting. *Journal of Translational Medicine*, 10(1): article number: 112.
- GYÖRGY, P. (2000): Az andrológia tankönyve. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest 248. p
- HAGEDORN, M., KLEINHANS, F.W. (2000): Problems and prospects in cryopreservation on fish embryos. In: Cryopreservation in aquatic species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA 161-178. p.
- HAGEDORN, M., VARGA, Z., WALTER, R.B., TIERSCH, T.R. (2018): Workshop report: Cryopreservation of aquatic biomedical models. *Cryobiology*, 86: 120-129. p.
- HARJANTI, E.R., ABINAWANTO, A., ARIFIN, O. Z., KRISTANTO, A.H. (2020): The fertilization of *Tor soro* fish (Valenciennes, 1842) using post cryopreservation sperm: the effect of skim milk as a cryoprotectant. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 441. p.

- HARVEY, B. (2009): A biological synopsis of northern pike (*Esox lucius*). Fisheries and Oceans Canada. Hammond Bay. 39. p.
- HARVEY, B., ASHWOOD-SMITH, M.J. (1982): Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology*, 20: 432-439.
- HASSAN, M.M., QIN, J.G., LI, X. (2015): Sperm cryopreservation in oysters: A review of its current status and potentials for future application in aquaculture. *Aquaculture*, 438: 24–32. p.
- HASSLER, T.J. (1982): Effect of temperature on survival of northern pike embryos and yolk-sac larvae. *The Progressive Fish-Culturist*, 44(4): 174-178. p.
- HERRÁEZ, M.P., AUSIÓ, J., DEVAX, A., GONZÁLEZ-ROJO, S., FERNÁNDEZ-DÍEZ, C., BONY, S., SEPARAS, N., ROBLES, V. (2017): Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish. *Aquaculture*, 472: 45-59. p.
- HEZAVEHEI, M., SHARAFI, M., KOUCHESFAHANI, H.M., HENKEL, R., AGARWAL, A., ESMAEILI, V., SHAHVERDI, A. (2018): Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3): 327-339. p.
- HINER, L.E. (1961): Propagation of northern pike. *Transactions of the American Fisheries Society*, 90(3): 298–302. p.
- HOAR, W., RANDALL, D., DONALDSON, E.M. (1983): Fish physiology, Volume IX B, Academic press, 477. p.
- HOCHLEITHNER, M. (2015): Hechte (*Esociformes*): Biologie und aquakultur. AquaTech Publication, Germany, 168. p.
- HOFFMANN, R., WONDRAK, P., GROTH, W. (1980): Seasonal anatomical variations in the testes of European pike, *Esox lucius* L.. *Journal of Fish Biology*, 16: 475-482. p.
- HOLT, W.V., PALOMO, M.J. (1996): Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reproduction, Fertility and Development*, 8: 219-230. p.
- HOLT, W.V., CUMMINS, J.M., SOLER, C. (2018): Computer-assisted sperm analysis and reproductive science; a gift for understanding gamete biology from multidisciplinary perspectives. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6): 3-5. p.
- HOLTZ, W. (1993): Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture*, 110: 97–100. p.
- HORVÁTH, A., JOHN, V., SZENCI, O. (2006a): A spermiumok motilitása I. (A motilitás strukturális háttere és vizsgálata). *Magyar Állatorvosok Lapja*, 5: 308–316. p.
- HORVÁTH, A., VÁSÁRHELYI, J., SZENCI, O. (2006b): A hímivar sejtek mozgása II. (A mozgást vizsgáló módszerek fejlődése). *Magyar Állatorvosok Lapja*, 128(7): 437-442. p.
- HORVÁTH, Á. (2001): Halgaméták mélyhűtési módszereinek továbbfejlesztése. Doktori értekezés, Gödöllő, 102. p.
- HORVÁTH, Á. (2018): A spermamélyhűtés szerepe egyes természetvédelmi és gazdasági szempontból jelentős halfajok genetikai tartalékainak megőrzésében. MTA Doktori értekezés, Gödöllő, 84. p.
- HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B. (2000): The effect of cryoprotectant on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquacultural Research*, 31: 317-324. p.

- HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B. (2020): Chapter 15 Sperm Cryopreservation of Aquatic Species. In: *Reproduction Aquatic Animals* (Eds: Yoshida, M., Asturiani, J.F.), 321-334. p.
- HORVÁTH, Á., MISKOLCZI, E., AND URBÁNYI, B. (2003): Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, 16: 457–460. p.
- HORVÁTH, Á., MISKOLCZI, E., MIHÁLFFY, SZ., ÓSZ, K., SZABÓ, K., URBÁNYI, B. (2007): Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54: 251-257. p.
- HORVÁTH, Á., WAYMAN, W.R., DEAN, J.C., URBÁNYI, B., TIERSCH, T.R., MIMS, S.D., JOHNSON, D., JENKINS, J.A. (2008): Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American *Acipenseriform* species: a retrospective study. *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 443–449. p.
- HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B., WANG, C., ONDERS, R.J., MIMS, S.D. (2010): Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 715-719. p.
- HORVÁTH, Á., JESENŠEK, D., CSORBAI, B., BOKOR, Z., RABOCZKI, É., KACZKÓ, D., BERNÁTH, G., HOITSY, GY., URBÁNYI, B., BAJEC, S., SNOJ, A. (2012): Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture*, 358-359: 213–215. 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., MAGYARY, I. (2007): A haszonhalak szaporítása. In: *Haltenyésztés*. (Szerk.: Hancz Cs). Egyetemi jegyzet, Kaposvár, 107-109. p.
- HORVÁTH, L., CSORBAI, B., URBÁNYI, B. TAMÁS, G. (2009): Néhány halfaj ivadékanak táplálkozási adaptációja a zooplankton-kínálathoz. *Állattani Közlemények*, Tudományterületi áttekintés (review), 94(2): 131-145. p.
- HU, J-H., LI, Q-W., GANG-LI., CHEN, X-Y., HAI-YANG, ZHANG, S-S., WANG, L-Q. (2006): The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(4): 486-494. p.
- HULAK, M., RODINA, M., OTOMAR L. (2008a): Characteristics of stripped and testicular northern pike (*Esox lucius*) sperm: spermatozoa motility and velocity. *Aquatic Living Resources*, 21: 207-212. p.
- HULAK, M., RODINA, M., ALAVI, S.M.H., LINHART O. (2008b): Evaluation of semen and urine of pike (*Esox lucius* L.) ionic compositions and osmolality of the seminal plasma and sperm volume, density and motility, *Cybum*, 32(2): 189–190. p.
- HUNTINGFORD, F.A. (2020): Fish Behaviour: Determinants and Implications for Welfare. In: *The Welfare of Fish. Animal Welfare 20* (Eds: Gartner, M.C.), 515. p.
- HUSUM, H., STRADA, G. (2002): Measuring injury severity. The ISS as good as the NISS for penetrating injuries. *Prehospital and Disaster Medicine*, 17: 27–32. p.
- ICKOWICZ, D., FINKELSTEIN, M., BREITBART, H. (2012): Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: Role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*, 14: 816-821. p.
- INGLES C.J., DIXON, G.H. (1967): Phosphorylation of protamine during spermatogenesis in trout testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 58(3): 1011-1018. p.

