



GAZDASÁGI JELENTŐSÉGGEL BÍRÓ ARANYHAL VÁLTOZATOK SZAPORODÁSBIOLOGIAI VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Nagy Borbála

Gödöllő

2026.

A doktori iskola

megnevezése: Agrár- és Élelmiszertudományok Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Prof. Dr. Kovács Melinda

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani
Intézet

Témavezetők: Dr. Bernáth Gergely

kutatóprofesszor

Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar,
Állattudományi Tanszék

Dr. Bokor Zoltán

ügyvezető-helyettes

The Fishmarket Halkereskedelmi Kft.

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

.....

A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Ábrajegyzék	6
Táblázatjegyzék	8
Jelölések, rövidítések jegyzéke	10
1. Bevezetés	12
2. Célkitűzések	14
3. Irodalmi áttekintés	16
3.1. Az aranyhal jelentősége	16
3.1.1. Tudományos jelentőség	16
3.1.2. Kulturális jelentőség	16
3.1.3. Gazdasági jelentőség	17
3.2. Az aranyhal rendszertani besorolása	18
3.3. Az aranyhal eredete	18
3.3.1. Származás	18
3.3.2. Teljes genom duplikáció	19
3.4. A vizsgált aranyhal változatok	20
3.4.1. Közöséges aranyhal	21
3.4.2. Shubunkin	22
3.4.3. Fekete teleszkópszemű aranyhal	23
3.4.4. Oranda	24
3.5. Az aranyhal szaporodásbiológiája	26
3.5.1. A petefészek felépítése és a petesejtek fejlődése	26
3.5.2. A here felépítése és a hímivarsejtek fejlődése	27
3.6. Szaporodásbiológiai mutatók	27
3.6.1. Női- és hímivarsejt minőségi mutatók	27
3.6.2. A gonado-szomatikus index és szövettan	34

3.6.3.	Az RLN3 géncsalád szerepe a hímivarú csontos halak reprodukciós szabályozásában.....	34
3.7.	Az aranyhal szaporítása és lárvanevelése.....	35
3.8.	Az aranyhal embrionális- és lárv fejlődése	36
4.	Anyag és módszer	39
4.1.	A kísérleti állomány tartása és kezelése	39
4.1.1.	A kísérleti állomány tartása	39
4.1.2.	A kísérleti állomány kezelése	40
4.2.	Kísérleti terv	41
4.3.	Adatfeldolgozás és statisztikai programok.....	41
4.4.	Ivarsejtminőség vizsgálat és lárvanevelés.....	42
4.4.1.	Spermaminőség meghatározás	42
4.4.2.	Ikraminőség meghatározás és szaporítási vizsgálat	44
4.4.3.	Lárvafejlődési vizsgálat.....	46
4.5.	A sperma mikrobiótájának vizsgálata	48
4.5.1.	Rövidtávú tárolás.....	48
4.5.2.	Hosszútávú tárolás.....	49
4.5.3.	Izolált törzsek identifikációja	50
4.6.	Szövetteni elemzés	53
4.7.	Génexpresszó meghatározás RT-qPCR segítségével.....	55
5.	Eredmények és azok megbeszélése	57
5.1.	Az ivarsejtminőség és lárvafejlődés vizsgálat eredményei és azok megbeszélése.....	57
5.1.1.	Spermaminőség meghatározás eredményei	57
5.1.2.	Spermaminőség meghatározás eredményeinek megbeszélése.....	59
5.1.3.	Ikraminőség meghatározás és szaporítási vizsgálat eredményei.....	62
5.1.4.	Ikraminőség meghatározás és szaporítási vizsgálat eredményeinek megbeszélése	63
5.1.5.	Lárvafejlődési vizsgálat eredményei.....	64

5.1.6.	Lárvafejlődési vizsgálat eredményeinek megbeszélése	68
5.2.	A sperma mikrobióta vizsgálatának eredményei és azok megbeszélése.....	69
5.2.1.	Rövid távú tárolás eredményei.....	69
5.2.2.	Rövidtávú tárolás eredményeinek megbeszélése	72
5.2.3.	Hosszútávú tárolás eredményei.....	74
5.2.4.	Hosszútávú tárolás eredményeinek megbeszélése	77
5.3.	A szövettani vizsgálat eredményei	79
5.4.	A szövettani vizsgálat eredményeinek megbeszélése	81
5.5.	A génexpresszió meghatározás eredményei.....	83
5.6.	A génexpresszió meghatározás eredményeinek megbeszélése	84
6.	Következtetések és javaslatok.....	86
6.1.	Következtetések	86
6.2.	Javaslatok	88
6.2.1.	Az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága	89
6.2.2.	A kutatás folytatásának lehetőségei.....	90
7.	Új tudományos eredmények	91
8.	Összefoglalás	92
9.	Summary	94
10.	Mellékletek	96
11.	Köszönetnyilvánítás.....	113

Ábrajegyzék

1. ábra. Az aranyhal evolúciója és a sugárúszójú halak teljes genom megkettőződése (WGD). Filogenetikai kapcsolatok az aranyhal és más sugarasúszójú halak között, valamint a WGD események (piros pontok). Valódi csontoshal-specifikus harmadik WGD (Teleost-specific third round – Ts3R); Ponty-specifikus negyedik WGD (Carp-specific fourth round – Cs4R), Lazacféle-specifikus negyedik WGD (Salmonid-specific fourth round – Ss4R) (Mya – million years ago: millió évvel ezelőtt) [Forrás: Omori & Kon (2019) ábrája alapján a szerző által szerkesztve].....	20
2. ábra. A közönséges aranyhal változat (Forrás: saját felvétel).	21
3. ábra. A shubunkin változat (Forrás: saját felvétel).....	23
4. ábra. A fekete teleszkópszemű aranyhal változat (Forrás: saját felvétel).....	24
5. ábra. Az oranda változat (Forrás: saját felvétel).....	25
6. ábra. A hímivartermék gyűjtése száraz fecskendőbe (Forrás: Dr. Bokor Zoltán).	41
7. ábra. Aranyhal sperma minőségi paramétereinek rögzítése CASA rendszerrel (Forrás: Dr. Várkonyi Levente).	43
8. ábra. Aranyhal lárvák sztereomikroszkóppal történő fényképezése fejlődési rendellenességek meghatározása céljából (Forrás: Dr. Molnár József).	47
9. ábra. A változatok spermamintái PDA+SZ táptalajon szélesztve, 25 °C-on, 5 napos inkubációt követően (Forrás: saját felvétel).	49
10. ábra. A négy aranyhal változat (közönséges aranyhal, shubunkin, fekete teleszkópszemű, oranda) elkülönítése lineáris diszkriminancia-analízissel (LDA) a spermaminőségi paraméterek (SV, SV/BD, pMOT, LIN, ALH) alapján.....	58
11. ábra. Az egyedek teljes testhossza 0, 3 és 10 dph fejlődési szakaszokban. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 40$ /változat/stádium). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$).	65
12. ábra. Az egyedek átlagos testtömege 0, 3 és 10 dph fejlődési szakaszokban. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 40$ /változat/stádium). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$).	66
13. ábra. A rögzített deformitások előfordulásának aránya a négy változatban 0, 3 és 10 dph fejlődési szakaszokban ($N = 20$ /változat/stádium). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$).	67
14. ábra. A négy aranyhalváltozat lineáris diszkriminancia-analízis (LDA) alapú elkülönülése a leggyakoribb deformitástípusok (állkapocs-, notochord- és úszódeformitások), valamint a teljes deformitási arány alapján.	67
15. ábra. A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) 0 és 96 óránál, <i>Aeromonas</i> (AER) és TSA táptalajokon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmikus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3$ /változat). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek az egyes változatokon belül az időpontok között a két vizsgált táptalajon ($p < 0,05$).	70
16. ábra. A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) 0 és 96 óránál, <i>Aeromonas</i> (AER) és TSA táptalajokon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmikus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3$ /változat). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek a változatok között azonos időpontban és táptalajon ($p < 0,05$).	70