- IRAWAN, H., VUTHIPHANDCHAI, V., NIMRAT, S. (2010): The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4): 236–243. p.
- JACOBSON, P., BERGSTROM, U., EKLÖF, J. (2019): Size-dependent diet composition and feeding of eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and northern pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea. *Boreal Environment Research*, 24: 137-153. p.
- JALABERT, B. (2005): Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*, 45(3): 261–279. p.
- JUDYCKA, S., ŻARSKI, D., DIETRICH, M.A., PALIŃSKA-ŻARSKA, K., KAROL, H., CIERESZKO, A. (2018): Standardized cryopreservation protocol of European perch (*Perca fluviatilis*) semen allows to obtain high fertilization rates with the use of frozen/thawed semen. *Aquaculture*, 498: 208-216. p.
- JUDYCKA, S., NYNCA, J., CIERESZKO, A. (2019): Opportunities and challenges related to the implementation of sperm cryopreservation into breeding of salmonid fishes. *Theriogenology*, 132: 12-21. p.
- JUDYCKA, S., SŁOWIŃSKA, M., NYNCA, J., LISZEWSKA, E., DOBOSZ, S., CIERESZKO, A. (2020): Effects of glucose, methanol concentration, and time of equilibration on post-thaw sperm motility of rainbow trout semen. *Aquaculture*, 734996.
- KHAN, I.M., CAO, Z., LIU, H., KHAN, A., RAHMAN, S. U., KHAN, M.Z., SANTHANAWONGS, A., ZHANG, Y. (2021): Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance omics to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 8: 139. p.
- KHOLODNYI, V., GADEHLA, 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, Aquaculture*, 1-28. p.
- KIERSZENBAUM, A.L., TRES, L. (2019): Chapter 20 Spermatogenesis. In: *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Elsevier, 663-700. p.
- KIME, D.E., EBRAHIMI, M., NYSTEN, K., ROELANTS, I., RURANGWA, E., MOORE, H.D.M., OLLIVIER, 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: 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. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130: 425-433. p.
- KISS, G. (2022): Lehalászás jelentés idősoros bontásban 2007-2021., *Lehalászási jelentés* (Szerk.: Demeter E.), Agrárgazdasági Intézet, 27(1): 1-60. p.
- KISS, I. (2000): A halak testfelépítése és biológiája. In: *Halbiológia és haltenyésztés* (Szerk.: Horváth L.). Mezőgazda Kiadó, Budapest, 17-67. p.
- KOÇ, N.D., AYTEKIN, Y., YÜCE, R. (2008): Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3): 513-522. p.
- KOKKONEN, E., VAINIKKA, A., HEIKINHEIMO, O. (2015): Probabilistic maturation reaction norm trends reveal decreased size and age at maturation in an intensively harvested stock of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Fisheries Research*, 167: 1–12. p.
- KOLDRAS, M., MOCZARSKI, M. (1983): Properties of pike *Esox lucius* L. milt and its cryopreservation. *Polish Archives of Hydrobiology*, 30: 69–78. p.

- KOTAKORPI, M., TIAINEN, J., OLIN, M., LEHTONEN, H., NYBERG, K., RUUHIJÄRVI, J., KUPARINEN, A. (2013): Intensive fishing can mediate stronger size-dependent maternal effect in pike (*Esox lucius*). *Hydrobiologia*, 718: 109-118. p.
- KOTTELAT, M., FREYHOF, J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany, 646. p.
- KOWALSKI, R.K., CEJKO, B.I. (2019): Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94–108. p.
- KOWALSKI, R., HLIWA, P., CEJKO, B.I., KRÓL, J., STABINSKI, R., CIERESZKO, A. (2012): Quality and quantity of smelt (*Osmerus eperlanus* L.) sperm in relation to time after hormonal stimulation. *Reproductive Biology*, 12(2): 231-246. p.
- KRASZNAI, Z., MORISAWA, M., MORISAWA, S., KRASZNAI, Z.T., TRON, L., GASPARI, R. (2003): Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquatic Living Resources*, 16: 445-449. p.
- KRISTAN, J., ŽARSKI, D., BLECHA, M., POLICAR, T., MALINOVSKYI, O., SAMARIN, A.M., PALINSKA-ZARSKA, K., NOWOSAD, J., KREJSZEFF, S., KUCHARCZYK, D. (2018): Fertilizing ability of gametes at different post-activation times and the sperm-oocyte-ratio in the artificial reproduction of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture Resources*, 49: 1383–1388. p.
- KRISTAN, J., SAMARIN, A.M., MALINOVSKYI, O., POLICAR, T. (2020): Gamete management for artificial reproduction of northern pike *Esox lucius* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 528: 735575.
- KRISTIANSEN, T.S., BRACKE, M.B.M. (2020): A brief look into the origins of fish welfare science. In: The Welfare of Fish. Animal Welfare 20 (Eds: Gartner, M.C.), 515. p.
- KUCHARCZYK, D., MAMCARZ, A., KUJAWA, R., SKRZYPCZAK, A. (1998): Development of cannibalism in larval northern pike, *Esox lucius* (*Esocidae*), *Italian Journal of Zoology*, 65(1): 261-263. p.
- KUCSKA, B. (2007): A csuka (*Esux lucius* L.) intenzív nevelése. Doktori értekezés, Keszthely, 89. p.
- KUCSKA, B. (2016): A csuka intenzív, táppal történő nevelése. In.: A csuka biológiája és tenyésztése (Szerk.: Szabó T.). Szent István Egyetem Kiadó, Gödöllő, 171-180. p.
- KUCSKA, B., MÜLLER, T., SÁRI, J., BÓDIS, M., BERCSÉNYI, M. (2005): Successful growth of pike (*Esox lucius*) on pellet at artificial condition. *Aquaculture*, 246: 227-230. p.
- KUCSKA, B., MÜLLER, T., BERCSÉNYI, M. (2007): The effect of feeding frequency on the growth and survival of pike (*Esox lucius* L.) using floating pellets. *Journal of Applied Ichthyology*, 23(2): 193–194. p.
- LABBÉ, C., MARTORIAT, A., DEVAUX, A., MAISSE, G. (2001): Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60: 397-404. p.
- LAHNSTEINER, F. (2000): Semen cryopreservation in the *Salmonidae* and in the northern pike. *Aquaculture Research*, 31: 245–258. p.
- LAHNSTEINER, F. (2011): Cryopreservation protocols for sperm of Salmonid fishes, in: Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd Edition (Eds: Tiersch, T.R., Green, C.C.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 409–420. p.
- LAHNSTEINER, F., MANSOUR, N. (2008): Protocols for the cryopreservation of *Salmonidae* semen, *Lota lota* (*Gadidae*) and *Esox lucius* (*Esocidae*). In: Methods in Reproductive Aquaculture (Eds: Lahnsteiner, F.), 373–384. p.

- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. (1997): Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, 28: 471-479. p.
- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. (1998): An efficient method for cryopreservation of testicular sperm from the northern pike, *Esox lucius* L. *Aquaculture Research*, 29: 341-347. p.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T. (1999): Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *Journal of Experimental Zoology*, 284: 454–465. p.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T. (2003): Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*, 60(5): 829–841. p.
- LARSEN, L., SCHEIKE, T., JENSEN, T.K., BONDE, J.P., ERNST, E., HJOLLUND, H., ZHOU, Y., SKAKKEBAEK, N.E., GIWERCMAN, A., THE DANISH FIRST PREGNANCY PLANNER STUDY TEAM (2000): Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, 15(7): 1562–1567. p.
- LARSSON, P., KOCH-SCHMIDT, P., ENGSTEDT, O., NILSSON, J., NORDAHL, O., FORSMAN, A. (2015): ecology, evolution, and management strategies of northern pike populations in the Baltic Sea. *Ambio*, 44(3): 451-461. p.
- LEE, S., YOSHIZAKI, G. (2016): Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology*, 72(2): 165–168. p.
- LEE, Y.H., PARK, J.Y., LEE, I.Y., ZIDNI, I., LIM, H.K. (2021): Effects of cryoprotective agents and treatment methods on sperm cryopreservation of stone flounder, *Kareius bicoloratus*. *Aquaculture*, 531, 735969. p.
- LEGENDRE, M., LINHART, O., BILLARD, R. (1996): Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in *Siluroidei*. *Aquatic Living Resources*, 9: 59–80. p.
- LEIBO, S.P. (1980): Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized Mouse Ova. *Journal of Membrane Biology*, 53: 179-188. p.
- LENHARDT, M., CAKIC, P. (2002): Seasonal reproductive cycle of pike, *Esox lucius* L., from the River Danube. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 7-13. p.
- LÉVAI, F., HORVÁTH, L. (1980): A csuka mesterséges szaporításának továbbfejlesztése. *Halászat*, 73(1): 4-5. p.
- LIN, F., LIU, L., DABROWSKI, K. (1996a): Characteristics of muskellunge spermatozoa I: ultrastructure of spermatozoa and biochemical composition of semen. *Transactions of the American Fisheries Society*, 125(2): 187–194. p.
- LIN, F., CIERESZKO, A., DABROWSKI, K. (1996b): Sperm production and cryopreservation in muskellunge after carp pituitary extract and hCG injection. *Progressive Fish-Culturist*, 58: 32–37. p.
- LINHART, O. (1984): Evaluation of pike and European catfish sperm. *Bulletin VURH Vodnany*, 20: 22–33. 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.
- LIU, Y.T., WARME, P.K. (1977): Computerized evaluation of sperm cell motility. *Computers and Biomedical Research*, 10: 127-138. p.

- LOOMIS, P.R., AMANN, R.P., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W. (1983): Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *Journal of Animal Science*, 56(3): 687–693. p.
- LORENZEN, K. (2005): Population dynamics and potential of fisheries stock enhancement: practical theory for assessment and policy analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360: 171–189. p.
- LORENZEN, K. (2014): Understanding and managing enhancements: why fisheries scientists should care. Review paper. *Journal of Fish Biology*, 85: 1807–1829. p.
- LORENZEN, K., BEVERIDGE, M.C.M., MANGEL, M. (2012): Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. *Biological Reviews*, 87: 639–660. p.
- LUBZENS, E., YOUNG, G., BOBE, J., CERDÀ, J. (2010): Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 367–389. p.
- LUBZENS, E., LABBÉ, C., CIERESZKO, A. (2017): Introduction to the special issue on recent advances in fish gamete and embryo Research. *Aquaculture*, 472: 1–3. p.
- MAGYARY, I., URBÁNYI, B., HORVÁTH, L. (1996): Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm I. The importance of oxygen supply. *Journal of Applied Ichthyology*, 12: 113–115. p.
- MARTIN, J.C., KLUG, E., GÜNZEL, A.R. (1979): Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplements*, 27: 47–51. p.
- MARTIN, M., EDGERTON, S., WISEMAN, B. (2000): Frozen semen. A breeding protocol that results in high fecundity. *Swine Health Production*, 8(6): 275–277. 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(4): 594–604. p.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., HORVÁTH, Á., LABBÉ, C., ZHANG, T., ROBLES, V., HERRÁEZ, P., SUQUET, M., ADAMS, S., VIVEIROS, A., TIERSCH, T.R., CABRITA, E. (2017): Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472: 156–177. p.
- MARTY, L., DIECKMANN, U., ERNANDE, B. (2014): Fisheries-induced neutral and adaptive evolution in exploited fish populations and consequences for their adaptive potential. *Evolutionary Applications*, 8(1): 47–63. p.
- MASSÁNYI, P., CHRENEK, P., LUKÁČ, N., MAKAREVICH, A.V., OSTRO, A., ŽIVČAK, J., BULLA, J. (2008): Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak Journal of Animal Science*, 41(2): 60–66. p.
- MATSUMURA, S., ARLINGHAUS, R., DIECKMANN, U. (2011): Assessing evolutionary consequences of size-selective recreational fishing on multiple life-history traits, with an application to northern pike (*Esox lucius*). *Evolutionary Ecology*, 25: 711–735. p.
- MATTHEWS, J.L., MURPHY, J.M., CARMICHAEL, C., YANG, H., TIERSCH, T., WESTERFIELD, M., VARGA, Z.M. (2018): Changes to extender, cryoprotective medium, and in vitro fertilization improve Zebrafish sperm cryopreservation. *Zebrafish*, 15(3): 279–290. p.
- MAZUR, P. (1977): The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14: 251–272. p.