17. **ábra.** A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok spermamintáiban a rövid távú tárolás során 0 óránál ($N = 3$ /változat). A piros pont szterptomycin rezisztens, míg a zöld pont a gentamicin rezisztens fajok nemzetségeit jelölik.
..... 71
18. **ábra.** A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok spermamintáiban a rövid távú tárolás során 96 óránál ($N = 3$ /változat). A piros pont a sztreptomycin, míg a zöld pont a gentamicin rezisztens fajok nemzetségeit jelöli. 72
19. **ábra.** A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) friss és mélyhűtött mintákban TSA táptalajon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmikus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3$ /változat). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek a változatok között azonos időpontban ($p < 0,05$). 75
20. **ábra.** A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) friss és mélyhűtött mintákban TSA táptalajon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmikus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3$ /változat). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek az egyes változatokon belül az időpontok között ($p < 0,05$). 75
21. **ábra.** A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok friss spermamintáiban a hosszú távú tárolást megelőzően ($N = 3$ /változat). 76
22. **ábra.** A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok spermamintáiban az 5 hónapos tárolást követően felolvasztott mintákba ($N = 3$ /változat). 77
23. **ábra.** Az oogenezis érési szakaszaiban lévő sejtek aránya a négy változat esetén. Perinukleoláris stádium (PN), kortikális alveolus stádium (KA), vitellogenikus stádium (V), érett stádium (É), atretikus állapot (ÁÁ). Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 6$, shubunkin $N = 5$, fekete teleszkópszemű $N = 5$, oranda $N = 5$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$). 80
24. **ábra.** A spermatogenezis érési szakaszaiban lévő sejtek és szövetek aránya a négy változat esetén. Spermatogonium A (SG A), spermatogonium B (SG B), spermatocita (SC), spermatida (ST), spermium (S), üres lumen (ÜL), kötőszövet (KSZ). Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 5$ /változat). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott stádiumon belül ($p < 0,05$). 81
25. **ábra.** A *rln3a* gén RT-qPCR által kifejeződése a változatok agyszöveiben. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 5$ /változat). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0,05$). 83
26. **ábra.** A *rln3a* gén RT-qPCR által meghatározott kifejeződése a változatok here szöveteiben. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 5$ /változat). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0,05$). 84

Táblázatjegyzék

1. táblázat. A szimpla és az ikerfarkú aranyhal embrió fejlődési stádiumainak összevetése (Li et al., 2019; Ota, 2021d).....	38
2. táblázat. A vizsgálatokban használt állomány testparaméterei. A változatonkénti mintaelemszámok (ikrás; tejes): közönséges aranyhal $N = 14$; 26, shubunkin $N = 14$; 27, fekete teleszkópszemű $N = 12$; 26 és oranda $N = 13$; 26. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.....	40
3. táblázat. A sperma minőségi vizsgálatban használt tejes állomány testparaméterei A változatonkénti mintaelemszámok: közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 7$, fekete teleszkópszemű $N = 8$ és oranda $N = 8$. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.	42
4. táblázat. A szaporítási és az ikra minőségi vizsgálatokban használt állomány testparaméterei. A változatonkénti mintaelemszámok (ikrás; tejes): közönséges aranyhal $N = 8$; 7, shubunkin $N = 9$; 9, fekete teleszkópszemű $N = 7$; 7 és oranda $N = 8$; 7. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.	45
5. táblázat. A mikrobiológiai vizsgálatokban használt állomány testparaméterei. A vizsgálatonkénti mintaelemszám: $N = 3$ /változat. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.	48
6. táblázat. A szövettani és génexpressziós vizsgálatokban felhasznált állomány testparaméterei. A változatonkénti mintaelemszámok (ikrás; tejes): közönséges aranyhal $N = 6$; 5, shubunkin $N = 5$; 5, fekete teleszkópszemű $N = 5$; 5 és oranda $N = 5$; 5. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek.....	56
7. táblázat. A real-time PCR vizsgálatához használt gének és a hozzájuk tartozó primerek.	56
8. táblázat. A négy aranyhal változat alap spermatológiai paraméterei. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 8$, fekete teleszkópszemű $N = 8$, oranda $N = 8$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).	57
9. táblázat. A négy változat CASA rendszerrel mért sperma motilitási és kinetikai paraméterei. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 8$, fekete teleszkópszemű $N = 8$, oranda $N = 8$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).	58
10. táblázat. A négy változat, szaporítás során használt, CASA rendszerrel mért sperma motilitási és kinetikai paraméterei. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 7$, shubunkin $N = 9$, fekete teleszkópszemű $N = 7$, oranda $N = 7$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$). ..	59
11. táblázat. A négy változat ikrás egyedeinek alap szaporodásbiológiai paraméterei. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 9$, fekete teleszkópszemű $N = 7$, oranda $N = 8$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).	62
12. táblázat. A termékenyülési (közönséges aranyhal $N = 182$, shubunkin $N = 203$, fekete teleszkópszemű $N = 176$, oranda $N = 167$), és kelési (közönséges aranyhal $N = 180$, shubunkin $N = 190$, fekete teleszkópszemű $N = 130$, oranda $N = 152$) arány a négy aranyhal változatban. Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).	62

- 13. táblázat.** A megmaradási arány a négy aranyhal változatban ($N = 1000/\text{változat}$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$)..... 68
- 14. táblázat.** A négy változat CASA rendszerrel mért sperma motilitási és kinetikai értékei mélyhűtést megelőzően és 5 hónappal azt követően. Az adatok átlag $\pm$ szórás értékeket jelölnek ($N = 3/\text{változat}$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek a változatok között azonos időpontban, valamint az egyes változatokon belül az időpontok között ($p < 0,05$)..... 74
- 15. táblázat.** A szövettani és génexpressziós vizsgálatokhoz felhasznált állomány gonadoszomatikus indexe (GSI). Az adatok átlag $\pm$ szórás értékeket jelölnek (ikrás; tejes: közösleges aranyhal $N = 6; 5$, shubunkin $N = 5; 5$, fekete teleszkópszemű $N = 5; 5$, oranda $N = 5; 5$). Az eltérő betűk az ivaron belül a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0,05$). 79

Jelölések, rövidítések jegyzéke

AÁ	Atretikus állapot
AER	<i>Aeromonas</i> agar
ALH	Amplitude lateral head displacement (a fej oldalirányú kitérésének átlagos nagysága)
BCF	Beat cross frequency (a fej kilengésének frekvenciája)
BSA	Bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)
CASA	Computer-assisted Sperm Analysis (számítógépes spermavizsgáló rendszer)
CFU	Colony-forming unit (telepképző egység)
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DPH	Days post-hatching (keléstől számított napok)
É	Érett stádium
KA	Kortikális alveolus stádium
KSZ	Kötőszövet
LH	Luteinizáló hormon
LIN	Linearity (a hímivarsejt ténylegesen megtett mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése)
FSH	Follikulusstimuláló hormon
G	Gentamicin
GSI	Gonado-szomatikus index
HPF	Hours post fertilization (termékenyüléstől számított órák)
HPG	Hipotalamusz-hipofízis-gonád
MH	Mueller–Hinton agar
MOT	Motilitás
PBS	Phosphate-buffered saline (foszfáttal pufferolt sóoldat)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz-láncreakció)
PDA	Potato dextrose agar (burgonya dextróz agar)
PGSI	Pszedo-gonado-szomatikus index
PLC	Programmable logic controller (programozható logikai vezérlő)
pMOT	Progressive motility (progresszív motilitás)
PN	Perinukleoláris stádium
RPM	Revolutions per minute (percenkénti fordulatszám)
S	Spermium
SB	Sodium borat (nátrium-borát)
SC	Spermatocita
SG	Spermatogónium
ST	Spermatida
STR	Straightness (a hímivarsejt átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése)
SZ	Sztreptomycin
SV	Sperm volume (spermamennyiség)

SV/BW	Sperm volume/body weight (testtömeg kilogrammra vonatkoztatott spermamennyiség)
TSA	Tryptone soy agar (tripton-szója agar)
ÜL	Üres lumen
V	Vitellogenikus stádium
VAP	Average path velocity (a hímivarsejt sebessége mozgásának átlagolt útvonalára számolva)
VCL	Curvilinear velocity (a hímivarsejt sebessége a ténylegesen megtett, teljes mozgási útvonalára számolva)
VSL	Straight line velocity (a hímivarsejt sebessége mozgásának kiindulási és végpontja közötti távolságra számolva (progresszív sebesség))
WOB	Wobble (a hímivarsejt teljes mozgási útvonalának az átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése)

1. Bevezetés

A *Cyprinidae* családba tartozó aranyhal (*Carassius auratus*) az egyik legszélesebb körben tanulmányozott halfaj, mely rendkívüli kulturális jelentőséggel bír, ezen felül gazdasági szempontból meghatározó szerepet tölt be az édesvízi akvakultúrában. Népszerűségét az évszázadokon át tartó mesterséges szelekciónak köszönheti, amely rendkívüli fenotípusos változatosság kialakulásához vezetett (Smartt, 2001; Omori & Kon, 2019; Chen et al., 2022). A faj domesztikációja mintegy 1000 évvel ezelőtt kezdődött Dél-Kínában, és ennek eredményeként napjainkra több mint 180 változat alakult ki (Omori & Kon, 2019), de a tenyésztők és az akvaristák a mai napig újabb és újabb változatokat hoznak létre. Egyedi jellemzői miatt kiváló modellorganizmus a mesterséges szelekció és a fejlődésbiológia tanulmányozására (Smartt, 2001; Komiyama et al., 2009; Tsai et al., 2013; Ota & Abe, 2016; Chen et al., 2019). A faj olyan kivételes morfológiai bélyegekkkel rendelkezik a testalak, a színezet, a pikkelyek, de az úszók, a szemek és a fejforma vonatkozásában is, amelyek nem figyelhetők meg a zebradánió (*Danio rerio*) vagy a medaka (*Oryzias latipes*) egyes változatainál (Omori & Kon, 2019). Az aranyhal szaporítása hormonális indukálás alkalmazásával történik, melynek következtében nagyszámú utód nyerhető egyetlen anyától. A szelekción alapuló tenyésztés optimalizálása javítaná a halak minőségét és értékét, valamint növelné a különböző fenotípusos jellemzők öröklődéséről rendelkezésre álló ismereteket. Ennek érdekében kulcsfontosságú a stabil házasított vonalak létrehozása és fenntartása (Glenn et al., 2011). A halak szaporításának sikerességét alapvetően befolyásolja az anyajelöltek megfelelő kiválasztása, az anyaállomány takarmányozása, a vitellogenezist és spermatogenezist megelőző, illetve az ezen folyamatok alatti környezeti feltételek optimalizálása, a szaporításhoz szükséges tér és populáció biztosítása, valamint az alkalmazott hormonális kezelés (Mañanos et al., 2009). Emellett a termékenységet befolyásoló paraméterek szisztematikus mennyiségi és minőségi értékelése elengedhetetlen a szaporítás hatékonyságának növelése érdekében (Fauvel et al., 2010). Halak esetén a sperma minőségének vizsgálata egy részről lehetővé teszi a termelés optimalizálását, más részről információt nyújt a környezeti hatásokról. A kutatók az elmúlt évtizedekben számos értékelési módszert dolgoztak ki, a gonado-szomatikus index (GSI) meghatározása mellett az ivarszervek szövettani elemzése pontos képet fest az ivarsejtek érésének állapotáról és információt ad a külső tényezők spermatogenezisre, valamint oogenezisre gyakorolt hatásairól (Kagawa et al., 1983). A motilitás mellett a sperma koncentrációja és térfogata, valamint a szeminális plazma pH-ja és ozmolalitása is gyakran mért minőségi mutatók (Kowalski & Cejko, 2019). Aranyhalak esetében számos kutatás vizsgálta ezen mutatókat különféle összefüggésekben, ideértve a takarmányozást, a környezeti és hormonális hatásokat, valamint az ivartermék kezelését (Bozkurt, 2006; Tarkhani et al., 2012; Zadmajid et al.,

2013; Tizkar et al., 2015; Kutluyer et al., 2016; Bernáth et al., 2017; Depincé et al., 2020; Seyedi et al., 2021). Az ikra minőségét az határozza meg, hogy képes-e termékenyülni, majd egészséges embrióvá és lárvává fejlődni (Bobe & Labbé, 2010; Bobe, 2015). Az embrionális fejlődés bizonyos stádiumaiban elvégzett vizsgálatok információt nyújthatnak a felhasznált ivartermék minőségéről, valamint lehetővé tehetik a termékenyült petesejtek fejlődésének nyomonkövetését. A morfológiai elváltozások előfordulása a korai fejlődési szakaszokban jelentkező fejlődési hibákat jelzi (Bonnet et al., 2007; Bobe & Labbé, 2010). Jó minőségű ivarterméknek az tekinthető, ami az embrionális fejlődés során magas arányú túlélést, kelést, valamint egészséges lárvafejlődést eredményez (Bonnet et al., 2007; Bobe & Labbé, 2010; Valdebenito et al., 2015). Az aranyhal különböző változatai közötti különbségeket számos tanulmány taglalja, az azokat létrehozó mesterséges szelekció hatását a szaporodásbiológiára azonban még nem vizsgálták átfogóan (Bernáth et al., 2017; Li et al., 2019).

Az akvakultúrában a sperma tárolása egyszerű és költséghatékony eljárás, a módszer lehetővé teszi a minták szállítását, azok minőségellenőrzését, valamint az *in vitro* szaporítást (Contreras et al., 2019). A tárolás során végzett vizsgálatok információt nyújtanak az egyedek ivartermékének potenciális termékenyítőképességéről, elősegítve a kiváló szaporodási mutatókkal rendelkező anyaállomány kialakítását. A mélyhűtve történő tárolás továbbá szerves részét képezheti a szelekciós programoknak az értékes egyedek genetikai állományának megőrzésével. Ugyanakkor a tárolás során végbemenő mikrobiális változások jelentős mértékben befolyásolhatják a szaporítás során felhasználni kívánt ivartermék minőségét. Bár az elmúlt években nagymértékű előrehaladás történt a mikrobiom kutatás területén (Foo et al., 2017), ennek ellenére halak esetén korlátozott számú tanulmány áll rendelkezésre az ivarsejtek, azon belül is a hímivartermék mikrobiális közösségéről, valamint annak változásairól. Aranyhal esetén jelenleg nem ismert a sperma baktérium- és gombaközössége, aminek vizsgálata mind állatjóléti, mind szaporodásbiológiai szempontból indokolt.

Feltételezésem szerint a különböző szelekciós célok mentén kialakult fenotípusos sajátosságok nemcsak a külső megjelenésben, hanem a változatok reprodukciós mutatóiban és korai fejlődésében is megnyilvánulhatnak. A jelenlegi szakirodalomban azonban nem találtam olyan átfogó szaporodásbiológiai tanulmányt, amely több aranyhalváltozat összehasonlító vizsgálatát tartalmazná.

2. Célkitűzések

Munkám célja a fenotípusukban jelentősen eltérő aranyhal változatok, azon belül a közönséges aranyhal, a shubunkin, a fekete teleszkópszemű és az oranda szaporodásbiológiai sajátosságainak komplex vizsgálata volt. A változatok összehasonlítása választ adhat arra, hogy a morfológiában megfigyelhető markáns különbség a szaporodásbiológiai tulajdonságokban egyaránt megnyilvánul-e. Kísérleteim kiterjedtek az ivartermék értékelésre, a termékenyítési hatékonyság és az ivadékok vizsgálatára, valamint az ezeket befolyásoló molekuláris és mikrobiológiai tényezők felmérésére.

A négy aranyhal változaton végzett kutatás során kitűzött céljaim az alábbiak voltak:

1. Az alapvető szaporodásbiológiai mutatók mennyiségi és minőségi értékelése, valamint szaporítás során a termékenyülési és kelési arányok meghatározása és összehasonlítása a változatok között.
 - a. Spermavizsgálat során a teljes spermamennyiség (SV, μl), a testtömegre vonatkoztatott teljes spermamennyiség (SV/BW, $\mu\text{l}/\text{tkg}$), a sejtsűrűség (spz/ml), valamint a mozgási (pMOT, %) és kinetikai paraméterek (VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$; VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$; LIN, %; ALH, μm ; BCF, Hz) meghatározása és összehasonlítása.
 - b. Ikravizsgálat során a pseudo-gonado-szomatikus index (PGSI, %) és a grammonkénti ikraszám meghatározása és összehasonlítása.
 - c. Szaporítás során a termékenyülési (%) és kelési arány (%) meghatározása és összehasonlítása.
2. Lárvanevelés során a növekedés, egyes fejlődési rendellenességek arányának, valamint a megmaradási arányok meghatározása és összehasonlítása.
 - a. Lárva vizsgálat során a teljes testhossz (mm), a testtömeg (mg) és a fejlődési rendellenességek arányának (szomiták, notochord, farok, uszonyok, szív, feji régió, agy, állkapocs, bél) meghatározása keléskor, a szikzacskó felszívódását követően, valamint 10 napos táplálkozó lárvaállapotban.
 - b. A kelést követő 10. napon a megmaradási arány (%) meghatározása és összehasonlítása.
3. A hímivartermék mikrobiótájának feltérképezése, valamint összetételének vizsgálata rövid távú hűtött és mélyhűtött tárolás során.
 - a. A spermában található baktériumok telepkepző egységeinek (CFU/ml) meghatározása szelektív és nem szelektív táptalajokon, valamint az izolált

baktérium- és gombatörzsek egyedi azonosítása friss mintákból, illetve 96 órás 4 °C-on történő tárolást követően.