- MAZURIAS, D., GLYNATSI, N., DARIAS, M.J., CHRISTODOULOPOULOU, S., CAHU, C.L., ZAMBONINO-INFANTE, J-L., KOUMOUNDOUROS, G. (2009): Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture*, 294: 262-270. p.
- MELRADO, A., ANDERSON, W.J., MILLAR, J.D., HOLT, W.V., WATSON, P.F. (2002): A custom-built controlled-rate freezer for small sample cryopreservation studies. *Cryoletters*, 23: 397-404. p.
- MILARDI, M., LAPPALAINEN, J., JUNTUNEN, T. (2014): Variation in length, girth and weight of large northern pikes (*Esox Lucius*) in Finland. *Annales Zoologici Fennici*, 51(3): 335-339. p.
- MINGELBIER, M., BRODEUR, P., MORIN, J. (2008): Spatially explicit model predicting the spawning habitat and early stage mortality of northern pike (*Esox lucius*) in a large system: the St. Lawrence River between 1960 and 2000. *Hydrobiologia*, 601: 55–69. p.
- MISKOLCZI, E., MIHÁLFFY, S., PATAKINÉ VÁRKONYI, E., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2005): Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 247: 119–125. p.
- MITCHELL, P., CHEESEMAN, E., HARRIMAN, J., GLEN, K.E., MCCALL, M., THOMAS, R. (2017): A new automated vial thawer controls the thawing of cryopreserved mesenchymal stem cells to achieve high cell viability and growth potential. *Cytotherapy*, 19(5): S121–S122. p.
- MIURA, T., MIURA, C.I. (2003): Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 181-186. p.
- MORISAWA, M., SUZUKI, K., SHIMIZU, H., MORISAWA, S., YASUDA, K. (1983): Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*, 107: 95-103. p.
- MORRIS, G., ACTON, E., FASZER, K., FRANKLIN, A., YIN, H., BODINE, R., PAREJA, J., ZANINOVIC, N., GOSDEN, R. (2006): Cryopreservation of murine embryos, human spermatozoa and embryonic stem cells using a liquid nitrogen-free, controlled rate freezer. *Reproductive BioMedicine Online*, 13(3): 421–426. p.
- MORRIS, J., BABOO, J., MILNE, S., LAMB, S., NANCEKIEVILL, A., CREASY, C., KILBRIDE, P., DELAHAYE, M., GADDUM, N., BLANCO, M., CALLENS, S., WARD, S. (2017): Completing the cold chain: The development of GMP compliant dry thawers. *Cytotherapy*, 19(5): S86–S87. p.
- MOSLEMI-AQDAM, M., IMANPOUR, NAMIN, J., SATTARI, M., ABDOLMALAKI, S., BANI, A., ROCHOWSKI, B.E.A. (2016): Reproductive characteristics of northern pike, *Esox lucius* (*Actinopterygii: Esociformes: Esocidae*), in the Anzali Wetland, southwest Caspian Sea. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 46(4): 313-323. p.
- MOUNIB, M.S. (1978): Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53: 13-18. p.
- MURRY, B.A., FARRELL, J.M., SCHULZ, K.L., TEECE, A.T. (2008): The effect of egg size and nutrient content on larval performance: implications to protracted spawning in northern pike (*Esox lucius* Linnaeus). *Hydrobiologia*, 601:71-82. p.
- MUSTAMÄKI, N., BERGSTRÖM, U., ÅDJERS, K., SEVASTIK, A., MATTILA, J. (2014): Pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) in decline: high mortality of three populations in the northern Baltic Sea. *Ambio*, 43: 325–336. p.
- MÜLLER, T. (2021): Keltetőházi halszaporítási gyakorlattól eltérő új- és újszerű módszertani eljárások. MTA Doktori értekezés tézisei, Gödöllő, 25. p.

- MYLONAS, C.C., DUNCAN, N.J., ASTURIANO, J.F. (2017): Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*, 472: 21-44. p.
- NELSON, E.R. HABIBI, H.R. (2013): Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 192: 15–24. p.
- NELSON, J.S., GRANDE, T.C., WILSON, M.V.H. (2016): *Fishes of the World*. Fifth Edition. John Wiley & Sons, Inc. Printed in the United States of America. 707. p.
- NÉMETH, S., IFJ. HORVÁTH, Z., FELFÖLDI, Z., BELICZKY, G. (2012): Engedélyezett parazita-mentesítő eljárások összehasonlítása tavi egynyaras süllő (*Sander lucioperca*) intenzív rendszerbe helyezésekor. *Halászat*, 105(2): 29-35. p.
- NILSSON, P. A., BRONMARK, C. (2000): Prey vulnerability to a gape-size limited predator: behavioural and morphological impacts on northern pike piscivory. *Oikos*, 88: 539–546. p.
- NIU, J., WANG, X., LIU, P., LIU, H., LI, R., LI, Z., HE, Y., QI, J. (2022): Effects of cryopreservation on sperm with cryodiluent in viviparous Black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *International Journal of Molecular Science*, 23: 3392. p.
- NÓBREGA, R.H., BATLOUNI, S.R., FRANÇA, L.R. (2008): An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1): 197–206. p.
- NYESTE, K., SOMOGYI, D., BERECSKI, CS., ANTAL, L. (2022): Halmentés a beregi Zsid-tónál. *A Magyar Haltani Társaság Hírei*, 115(1): 14-15. p.
- NYNCA, J., JUDYCKA, S., LISZEWSKA, E., DOBOSZ, S., CIERESZKO, A. (2017): Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*, 477: 23–27. p.
- NYNCA, J., JUDYCKA, S., LISZEWSKA, E., DOBOSZ, S., KRZYŚ, M., CIERESZKO, A. (2021): Effect of double freezing fish semen on sperm motility and fertility. *Aquaculture*, 530: 735782.
- OKABE, M. (2013): The cell biology of mammalian fertilization. *Development* (Cambridge, England), 140: 4471-4479. p.
- OYETUNJI, T., CROMPTON, J.G., EFRON, D.T., HAUT, E.R., CHANG, D.C., CORNWELL, E.E., HAIDER, A.H. (2010): Simplifying Physiologic Injury Severity Measurement for Predicting Trauma Outcomes. *Journal of Surgical Research*, 159(2): 627–632. p.
- PANZICA-KELLY, J.M., ZHANG, C.X., AUGUSTINE-RAUCH, K. (2012): Zebrafish embryo developmental toxicology assay. In: *Developmental Toxicology Methods and Protocols* (Eds: C. Harris, C., Hansen, J.M.), Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 25–50. p.
- PARENTI, L.R., GRIER, H.J. (2004): Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44(5): 333–348. p.
- PARIS, A., ANTIGNAC, J-P., LE BIZEC, B., BONNEAU, M. (2006): Hormones and growth promoters in animal breeding: From physiological end-points to risk assessment considerations. *Productions Animales –Paris- Institut National de la Recherche Agronomique*, 19(3): 151-240. p.
- PATAKI, B., HORVÁTH, Á., MÉSZÁROS, G., KITANOVIC, N., ÁCS, A., HEGYI, Á., MOLNÁR, J., CSORBAI, B., URBÁNYI B. (2022): Adjustment of common carp sperm concentration prior to cryopreservation: Does it matter? *Aquaculture Reports*, 24: 101-109. p.