- b. A sperma baktériumtelepképző egységeinek számának (CFU/ml) meghatározása, valamint a sperma-, hígító- és olvasztóvíz-mintákból izolált baktériumok és gombák egyedi azonosítása friss, illetve -196 °C-on mélyhűtve tárolt mintákban.
4. A végső ivarsejtérés egyes érési stádiumainak megoszlásának és arányának meghatározása, valamint összehasonlítása a változatok között a spermiáció és ovuláció indukálását követően végzett szövettani vizsgálatok alapján.
 - a. A gonado-szomatikus index (GSI, %) meghatározása és összehasonlítása.
 - b. Az ivarsejtek és szöveti elemek arányának (%) meghatározása és összehasonlítása a változatok között a herében (spermatogónium A/B, spermatocita, spermatida, spermium sejtek, kötőszövet, üres lumen) és petefészekben (perinukleoláris, kortikális alveolus, vitellogenikus, érett, atretikus sejtek).
5. A spermatogenezisben kulcsszerepet játszó *rln3a* gén kifejeződésének vizsgálata és összehasonlítása a változatok között agy- és hereszövetben, a molekuláris szinten megjelenő különbségek feltárása érdekében.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az aranyhal jelentősége

3.1.1. Tudományos jelentőség

Az aranyhal (*Carassius auratus*) jól ismert házasított faj, amely számos díszhal változattal rendelkezik, melyeket genetikai mutációk által meghatározott, öröklődő fenotípusos tulajdonságok különböztetnek meg. A látványos megjelenésük miatt világszerte elterjedtek a tenyésztők és akvaristák jóvoltából, azonban az eredeti vonalakat évszázadokkal ezelőtt hozták létre Kínában (Ota, 2021a). Az aranyhal domesztikációjának és az abból fakadó morfológiai változatosságának köszönhetően a biológia számos területén értékes kutatási alannyá vált. Modellorganizmusként előszeretettel használják agytérképezési vizsgálatok, *in situ* hibridizáció, mikroarray-alapú elemzések, géncsendesítés (siRNS), génkiütés, szöveti perfúzió, valamint evolúció- és fejlődésbiológiai kutatások során. Széles körben használt modell az összehasonlító endokrinológiában, különösen a neuroendokrinológiában. Az elmúlt évtizedek során zajló kutatások sokféle eszközt fejlesztettek ki és validáltak különféle hormonok vizsgálatára a fajban (Blanco et al., 2018). Ennek eredményeként 1931-től napjainkig több, mint 2000 aranyhal agykutatással kapcsolatos irodalom lelhető fel. Az endokrinológia területén betöltött ideális modellorganizmus szerepe mellett az aranyhal az egyik leggyakrabban alkalmazott halfaj a viselkedéskutatásokban (Blanco et al., 2018). Kiváló modellként szolgál, továbbá a szív működés, az adaptációs mechanizmusok és a sérüléseket követő regeneráció vizsgálatára. Ennek oka, hogy rendkívül jól tűri a környezeti szélsőségeket, könnyen kezelhető, nagy mennyiségben és alacsony költséggel beszerezhető, viszonylag rövid élettartamú, genetikailag módosítható, valamint egyszerű szívfelépítéssel rendelkezik (Filice et al., 2022). Ezeket az előnyöket tovább erősíti az aranyhal teljes genomjának rendelkezésre állása (Chen et al., 2019), amely lehetőséget biztosít a gerincesekben fellelhető homológ gének funkciójának feltérképezésére (Omori & Kon, 2019).

3.1.2. Kulturális jelentőség

Az aranyhal, mint szimbólum a különböző kultúrákban eltérő jelentéssel bír, tükrözve azok értékeit, hiedelmeit és társadalmi hátterét. Kínában és Kelet-Ázsiában az aranyhalak régóta a gazdagság, a bőség és a harmónia szimbólumai. Előszeretettel tartják beltérben és ajándékozzák a jó szerencse reményében, különösen a *feng shui* alapelveivel összhangban. A díszhal, párban a házasság boldogságát jelképezi, ezáltal közkedvelt nászajándék. A kínai legendák szerint az aranyhal isteni ajándék, mely tovább erősíti szerencsét hozó státuszát (Burton, 2020). A 19. századi

brit és amerikai kultúrában az aranyhal a házas életmódot és a nőiességet szimbolizálta, gyakran az idealizált, otthonhoz kötött feleséget jelképezte. Később, amikor egzotikusabb változatok jelentek meg, az aranyhal a nemi szerepek és a társadalmi mobilitás változásainak metaforájává is vált (Zuhlke, 2024). A 19. század végén és a 20. század elején az aranyhalat az elit státuszszimbólumaként tartották számon az Egyesült Államokban, majd később a materializmus felszínességének jelképévé vált – „az arany csillogása belső érték nélkül” (Waycott, 2020). Indonéziában, a Toba Batak népnél az aranyhal (gyakran *arsik* nevű ételként) központi szerepet játszik olyan szertartásokban, mint az esküvők vagy más életfordulók. Itt az aranyhal a bőséget, a jó szerencsét és a kulturális örökséggel való mély kapcsolatot szimbolizálja (Lestari et al., 2023; Sertiawan & Dora, 2024).

3.1.3. Gazdasági jelentőség

A díszhaltenyésztés világszerte növekvő népszerűségnek örvend, az akváriumi halak tartásának elterjedése az 1970-es évektől évente átlagosan 14%-kal növekszik, egy korábbi tanulmány szerint évente több mint 1 milliárd egyeddel kereskednek nemzetközi szinten (Maceda-Veiga et al., 2016). A globális díszhal-kereskedelem értéke, beleértve az édesvízi és tengeri díszhalakat, valamint a kapcsolódó kiegészítő termékeket és szolgáltatásokat, megközelítőleg 15–30 milliárd amerikai dollárra tehető (Penning et al., 2009; Larcombe et al., 2024), mellyel jelentős gazdasági szerepet tölt be a globális akvakultúrában és a kereskedelemben (Hoseinifar et al., 2023; Larcombe et al., 2024). Ez a tevékenység több, mint 5300 édesvízi, valamint 1802 tengeri halfajt érint (Raghavan et al., 2013). Az aranyhal mintegy egy évtizeddel ezelőtt a globális díszhalpiacot meghatározó 30 faj egyikének számított (Dey, 2016), és iránta azóta is tartósan magas kereslet mutatkozik, különösen az Egyesült Államokban, Japánban, Kínában és Európában (Dey, 2016; Peh & Azra, 2025). A faj jelentős gazdasági értékkel bír a sokféleségéből fakadó népszerűségének köszönhetően (Pradhan & Maity, 2025). Az olyan tenyésztési újítások, mint a szín és különleges morfológiai bélyegre történő szelektív tenyésztés vagy a génszerkesztés tovább növelik az aranyhal gazdasági értékét azáltal, hogy új és keresett változatokat hoznak létre (Li et al., 2024a; Iskandar et al., 2024). Az aranyhal színezete és egészségi állapota kulcsfontosságú a piacképesség szempontjából. Gazdasági jelentősége ellenére az ágazat számos kihívással küzd, többek között a különféle betegségek megjelenésével, a szállításból eredő stresszhatásokkal, valamint a fenntartható termelési gyakorlatok hiányával. Ennek okán hosszú évek óta intenzív kutatások folynak a fenntartható és minőségjavító takarmányozás, a szaporítási technológia fejlesztésének, valamint a betegségek elleni védekezés területein (Andrews, 1990; Hoseinifar et al., 2023; Iskandar et al., 2024; Larcombe et al., 2024; Pradhan & Maity, 2025). Összességében a díszhal-ágazat, az aranyhal kiemelkedő szerepével, nemcsak jelentős bevételt és munkahelyeket teremt,

hanem ösztönzi az innovációt az akvakultúrában, és hozzájárul a vízi életközösségek társadalmi megismertetéséhez (Andrews, 1990; Chapman et al., 1997; Hoseinifar et al., 2023; Larcombe et al., 2024).

3.2. Az aranyhal rendszertani besorolása

Ország: Állatok (*Animalia*)

Törzs: Gerinchúrosok (*Chordata*)

Altörzs: Gerincesek (*Vertebrata*)

Főosztály: Csontos halak (*Osteichthyes*)

Osztály: Sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*)

Alosztály: Újúsúzóúak (*Neopterygii*)

Alosztályág: Valódi csontoshalak (*Teleostei*)

Rend: Pontyalakúak (*Cypriniformes*)

Család: Pontyfélék (*Cyprinidae*)

Nem: Kárász (*Carassius*)

Faj: Aranyhal (*Carassius auratus*) (ITIS, 2026)

3.3. Az aranyhal eredete

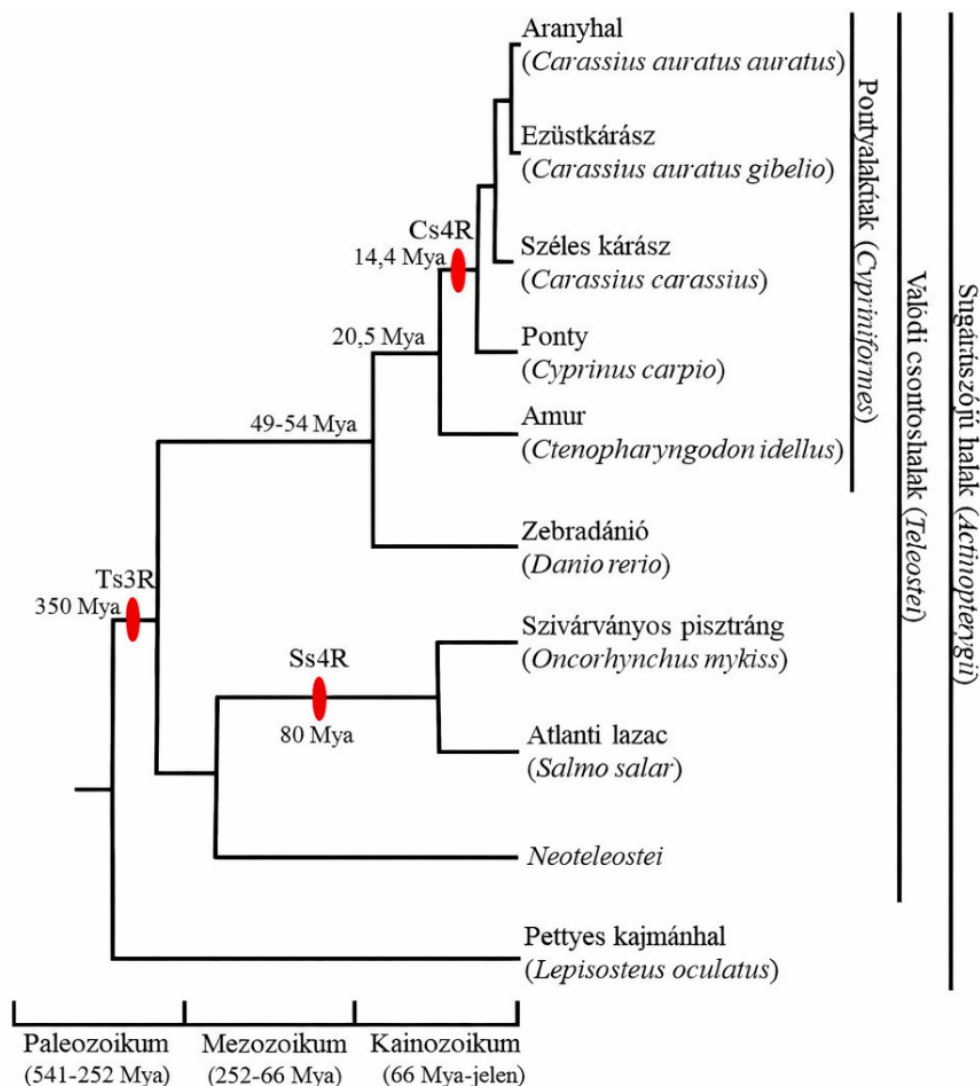
3.3.1. Származás

Az aranyhalat több mint ezer évvel ezelőtt Dél-Kínában, a Jangce folyó alsó folyásából származó vadon élő *Carassius auratus* házasításával alakították ki (Rylková et al., 2010; Chen et al., 2019; Wang et al., 2013). A történelmi feljegyzések arra utalnak, hogy az aranyhal elődeinek kis tavakban történő tartása valószínűleg a kínai Qin- (265–420) és Tang-dinasztia idején (618–907) kezdődött, amikor az emberek felfedezték és gyűjtötték a természetesen előforduló arany ill. vörös színmutációval rendelkező halakat. Míg a díszes aranyhalak széles körű és szisztematikus tenyésztése a Song-dinasztia idején (960–1279) erősödött meg (Smartt, 2001; Ota & Abe, 2016). Ez alapjául szolgált a későbbi dinasztiákban bekövetkezett intenzívebb és tudatosabb tenyésztési gyakorlatoknak. Az aranyhal változatossága nagyrészt a Ming-korszak második felében (1368–1644) alakult ki, ebben az időszakban több jellegzetes fenotípus, mint az ikerfarok, a hosszú úszók és a rövid test vált meghatározóvá. A mesterséges szelekció a tenyésztés révén a Qing-dinasztia kezdetén (1644–1912) indult el. A mutációk, beleértve a teleszkóp szemet, az átlátszó pikkelyeket és a hátúszó nélküli változatokat, valószínűleg ebben az időszakban jelentek meg (Smartt, 2001; Omori & Kon, 2019). Az aranyhalakat Kínából Japánba először feltehetőleg a Muromacsi-korszakban (1338–1573) exportálták. Japánban több aranyhal változatot, köztük a Tosakint és a

Jikint is az Edo-korszak idején (1603–1867) tenyésztették ki. Ezenkívül az elmúlt évtizedek során az ezen jellemző fenotípusokkal rendelkező vonalak keresztezését használták számos új vonal létrehozására (Omori & Kon, 2019). A modern genomikai kutatások megerősítették, hogy az aranyhal komplex genetikai háttérrel rendelkezik, ami többek között az ősi hibridizációs eseményeknek és a genomduplikációnak köszönhető, figyelemre méltó diverzitást eredményezve ezzel (Braasch, 2020; Chen et al., 2020; Wang et al., 2020).

3.3.2. Teljes genom duplikáció

A teljes genom megkettőződésének (WGD) eseményei (1. ábra), vagyis egy faj teljes genomjának megduplázódása jelentős hatással lehetett a fajok diverzitására, a biológiai komplexitás növekedésére, valamint az evolúciós jelentőségű változások kialakulására (Van de Peer et al., 2009). A valódi csontos halak (*Teleostei*) legalább három WGD eseményen mentek keresztül, az első (1R) és a második (2R) még a fejlettebb állkapcsos és állkapocs nélküli gerincesek szétválása előtt következett be, míg a harmadik, a valódi csontos halakat érintő WGD, Ts3R, körülbelül 285,8–266,77 millió évvel ezelőtt történt (Qi et al., 2024). Gerinceseknél a legutóbbi genom megkettőződés az aranyhalban, valamint a pontyban zajlott le körülbelül 8–14 millió évvel ezelőtt. Ez a folyamat két olyan algenomot eredményezett, amelyek nagymértékű hasonlóságot és génsorrendet őriztek meg, ugyanakkor génvesztést, valamint bizonyos gének kifejeződésének jelentős eltérését eredményezte (Kon et al., 2020). A megmaradt, duplikált gének körülbelül 30%-a eltérő aktivitást mutat a különböző szövetekben. Bizonyos gének elvesztése és a megmaradt gének kifejeződésbeli eltérései szerepet játszanak az aranyhal testformái, színei és egyéb tulajdonságai széles változatosságában (Chen et al., 2019). Mivel az aranyhal több WGD-körön esett át, mint a zebradánió, és a duplikált gének gyakran összefüggésben állnak a növekedéssel és a fejlődéssel, így az aranyhal értékes modell a genom evolúciójának, a gerincesek fejlődésének, sőt az emberi betegségek tanulmányozására is (Kuang et al., 2016). Genomjának ismerete és a genetikai térképek elérhetősége lehetővé teszi a kutatók számára, hogy genetikai módosulásokat kapcsoljanak az évszázados szelektív tenyésztés során létrejött fenotípusos sokféleséghez. Emellett lehetőséget biztosít a genomduplikáció evolúciós innovációban betöltött szerepének vizsgálatára is (Kuang et al., 2016; Chen et al., 2019; Kon et al., 2020).