- PAVLOV, D.A., EMEL'YANOVA, N. (2016): Reproductive dynamics. In: Fish Reproductive Biology (Eds: Jakobsen, T., Fogarty, M.J., Megrey, A.B., Moksness, E.), 50–97. p.
- PECHA, O. KOURIL, J. PECHA, O. (1992): Induced ovulation in pike (*Esox lucius*) females using carp pituitary and two synthetic analogues of Gn-RH. Proceedings of Scientific Conference on Fish Reproduction 92, Vodnany, Czech Republic, 59-60. p.
- PÉREZ, L.M. (2020): Chapter 4: Fish sperm maturation, capacitation, and motility activation. In: Reproduction in aquatic animals (Eds: Yoshida, M., Asturiano, J.), Springer, Singapore, 47-67. p.
- PHILLIPS, P.H., LARDY, H.A. (1939): Preservation of spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 1: 219-221. p.
- PIERCE, R.B., CARLSON, A.J., CARLSON, B.M., HUDSON, D., STAPLES, D.F. (2013): Depths and thermal habitat used by large versus small northern pike in three Minnesota Lakes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 142: 1629-1639. p.
- PIIRONEN, J., HYVÄRINEN, H. (1983): Cryopreservation of spermatozoa of the whitefish *Coregonus mukusun* Pallas. *Journal of Fish Biology*, 22: 159–163. p.
- PINTÉR, K. (2015): Magyarország halai. Mezőgazda Kiadó és Kereskedő Kft., Budapest, 359. p.
- POLGE, C., SMITH, A.U. PARKES, A.S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666. p.
- POLICAR, T., PODHOREC, P., STEJSKAL, V., HAMACKOVA, J., ALAVI, S.M.H. (2010): Fertilization and hatching rates and larval performance in captive common barbel (*Barbus barbus* L.) throughout the spawning season. *Journal Applied Ichthyology*, 26: 812-815. p.
- POSPISILOVA, A., BREJCHA, J., MILLER, V., HOLCMAN, R., ŠANDA, R., STUNDL, J. (2019): Embryonic and larval development of the northern pike: An emerging fish model system for evo-devo research. *Journal of Morphology*, 280(8): 1118-1140. p.
- POST, J.R., MUSHENS, C., PAUL, A., SULLIVAN, M. (2003): Assessment of alternative harvest regulations for sustaining recreational fisheries: model development and application to bull trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 23: 22–34. p.
- PRONINA, G.I., PETRUSHIN, A.B. (2019): Techniques for in vivo extraction of gonads of male European catfish (*Silurus glanis*) for the artificial reproduction. *AACL Bioflux*, 12(4): 1316-1322. p.
- PUGLISI, R., BORNAGHI, V., SEVERGNINI, A., VANNI, R., BALDUZZI, D., GALLI, A. (2016): Cryopreservation of stallion semen: laboratory assessment of sperm injuries after cushioned centrifugation and freezing with conventional and alternative directional freezing methods. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 64(4): 235-245. p.
- PUKK, L., KUPARINEN, A., JÄRV, L., GROSS, R., VASEMÄGI, A. (2013): Genetic and life-history changes associated with fisheries-induced population collapse. *Evolutionary Applications*, 6: 749–760. p.
- PUSKÁS, A. (1993): Ipari mikrobiológiai gyakorlatok. BME Vegyészmérnöki Kar Tanszéki Munkaközösség. Műegyetem Kiadó, Budapest 168. p.
- RAAT, A.J.P. (1988): Synopsis of biological data on the northern pike *Esox lucius* Linnaeus, 1758. *FAO Fisheries Synopsis*, 30(2): 187. p.
- RACH, J.J., HOWE, G.E., SCHREIEN, T.M. (1997): Safety of formalin treatments on warm- and coolwater fish eggs. *Aquaculture*, 149(3-4): 183-191. p.

- RANA, K.J., MCANDREW, B.J. (1989): The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture*, 76: 335–345. p.
- READING, B.J., SULLIVAN, C.V., SCHILLING, J. (2017): Vitellogenesis in fishes. *Reference Module in Life Sciences*, 1-12. p.
- READING, B., ANDERSEN, L., RYU, Y.-W., MUSHIROBIRA, Y., TODO, T., HIRAMATSU, N. (2018): Oogenesis and egg quality in finfish: Yolk formation and other factors influencing female fertility. *Fishes*, 3(4): 45: 1-28. p.
- RÉALIS-DOYELLE, E., PASQUET, A., FONTAINE, P., TELETCHÉA, F. (2022): Effects of temperature on the survival and development of the early life stages of northern pike (*Esox lucius*). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 423: 10. p.
- REICZIGEL, J., HARNOS, A., SOLYMOSI, N. (2007): Biostatisztika: nem statisztikusoknak. Pars Kft. Nagykovács. 455. p.
- RÉTHELYI, M., SZENTÁGOTHAJ, J. (2020): Funkcionális anatómia. IV. kiadás, Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 756. p.
- RODINA, M., GELA, D.; KOCOUR, M., ALAVI, S.H., HULAK, M., LINHART, O. (2007): Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. *Theriogenology*, 67: 931–940. p.
- ROSSEN, S., ABADJIEVA, D. (2015): Analysis of testis morphology and sperm parameters of *Esox lucius* (pike) from the River Danube. *Journal of Cytology & Histology*, S3:017, 1-3. p.
- RURANGWA, E., KIME, D.E., OLLEVIER, F., NASH, J.P. (2004): The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1-4): 1–28. 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.
- SÄISÄ, M., RÖNN, J., AHO, T., BJÖRKLUND, M., PASANEN, P., KOLJONEN, M.-L. (2008): Genetic differentiation among European whitefish ecotypes based on microsatellite data. *Hereditas*, 145: 69-83. p.
- SAMARIN, A.M., POLICAR, T., LAHNSTEINER, F. (2015a): Fish oocyte ageing and its effect on egg quality. *Review, Fisheries Science & Aquaculture*, 23(3): 302-314. p.
- SAMARIN, A.M., GELA, D., BYTYUTSKYY, D., POLICAR, T. (2015b): Determination of the best post-ovulatory stripping time for the common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(2): 51–55. p.
- SAMARIN, A.M., BLECHA, M., BYTYUTSKYY, D., POLICAR, T. (2015c): Post-ovulatory oocyte ageing in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15: 435–441. p.
- SAMARIN, A.M., SAMARIN, A.M., POLICAR, T. (2018): Cellular and molecular changes associated with fish oocyte ageing. *Reviews in Aquaculture*, 1-12. p.
- SANDOVAL-VARGAS, L., SILVA JIMÉNEZ, M., GONZÁLEZ, J.R., VILLALOBOS, E. F., CABRITA, E., ISLER, I.V. (2020): Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Reviews in Aquaculture*, 13: 365-387. p.
- SCHERR, T., KNAPP, G.L., GUITREAU, A., PARK, D.S-W., TIERSCH, T., NANDAKUMAR, K., MONROE, W.T. (2015): Microfluidics and numerical simulation as methods for standardization of zebrafish sperm cell activation. *Biomedical Microdevices*, 17: 65-75. p.