1. ábra. Az aranyhal evolúciója és a sugárúszójú halak teljes genom megkettőződése (WGD). Filogenetikai kapcsolatok az aranyhal és más sugárúszójú halak között, valamint a WGD események (piros pontok). Valódi csontosshal-specifikus harmadik WGD (Teleost-specific third round – Ts3R); Ponty-specifikus negyedik WGD (Carp-specific fourth round – Cs4R), Lazacféle-specifikus negyedik WGD (Salmonid-specific fourth round – Ss4R) (Mya – million years ago: millió évvel ezelőtt) [Forrás: Omori & Kon (2019) ábrája alapján a szerző által szerkesztve].

3.4. A vizsgált aranyhal változatok

Az aranyhal a legváltozatosabb díszhalfajok egyike, az olyan változatok, mint a közönséges aranyhal, a shubunkin, az oranda vagy a fekete teleszkópszemű évszázadokon át tartó szelektív tenyésztés eredményeként jöttek létre. Ezek a változatok testformában, színezetben, úszószerkezetben és genetikai háttérükben is különböznek egymástól, így modellként alkalmazhatók a mesterséges szelekció és a morfológiai sokféleség tanulmányozásához (Ota & Abe, 2016).

3.4.1. Közöséges aranyhal

A vad őshöz legközelebb álló aranyhal-változat az úgynevezett közöséges vagy vad típusú aranyhal (common goldfish, single-tail goldfish) (2. ábra), amely testfelépítésében és úszóiban nagyrészt megőrizte az ősalak jellegzetességeit, de színezete már jelentősen eltér (Omori & Kon, 2019). Emiatt ezt a változatot gyakran tekintik kiindulópontnak, ha a különböző, eltérő morfológiájú tenyésztett változatokat kívánják összehasonlítani (Ota, 2021d).



2. ábra. A közöséges aranyhal változat (Forrás: saját felvétel).

A test megnyúlt és oldalról lapított, mélysége a teljes testhossz körülbelül háromhated-háromnyolcad része. A hát- és a farok alatti úszó szimpla, a mell- és a hasúszó páros, a farokúszó pedig szintén szimpla, amelynek kiterjedése nagyjából megegyezik a testmélységgel, lebenyei a testhossz körülbelül egynegyedét teszik ki, végük enyhén lekerekített. A hátúszó magassága a testmélység mintegy háromnyolcadának felel meg, a test kontúrjai pedig simák és egyenletesek, hasonlóan a vad típushoz. A közöséges aranyhal leggyakrabban vörös vagy narancs árnyalatban jelenik meg, ritkábban sárga, míg az ezüstös és fehér példányokat kevésbé értékelik, bár piros úszókkal kombinálva ezek is látványosak lehetnek. Időnként kék, barna vagy fekete példányok is előfordulnak, de ezek kevésbé mutatósak a kerti tavakban, ahol beleolvadnak környezetükbe (Smartt, 2001). A tarka mintázatok széles skálán változnak: különösen népszerű a vörös-fehér kombináció, míg a vörös-fekete átmenetinek tekinthető, mivel a fekete pigment rendszerint fokozatosan eltűnik, így a hal idővel teljesen vörössé válik. A színek kialakulásának alapja két fő pigment – a fekete melanin és a sárgás-narancs xantin – megléte vagy hiánya, illetve ezek aránya

és eloszlása. A guanin kristályos lerakódása egy speciális pigment sejt típusban, az iridofórokban, a pikkelyek fényvisszaverő képességét eredményezi, mely csillogó kültakarót kölcsönöz a halaknak (Smartt, 2001; Ota, 2021e). A színek öröklődése azonban gyakran problémát jelent a tenyésztők számára, mivel a közönséges aranyhal hajlamos a vad színezet megjelenítésére. Aranyhal esetén a depigmentáció, amely xantikus (vörös, narancs, sárga) színezet kialakulásához vezet, két domináns lokusz, a *Dp1* és *Dp2* működésén alapul. A domináns allélek biztosítják a színes egyedek megjelenését, de ha egyik domináns allél sem rögzült az anyaállományban, akkor jelentős számban fordulhatnak elő vad színezetű utódok, vagyis *dp1/dp1* és *dp2/dp2* genotípusú egyedek (Kajishima, 1977; Smartt, 2001; Omori & Kon, 2019). Más pontyfélék esetén a xantikus mutáció recesszív öröklődést mutat (Kelsh et al., 1996; Kottler et al., 2013; Omori & Kon, 2019). Bár a közönséges aranyhal a kiállításokon gyakran kevésbé értékelt, a tökéletes példányokat rendkívül nagy becsben tartják (Smartt, 2001).

3.4.2. Shubunkin

A shubunkin (3. ábra) egy tudatosan megalkotott hibrid változat, amelyet japán tenyésztők hoztak létre a 19. század végén. Eredetét tekintve az aranyhal és egy vad *Carassius* faj vörös színváltozatának, japánul *Hibuna*, keresztezéséből származik. Mivel a *Hibuna* a filogenetikai vizsgálatok alapján nem tartozik közvetlenül az aranyhalat tartalmazó csoportba, a shubunkint fajok közötti hibrid aranyhal törzsként ismerik el (Komiyama et al., 2009; Ota, 2021f).

A shubunkin egyik legfontosabb ismertetőjegye a calico (tarka) színezet, amely áttetsző pikkelyekkel párosulva kék alapszínt, valamint piros, narancs, sárga és fekete foltok változatos mintázatát mutatja (Smartt, 2001). A shubunkin esetén egyszerre találhatók normál, fémesen fénylő és átlátszó pikkelyek. A normál pikkelyek iridofórokat tartalmaznak, amelyek fényvisszaverő testfelszín eredményeznek, azok hiánya átlátszó és nem-fémes pikkelyeket hoznak létre. A fényvisszaverő pigment teljes elvesztése ('matt' hatás) azt eredményezi, hogy a kopolyúk vörös színe átüt a kopolyúfedőn, illetve a retina fekete pigmentje az íriszen keresztül láthatóvá válik, amit fekete 'gombszemnek' neveznek. A szövetek és pikkelyek átlátszóságát egy inkomplett domináns gén, a *T/t* szabályozza (Chen, 1928; Omori & Kon, 2019). Azok az egyedek, amelyek heterozigóta *T* allélt hordoznak, 'márványozott' fenotípust mutatnak, amely visszaverő és nem visszaverő szövetek mozaikjából áll (Omori & Kon, 2019).

A shubunkin testfelépítése hasonló a közönséges aranyhaléhoz, ám úszóiban különböző stílusok alakultak ki. A japán-amerikai típus hosszú, hegyes úszókkal rendelkezik, a londoni változat rövidebb, egyszerűbb formát mutat, míg a bristoli shubunkin szív alakú, kerekded farokúszójáról ismert. Kiállítási szempontból Nagy-Britanniában a londoni és bristoli típusnak

külön szabványai léteznek, míg Észak-Amerikában az eredeti japán forma terjedt el (Smartt, 2001).

Bár a shubunkin Japánban sosem vált igazán népszerűvé, a nyugati világban az egyik legismertebb és legkedveltebb aranyhal változattá nőtte ki magát. Sokszínű mintázata, elegáns úszói és genetikai sajátosságai révén a mai napig különleges helyet foglal el az akvarisztikában, és változatai, különösen a bristoli és az amerikai típus, kiállításokon is nagy népszerűségnek örvendenek (Smartt, 2001).

A Shubunkin teste megnyúlt és oldalról lapított, testmélysége a teljes testhossz körülbelül $3/7-3/8$ része. Az úszók közül a hát- és a farok alatti úszó szimpla, míg a mell- és hasúszók párosak. A londoni változat szimpla farokúszója nagyjából a testmélységgel egyezik meg, lebenyei a testhossz körülbelül egynegyedét teszik ki, végük lekerekített, és méretük megegyezik a közönséges aranyhaléval. A japán, azaz az eredeti típus, keskeny, erősen kettéágazó és hegyes farokúszóval rendelkezik, amely a testhossz felétől kétharmadáig terjedhet, míg az amerikai változatnál ez valamivel hosszabb. A többi úszó hosszú és hegyes, a hátúszó magassága a testmélység háromnegyedének felel meg. A bristoli shubunkin farokúszója telt, lekerekített lebenyekkel, amelyek szintén a testhossz felétől kétharmadáig érhet. A többi úszó hosszú, de szélesen lekerekített, a hátúszó magassága itt is a testmélység háromnegyede. A szemek normálisak, a test kontúrjai, hát, has és oldalsík, simák, hasonlóan a közönséges aranyhalhoz (Smartt, 2001).



3. ábra. A shubunkin változat (Forrás: saját felvétel).

3.4.3. Fekete teleszkópszemű aranyhal

A fekete teleszkópszemű aranyhal (black moor) (4. ábra) az egyik legjellegzetesebb aranyhal változat, amely mély, bársonyos fekete színezetéről és erősen kidülledő, úgynevezett

teleszkópszemeiről ismert. A változat teste rövid, gömbölyű, amelynek mélysége a testhossz legalább háromnegyede, a test kontúrja sima. Szimpla hátúszóval, páros mell-, has- és farok alatti úszókkal, valamint iker farokúszóval rendelkezik, amely lehet legyező vagy villás. A változat ideális színe mély, bársonyos fekete, amelyet a melanofór sejtek nagy száma és a melanin lerakódás eredményez, elfedve a pikkelyek fémes csillogását. A teleszkópszemű aranyhalak szemei jelentős morfológiai változatosságot mutatnak: lehetnek gömb, tojásdad, csonkakúp vagy szegmentált gömb alakúak. A „teleszkópszem” kifejezést már a 19. század óta használják az aranyhalak e különleges szemformájának leírására, ez az állapot, az úgynevezett exophthalmia, a természetben kóros formában is előfordulhat, de az aranyhalaknál öröklött genetikai mutáció eredménye. A Billardon de Sauvigny-féle tekercsen (1780) már korán ábrázolták a teleszkópszemű halakat, amelyek akkor még hosszú és rövid testű egyedeknél egyaránt előfordultak, míg napjainkban ez a tulajdonság szinte kizárólag a rövid testű díszváltozatokra jellemző (Smartt, 2001). Molekuláris szinten a teleszkópszem az *lrp2a* gén működéskieséses mutációjához köthető, amely megzavarja a normális szemfejlődést, és jellegzetes kidülledt szemformát eredményez (Kon et al., 2020; Yu et al., 2022). Fejlődésbiológiai megfigyelések szerint a fekete teleszkópszemű aranyhal lárvái a korai szakaszban nem mutatják a felnőttkori kidülledt szemformát, a szemek fokozatosan fejlődnek ki a késői juvenilis és felnőttkori stádiumban (Ota, 2021d).



4. ábra. A fekete teleszkópszemű aranyhal változat (Forrás: saját felvétel).

3.4.4. Oranda

Az orandát (5. ábra) hozzávetőleg egy évszázada tenyésztették ki döntő többségben piros, piros-fehér színben, a ruykinhoz képest kisebb testmélységgel és iker farokúszóval. Az elmúlt 50 évben azonban drámai változásokon ment keresztül, számtalan új színváltozatot hoztak létre.

Emellett alakja is módosult az emberi tevékenység hatására, az évek során a testformája egyre inkább a fátyolfarkú aranyhalhoz kezdett hasonlítani: mélyebb test, simább kontúrok, és négyzetes vagy széles farokúszó (Smartt, 2001). Törzsének rövid, zömök morfológiája alapján, egyértelműen megkülönböztethető a vad-típustól (Ota, 2021e). Hátúszója testmélységének felétől–hétnyolcadáig terjedhet. Mell-, has- és farok alatti úszói párosak. Farokúszója testhosszának háromnegyedétől másfélszereséig terjedhet (Smartt, 2001). A *chordinA* (*chd4*) gén nonszensz mutációja következtében osztott (Abe et al., 2014), alakja villás vagy szétterülő, amelynek gyengébb úszósugari lehetőséget tesz, hogy a lebenyek lágyan lelógjanak (Smartt, 2001; Komiyama et al., 2009). Testét sima háti, hasi és oldalkontúr jellemzi (Smartt, 2001). A feji régió epidermális szövetének mutációja több változatnál (ranchu, pompom) is megjelenik, az oranda esetén a fej felső részén található „csuklyát” szemölcszerű kinövések alkotják (Ota, 2021e). Szemei a jellegzetes fejkinövés ellenére normálisak. Kültakarója lehet változatos vagy egyszínű, a fémes és a calico színezet széles tartományában mozogva. Számos színváltozatot hoztak létre a fémes színek között, például csokoládé, kék és fekete a szokásos piros, piros-fehér és narancssárga mellett. Előfordul a fejkinövés és a test azonos, valamint kontrasztos megjelenése is, mint a piros sapkás oranda esetén, de többszínű fejkinövések is kialakulhatnak. Kínában néhány rendkívüli változatot is előállítottak, például fekete fejkinövessel rendelkező vörös testű egyedeket (Smartt, 2001).



5. ábra. Az oranda változat (Forrás: saját felvétel).

3.5. Az aranyhal szaporodásbiológiája

3.5.1. A petefészek felépítése és a petesejtek fejlődése

A nőivarú aranyhal ivarszerve cisztovárium típusú, a petevezető összeköti a petefészeket az ivarnyílással. A petefészek tágas üregű, hártásfalú zsák, melynek belső falából szabálytalan lefutású lamellák nyúlnak az üregébe. Ezekről fűződnek le a petesejtek és a táplálásukat szolgáló, a peteburok kialakításában is részt vevő tüszőhámsejtek. A perifériás kötőszövetben elsősorban oogóniumok és korai fejlődési stádiumú oocyták találhatók. Az aranyhal petefészkében az oogóniumoktól a fejlett oocytáig egyidejűleg valamennyi fejlődési stádiumban lévő oocytacsoport megtalálható (Ferrão et al., 2020). Ennek következtében a szaporodási időszak során több alkalommal is bekövetkezhet ovuláció és ívás, miközben a korai fejlettségi állapotú csírasejtek a következő szaporodási ciklusban biztosítják az ivarsejtek kialakulását (Horváth & Urbányi, 2000).

Az oogenezis a csírasejtek differenciálódásával kezdődik, ivarsejteket és a később kialakuló follikuláris réteg szomatikus sejtjeit létrehozva. Az oocita a kromatin-nukleolusz fázisban kezdi meg a meiózist, és a profázis korai szakaszain (leptotén, zigotén, pachytén) halad keresztül, míg eléri a diplotén stádiumot, ahol a sejtosztódás leáll, az oocita nyugalmi állapotba kerül és növekedni kezd. Ebben a szakaszban a sejtmagban egy vagy több nukleolusz figyelhető meg. A follikuláris sejtek megjelennek az oocita körül, kialakítva a fejlődő follikulus kezdeti struktúráját. Az elsődleges növekedési szakasz, vagy previtellogenezis, magában foglalja az egy sejtmagvacskás állapotot, a több sejtmagvacskás állapotot, a perinukleoláris szakaszt, valamint a kortikális alveolusok megjelenését. Ezeket a szakaszokat a petesejt méretének és komplexitásának fokozatos növekedése jellemzi. A másodlagos növekedés, vitellogenezis, során megtörténik a szik felhalmozódása és a petesejt további növekedése. A korai és késői másodlagos növekedési szakaszokat jelentős szikfelhalmozódás és az ovulációra való felkészülés jellemzi (Ferrão et al., 2020). A szikképződés befejeztével, az érett oociták az ovulációt megelőzően, hosszabb ideig is, nyugalmi állapotban maradhatnak a petefészekben. Amennyiben a környezeti (például oxigénhiány lép fel) vagy endokrin feltételek nem megfelelőek az ovulációhoz, a petesejtek felszívódnak. Az ívásra alkalmas környezet kialakulásakor a gonadotrop hormonok felszabadulása – vagy hormonkezelés – hatására bekövetkezik a follikulusok felszakadása, az ovuláció (Horváth & Urbányi, 2000). Atresia során, polimorf atrétiкус follikulusok jelennek meg, amelyek az oociták elhalásából, valamint a follikulusok összeeséséből és széteséséből maradnak vissza (Ferrão et al., 2020).