- SCHILLING, J., LOZIUK, P.L., MUDDIMAN, D.C., DANIELS, H.V., READING, B.J. (2015): Mechanisms of egg yolk formation and implications on early life history of White perch (*Morone americana*). *PLOS ONE*, 10(11): e0143225.
- SCHRECK, C.B. (2010): Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 549–556. p.
- SCHRECK, C.B., CONTRERAS-SANCHEZ, W., FITZPATRICK, M.S. (2001): Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197: 3-24. p.
- SCHULZ, R.W., MENTING, S., BOGERD, J., FRANÇA, L.R., VILELA, D.A.R., GODINHO, H.P. (2005): Sertoli cell proliferation in the adult testis - Evidence from two fish species belonging to different orders. *Biology of Reproduction*, 73(5): 891–898. p.
- SCHULZ, R.W., DE FRANCA, L.R., LAREYRE, J.J., LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R.H., MIURA, T. (2010): Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 390–411. p.
- SERRAT, A., SABORIDO-REY, F., GARCIA-FERNANDEZ, C., MUÑOZ, M., LLORET, J., THORSEN, A., KJESBU, O.S. (2019): New insights in oocyte dynamics shed light on the complexities associated with fish reproductive strategies. *Scientific Reports*, 9(1): 18411.
- SHAHVERDI, A., RASTEGARNIA, A., TOPRAGGALEH, T.R. (2014): Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal Fall*, 16(3): 279-88. p.
- SHANGGUAN, B., CRIM, L.W. (1999): Seasonal variation in sperm production and sperm quality in male winter flounder, *Pleuronectes americanus*: the effects of hypophysectomy, pituitary replacement therapy, and GnRH-a treatment. *Marine Biology*, 134:19–27. p.
- SIDDIQUE, M.A.M., LINHART, O., KUJAWA, R., KREJSZEFF, S., BUTTS, I.A.E. (2016): Composition of seminal plasma and ovarian fluid in ide *Leuciscus idus* and northern pike *Esox lucius*. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(6): 960-969. p.
- SKOV, C., LUCAS, M.C., JACOBSEN, L. (2018): Spatial ecology. In: *Biology and Ecology of pike* (Eds.: Skov, C., Nilsson, P.A.) 83-120. p.
- SMITH, P.J. (1994): Genetic diversity of marine fisheries resources: possible impacts of fishing. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 344. Rome, FAO, 53. p.
- SPENS, J., ENGLUND, G., LUNDQVIST, H. (2007): Network connectivity and dispersal barriers: using geographical information system (GIS) tools to predict landscape scale distribution of a key predator (*Esox lucius*) among lakes. *Journal of Applied Ecology*, 44(6): 1127–1137. p.
- STEPHENS, D.T., HICKMAN, R., HOSKINS, D.D. (1988): Description, validation, and performance characteristics of a new computer-automated sperm motility analysis system. *Biology of Reproduction*, 38: 577-586. p.
- SULTANA, M., NAHIDUZZAMAN, M., HASSAN, M., KHANAM, M., HOSSAIN, M. (2010): Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *University Journal of Zoology, Rajshahi University*, 28: 51–55. p.
- SZABÓ, F., BODÓ, I., MIHÓK, S., FÉSÜS, L., KOMLÓSI, I., POLGÁR, J.P. (2004): A biotechnológia alkalmazása az állatnemesítésben. In: *Általános állattenyésztés*. (Szerk.: Szabó F.) Mezőgazda Kiadó, Budapest, 339. p.
- SZABÓ, T. (1997a): A csuka megítélésének és állományának változása az elmúlt években. *Halászat*, 90: 111-112. p.
- SZABÓ, T. (1997b): A csuka szaporításának fejlesztési lehetőségei. *Halászat*, 90: 150-152. p.

- SZABÓ, T. (1997c): Különböző hormonkezelések hatásának vizsgálata a csuka (*Esox lucius* L.) ovulációjára és ikraminőségére. Kandidátusi értekezés. GATE, Állattenyésztési Intézet, Gödöllő, 121. p.
- SZABÓ, T. (1999): A keltetőházi csukaszaporítás hatékonyságának növelése. *Halászat*, 92(4): 151-154. p.
- SZABÓ, T. (2000): A csuka tógazdasági tenyésztése és szaporítása. In: Halbiológia és haltenyésztés (Szerk.: Horváth L.). Mezőgazda Kiadó, Budapest, 310-319. p.
- SZABÓ, T. (2001): Hormonally induced ovulation of northern pike via sustained-release vehicles. *North American Journal of Aquaculture*, 63: 137-143. p.
- SZABÓ, T. (2003): Ovulation induction in northern pike *Esoc lucius* L. using different GnRH analogues, Ovaprim, Dagin and carp pituitary. *Aquaculture Research*, 34: 479-486. p.
- SZABÓ, T. (2008): Use of Carbopol resin for carp pituitary administration improves the fertilization percentage of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus) eggs in commercial hatcheries. *Hydrobiologia*, 601: 91-97. p.
- SZABÓ, T. (2011): Új módszer az indukált csukaszaporítás során nyert ikra termékenyülésének növelésére. *Halászatfejlesztés, 33 – Fisheries & Aquaculture Development*, 33: 170-177. p.
- SZABÓ, T. (2012): Rázóasztal alkalmazása halikra duzzasztása során. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 36: 55. p.
- SZABÓ, T. (2016a): A csuka szaporodásbiológiája. In.: A csuka biológiája és tenyésztése. (Szerk.: Szabó T.). Szent István Egyetem Kiadó, Gödöllő, 63-79. p.
- SZABÓ, T. (2016b): A csuka keltetőházi szaporítása. In.: A csuka biológiája és tenyésztése. (Szerk.: Szabó T.) Szent István Egyetem Kiadó, Gödöllő, 141-160. p.
- SZABÓ, T., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B. (2000): A halak szaporodásbiológiája. In: Halbiológia és haltenyésztés (Szerk.: Horváth L.). Mezőgazda Kiadó, Budapest, 168-205. p.
- SZABÓ, T., DITRÓI, B., SZABÓ, K., BOKOR, Z., URBÁNYI, B. (2014): Comparison of the efficiency of common carp and Silver carp pituitary in the breeding of common carp (*Cyprinus carpio*) and northern pike (*Esox lucius*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(3): 841-844. p.
- SZABÓ, T., MOLNÁR, J., NYITRAI, M., TÓTH, G., UGRAI, Z., SZABÓ, K., URBÁNYI, B. (2021): Determination of the quantity of sperm required for the fertilization of northern pike (*Esox lucius*) eggs during hatchery breeding. Aquaculture Europe, Funchal, Madeira, October 4 – 7, 2021., Abstract book, 1263-1264. p.
- SZCZEPKOWSKI, M. (2009): Impact of selected abiotic and biotic factors on the results of rearing juvenile stages of northern pike *Esox lucius* L. in recirculating systems. *Archives of Polish Fisheries*, 17(3): 107-147. p.
- SZMELSKYJ, I., AQUILINA, L., SZMELSKYJ, A.O. (2015): Chapter 2 – Anatomy and physiology of the reproductive system: Prerequisites for conception. In Acupuncture for IVF and assisted reproduction, Churchill Livingstone, 23-58. p.
- TAKÁCS, P., CZEGLÉDI, I., FERINCZ, Á., SÁLY, P., SPECZIÁR, A., VITÁL, Z., WEIPERTH, A., ERŐS, T. (2017): Non-native fishspecies in Hungarian waters: historical overview, potential sources and recent trends in their distribution. *Hydrobiologia*, 795(1): 1-22. p.
- TAKÁCS, P., BÁNÓ, B., CZEGLÉDI, I., ERŐS, T., FERINCZ, Á., GÁL, B., BÁNÓ-KERN, B., KOVÁCS, B., NAGY, A.A., NYESTE, K., LENTE, V., PREISZNER, B., SIPOS, S., STASZNY, Á., VITÁL, Z., WEIPERTH, A., CSOMA, E. (2022): The mixed phylogenetic origin of northern pike (*Esox*

- lucius* Linnaeus 1758) populations in the Middle Danubian drainage. *BMC Zoology*, 7, Article number: 28, 1-12. p.
- TALARCZYK-DESOLA, J., BERGER, A., TASZAREK-HAUKE, G., HAUKE, J., JEDZEYCZAK, P. (2017): Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? *Ginekologia Polska*, 88(2): 56-60. p.
- TAMÁS, G. (1970): A csuka, a süllő és a harcsaivadék táplálkozása élete első néhány hetében. *Halászat*, 63(1): 16. p.
- TAN, E., YANG, H., TIERSCH, T.R. (2010): Determination of sperm concentration for small-bodied biomedical model fishes by use of microspectrophotometry. *Zebrafish*, 7(2): 233–240. p.
- TATÁR, S. (2017): Mintaprogram a lápi póc (*Umbra krameri* Walbaum, 1792) in situ és ex situ védelmének megalapozására. Doktori értekezés tézisei, Gödöllő, 20. p.
- TATÁR, S., TÓTH, B., MÜLLER, T. (2020): A Lápi póc Fajvédelmi Mintaprogram (2008-) tapasztalatai (konklúziók és javaslatok). In: Veszélyeztetett lápi halak megóvása (lápi póc, rétcsík, széles kárász) (második, módosított kiadás). (Szerk.: Müller T., Urbányi B., Staszny Á.). Vármédia Print Kft., Gödöllő, 37-90. p.
- THOLKE, E.K., MCELROY, W.D., MCBRIDE, R.S. (2019): Spermatogenesis, reproductive maturation, and spawning seasonality of male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*: Comparisons among fishery stocks. *Fisheries Research*, 214: 85–97. p.
- THURSTON, L.M., HOLT, W.V., WATSON, P.F. (2003): Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, 60(1): 101–113. p.
- TIAINEN, J., OLIN, M., LEHTONEN, H., NYBERG, K., RUUHIJÄRBI, J. (2017): The capability of harvestable slot-length limit regulation in conserving large and old northern pike (*Esox lucius*). *Boreal Environment Research*, 22: 169–186. p.
- TIBBLIN, P., FORSMAN, A., KOCH-SCHMIDT, P., NORDAHL, O., JOHANNESSEN, P., NILSSON, J., LARSSON, P. (2015): Evolutionary divergence of adult body size and juvenile growth in sympatric subpopulations of a top predator in aquatic ecosystems. *The American Naturalist*, 186(1): 98–110. p.
- TIERSCH, T.R. (2001): Cryopreservation in aquarium fishes. *Marine Biotechnology*, 3: S212–S223., 12. p.
- TIERSCH, T.R. (2008): Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37: 15-19. p.
- TIERSCH, T.R., GREEN, C.C. (2011): III. Basics of cryopreservation In: Cryopreservation in aquatic species, 2nd Edition. (Eds: T.R. Tiersch, T.R., Mazik, P.M.). 273-290. p.
- TORRES, L., HU, E., TIERSCH, T.R. (2016): Cryopreservation in fish: current status and pathways to quality assurance and quality control in repository development. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(8): 1105. p.
- TRABELSI, A., GARDEUR, J-N., AYADI, H., FONTAINE, P. (2015): Effect of spawning time on egg quality, larval morphometrics and survival of northern pike *Esox lucius*. *Cybium*, 39(2): 91-98. p.
- TSVETKOVA, L.I., COSSON, J., LINHART, O., BILLARD, R. (1996): Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser Baeri* and *A. ruthenus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 12(2): 107–112. p.

- ULLOA-RODRÍGUEZ, P., FIGUEROA, E., DÍAZ, R., LEE-ESTEVEZ, M., SHORT, S., FARÍAS, J.G. (2017): Mitochondria in teleost spermatozoa. *Mitochondrion*, 34: 49-55. p.
- URBÁNYI, B. (2011): Egyes gazdasági haszonhalaink hímivartermékeinek mélyhűtése, a technológia standardizálásának kidolgozása és gyakorlati alkalmazása. MTA Doktori értekezés, Gödöllő, 119. p.
- URIBE, M.C., GRIER, H.J., MEJÍA-ROA, V. (2014): Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*, 4(3): e983400, 1-13. p.
- URIBE, M.C., GRIER, H.J., GARCÍA-ALARCÓN, A., PARENTI, L.R. (2016): Oogenesis: from oögonia to ovulation in the flagfish, *Jordanella floridae* Goode and Bean, 1879 (Teleostei: Cyprinodontidae). *Journal of Morphology*, 277(10): 1339–1354. p.
- VAN WIJK, S.J., TAYLOR, M.I., CREER, S., DREYER, C., RODRIGUES, F.M., RAMNARINE, I.W., VAN OOSTERHOUT, C., CARVALHO, G.R. (2013): Experimental harvesting of fish populations drives genetically based shifts in body size and maturation. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11: 181–187. p.
- VÁRKONYI, L., BOKOR, Z., FERINCZ, Á., STASZNY, Á., FODOR, F., SZÁRI, ZS., URBÁNYI, B., MOLNÁR, J., BERNÁTH, G. (2018): The applicability of 10 ml cryotubes for sperm cryopreservation in a Hungarian carp landrace (*Cyprinus carpio carpio morpha accuminatus*). *Acta Agraria Debreceniensis*, 75: 93–97. p.
- VÁRKONYI, L., BOKOR, Z., MOLNÁR, J., FODOR, F., SZÁRI, ZS., FERINCZ, Á., STASZNY, Á., LÁNG, L.Z., CSORBAI, B., URBÁNYI, B., BERNÁTH, G. (2019): The comparison of two different extenders for the improvement of large-scale sperm cryopreservation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3): 639-645. 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 Veterinaria Brno*, 73: 247-252. p.
- VIRBICKAS, T., DEMENTAVIČIUS, D., RUBUTIS, S., VAITKUVIENĖ, D., DAGYS, M., TREINYS, R. (2021): Understanding recreational targets and ecological consequences: increased northern pike stocking reflected in top avian predator diet. *European Journal of Wildlife Research*, 67(1): 1-5. p.
- VIVEIROS, A.T.M., GODINHO, H.P. (2009): Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 137–150. p.
- VLADIĆ, T., JÄRVI, T. (1997): Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout - the effect of water temperature. *Journal of Fish Biology*, 50: 1088-1093. p.
- WARD, M.J. (2020): Evaluation of two formalin concentrations during yellow perch egg incubation. *Aquatic Science and Technology*, 8(1): 1-8. p.
- WESTERS, H., STICKNEY, R.R. (1993): Northern pike and muskellunge. In: Culture of Nonsalmonid Freshwater Fishes, 2nd edn. (Eds: Stickney, R.R., Wester, H.). CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, 199–214. p.
- WHEELER, P.A., THORGAARD, G.H. (1991): Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture*, 93: 95–100. p.
- WHITTINGHAM, D.G., LEIBO, S.P., MAZUR, P. (1972): Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*, 178: 411-414. p.
- WILSON-LEEDY, J.G., INGERMANN, R.L. (2007): Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67(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.
- WOJTCZAK, M., DIETRICH, G.J., SLOWINSKA, M., DOBOSZ, S., KUZMINSKI, H., CIERESZKO, A. (2007): Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture*, 270: 259–264. p.
- WOLNICKI, J., GORNY, W. (1997): Effects of commercial dry diets and water temperature on growth and survival of northern pike, *Esox lucius* L., larvae. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 44: 377–383. p.
- WOYNÁROVICH, E., WOYNÁROVICH, A. (1980): Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. *Aquacultura Hungarica*, 2: 19–21. p.
- WRIGHT, R.M., SHOESMITH, E.A. (1988): The reproductive success of pike, *Esox lucius*: aspects of fecundity, egg density and survival. *Journal of Fish Biology*, 33(4): 623–636. p.
- XIN, M., SIDDIQUE, M.A.M., DZYUBA, B., CUEVAS-URIBE, R., SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A., LINHART, O. (2017): Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. *Theriogenology*, 98: 16–22. p.
- XIN, M., NIKSITAR, H., SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A., SUDDIQUE, M.A.M. (2020): Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. *Reviews in Aquaculture*, 12(2): 909–924. p.
- YANES-ROCA, C., RHODY, N., NYSTROM, M., MAIN, K.L. (2008): Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture*, 287: 335–340. p.
- YOSHIDA, M., ASTURIANO J.F. (2020): Reproduction in aquatic animals. Basic Biology to Aquaculture Technology. Springer, 1-379. p.
- ŻARSKI, D., RECHULICZ, J., KREJSZEFF, S., CZARKOWSKY, T.K., STANCZAK, K., PALINSKA, K., GRYZINSKA, M., TARGONSKA, K., KOZŁOWSKI, K., MAMCARZ, A., HLIWA, P. (2013): Ovarian alterations in wild northern pike *Esox lucius* females. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106: 49-56. p.
- ZHANG, J.J., LI, S.Z., TULAKE, K., YAN, Q.P., LI, W.J. (2011): The effects of extenders and sperm-egg ratios on fertilizing ability of cryopreserved testicular sperm of northern pike (*Esox lucius* L.). *Applied Ichthyology*, 2: 1037-1040. p.
- ZOHAR, Y., MYLONAS, C.C. (2001): Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136. p.
- Internetes forrásmunka:
 http1: <http://www2.dnr.cornell.edu/cek7/nyfish/Esocidae/muskellunge.jpg>

Jogszabályok:

A halgazdálkodás és a halvédelem egyes szabályainak megállapításáról szóló 133/2013. (XII. 29.) számú Vidékfejlesztési Minisztérium rendelet 9. melléklete szerint az őshonos, fogható halfajok fajlagos tilalmi ideje, kifogható mérettartománya, valamint a horgászatra és a rekreációs célú halászatra vonatkozó napi és éves kifogható darabszáma.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőimnek, **Dr. Bokor Zoltánnak** és **Dr. Bernáth Gergelynek**, akik mentorálása nélkül nem születhetett volna meg a doktori munkám. Mindenképp ki kell emelni az oktatási és nevelési képességeiket, amellyel támogatták tudományos és szakmai fejlődésemet. Bármikor segítségre volt szükségem, idejüket és energiájukat nem sajnálva segítettek.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Urbányi Béla** Professzor úrnak, aki teret és támogatást nyújtott a MATE-AKI Halgazdálkodási Tanszékén (korábban a SZIE Halgazdálkodási Tanszékén) kutatásaim számára.

Köszönet illeti a Szegedfish Kft. munkatársait, különösen **Füzes-Solymosi Enikőt**, hogy vizsgálataimat elvégezhettem a keltetőházukban, és végig támogattak a kísérletek végrehajtásában.

Köszönettel tartozom **Dr. Várkonyi Leventének**, akivel egy kutatócsoportban dolgozva bevezetett az intenzív haltartás rejtelseibe, valamint felsőbb éves PhD hallgatóként számtalanszor segédkezett a doktori képzés és a kutatómunka nehézségeiben.

Hálámat fejezem ki **Dr. Csorbai Balázsnak**, aki halszaporítási tanácsaival számos alkalommal előrelendítette a szaporítási és nevelési kísérleteim véghezvitelét, valamint **Dr. Szabó Tamásnak**, aki irányítása mellett gyakorlati tapasztalatot szerezhettem a csuka keltetőházi szaporításában. Szaporítási kísérleteim tervezésében és kivitelezésében rengeteg tanáccsal járult hozzá a dolgozat minőségének emeléséhez.

Köszönetet mondok **Nagy Borbála** PhD hallgatónak, aki számtalanszor vett részt a kísérletek gyakorlati kivitelezésében.

Hálámat szeretném kifejezni továbbá a kutatócsoportunkban dolgozó BSc és MSc hallgatóknak, volt munkatársaknak. A labor és terepi munkákon való részvételük nélkül nem működtek volna a vizsgálatok, név szerint: **Izsák Tibor, Láng Levente Zete, Bartucz Tamás, Csókás Endre, Takács Ádám, Birkó-Sulyok Zita**.

Köszönetet mondok **Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak** a lárvamorfológiai vizsgálatok fényképezésében és a deformitások azonosításában, valamint **Dr. Staszny Ádámnak** a statisztikai eredmények kiértékelésében nyújtott tanácsaiért.

Rendkívül hálás vagyok **Tóth-Fülöp Katalinnak** az angol nyelvű lektorálásáért, amivel szintén emelte a dolgozatom színvonalát.

Végezetül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a **Családomnak, Fanni feleségemnek, Édesapámnak, Mamámnak és Orsolya nővéremnek** azt a mérhetetlen támogatást minden téren, amit a doktori képzés alatt kaptam tőlük.