3.5.2. A here felépítése és a hímivarsejtek fejlődése

Halak esetén két fő heretípust lehet megkülönböztetni, a csöves, valamint a lebenyes szerkezetűt. Ezek morfológiájukban és a spermiogenezis folyamatában térnek el egymástól (Horváth & Urbányi, 2000). Az aranyhalnak, mint a gazdasági jelentőséggel bíró halak nagyrészenek, lebenyes szerkezetű heréje van (Billard, 1986). Ennél a típusnál a kötőszövet a here külső falától kiindulva szabálytalan „csöveket”, más szóval, lebenyeket (lobulusokat) képez, amelyeket a Sertoli-sejt réteg és a benne található fejlődő ivarsejtek töltenek ki. A lebenyek zárt vége a külső herefal irányában helyezkedik el (Billard, 1986; Horváth & Urbányi, 2000). A spermatogenezis és a spermiogenezis során az aranyhal érett spermiumokat termel, amelyek elengedhetetlenek a szaporodáshoz. Ezen folyamatok során a differenciálatlan őssejtek fokozatosan specializált sejtekké, spermatogóniumokká (A és B típusú), spermatocitákká, spermatidákká, majd érett spermiumokká (spermatozoa) alakulnak át (Schulz et al., 2010). A késői spermatogenezis során programozott sejthalál (apoptózis) figyelhető meg, mely biztosítja, hogy csak egészséges spermiumok érjenek meg (Andreu-Vieyra et al., 2005). A spermiogenezis az utolsó szakasz, amelyben a spermatidák morfológiai változásokon mennek keresztül, hogy mozgékony spermiumokká váljanak. Ez magában foglalja a sejtmag kondenzációját és a fark (flagellum) kialakulását is. A Sertoli-sejtek kulcsszerepet játszanak az ivarsejtek fejlődésének támogatásában és szabályozásában (Schulz et al., 2010). A spermatogenezis során a ciszták csak kis mértékben mozognak a lobulus belseje felé; a spermiumok a lobulus üregébe (lumenébe) ürülnek, ahonnan tovább szállítódnak a spermavezetéken keresztül a kívülvilágba (Billard, 1986; Horváth & Urbányi, 2000). A folyamatot az agyalapi mirigy gonadotrop hormonjai – a luteinizáló hormon (LH) és a follikulusstimuláló hormon (FSH) – irányítják, amelyek a Leydig-sejteket serkentik nemi szteroid hormonok termelésére. Ezek a hormonok, különösen az androgének, felelősek a herék éréséért és a spermiációért (Schulz et al., 2010).

3.6. Szaporodásbiológiai mutatók

3.6.1. Női- és hímivarsejt minőségi mutatók

Az aranyhal esetén, mint gazdasági és kutatási jelentőséggel bíró faj, kulcsfontosságú az ivarsejt minősége a szaporítás sikeressége, az egészséges utódok, valamint a hatékony termelés szempontjából. Az ikra és a sperma minősége közvetlenül meghatározzák a termékenyülési- és kelési arányt, az embriófejlődést, a lárvák túlélését és a tenyésztési programok általános sikerét (Bobe & Labbé, 2010).

3.6.1.1. Az ikra

A halikra minőségét elsősorban az mutatja meg, hogy képes-e termékenyülni és egészséges embrióvá fejlődni. Ennek a legfontosabb mutatói a termékenyülési arány, a kelési arány, az embrió rendellenességek aránya, az ikra átmérője, az olajcseppek mérete, valamint a biokémiai összetétel, például a lipid- és fehérjetartalom, molekuláris és sejt markerek (Lahnsteiner et al., 2001; Bobe & Labbé, 2010; Bobe, 2015). A női ivarsejt minőségét befolyásoló belső tényezők közé tartoznak az anyai tulajdonságok, mint a testméret, a genetikai háttér, az endokrin rendszer működése. Emellett az ikrás által biztosított tápanyagok alapvető szerepet játszanak az egészséges ikra kialakulásában és az embrionális fejlődésben (Brooks et al., 1997; Reading et al., 2018). Az ikra minőségét számos külső környezeti és technológiai tényező is befolyásolja, mint a hőmérséklet, az alkalmazott hormonkezelési protokoll, a fejés időzítése, az anyahalak kondíciója, a stressz és az ivási környezet, valamint a tenyészállomány takarmányozása. Mind a GnRH-alapú hormonok (pl. Ovaprim/Ovulin/GnRHa/kisspeptin-analógok/Ovopel), mind a gondatrop hormonok (hCG, ponty hipofízis) optimalizált dózisban alkalmazva, megfelelő felkészítés és optimális vízhőmérséklet mellett magas ikraminőséget eredményeznek (Targońska & Kucharczyk, 2011; Taheri-Khas et al., 2024). Taheri-Khas et al. (2024) vizsgálatukban a végső ivarsejtérést 16 °C, 22 °C és 28 °C hőmérsékleteken hasonlították össze Ovaprimmel történő hormonkezelés mellett. Minden általuk vizsgált szaporodásbiológiai paraméter vonatkozásában a 22 °C bizonyult a legkedvezőbbnek Ovaprim alkalmazásával, beleértve az ovuláló ikrások arányát, a termékenyülési arányt, az embriók túlélését és a lárvák növekedését, miközben kevesebb fejlődési rendellenesség volt megfigyelhető. A hCG, a ponty hipofízis és az Ovopel hormonszintézisek 20 °C-on történő összehasonlítása során a hCG-kezelés eredményezte a legmagasabb ovulációs arányt (100%) és embrió túlélési arányt, míg a legmagasabb relatív fekunditást (89960 ikra/ttkg) az Ovopel alkalmazásával érték el. A ponty hipofízissel történő hormonkezelés egyik vizsgált paraméter esetén sem eredményezett kiemelkedő értékeket (Targońska & Kucharczyk, 2011).

Aranyhal esetén 0,2% probiotikum + nukleotid kiegészítés jelentős pozitív hatást gyakorolt az ikra átmérőjére, az abszolút termékenységre (az összes termelt ikraszám), a relatív termékenységre (testtömeggrammra vetített ikraszám), a GSI-re, valamint a termékenyülési és kelési arányra (Mehdinejad et al., 2019). Kashani et al. (2012) C-, E-vitamin, valamint telítetlen zsírsavak hozzáadásával értek el magas termékenyülési és kelési arányokat, de a karotinoidok alkalmazása is pozitívan befolyásolta a grammonkénti ikraszámot, a termékenyülési és a kelési arányt (Tizkar et al., 2013). Ezzel szemben a takarmányhoz adott szójaliszt kedvezőtlenül hatott az ikrások ivartermék minőségére, alacsonyabb összes ikraszámot és testtömeggrammonkénti

ikraszámot, kisebb ikraátmérőt, csökkent termékenyülési és kelési arányt eredményezett (Bagheri et al., 2013).

Ezen paramétereket a tenyésztési gyakorlatok és a környezeti feltételek (pl. vízhőmérséklet, sótartalom, fotoperiódus) is befolyásolják. A legyezőfarkú aranyhal ikraátmérője 298 és 1006 μm között változik, míg a GSI értéke 7,28% és 19,11% között mozog az évszakok függvényében, az ívási időszakban elérve a legmagasabb értékeket (Najim et al., 2012). Az ovulációt követő túlérés szintén jelentős tényező, mivel a legtöbb halfajnál az ikraminőség romlása az ovuláció után gyorsan bekövetkezik. Aranyhalaknál a termékenyülési és kelési arány az ovulációt követően néhány órán belül drasztikusan csökken, és 10 óra elteltével az utóbbi már 0%-ra esik vissza (Formacion et al., 1995). A vizsgálatok szerint az aranyhalak termékenyülési aránya 74% és 94% között változik, míg optimális körülmények között a kelési arány elérheti a 89–95%-ot.

A külső tényezők mellett azonban arra vonatkozólag, tudomásom szerint nem áll rendelkezésre információ, hogy a mesterségesen kialakított változatok ikrás egyedeinek reprodukciós képességében van-e eltérés. Továbbá arra sem áll rendelkezésre adat, hogy az ovuláció mesterséges indukálása miként befolyásolja a végső ivarsejtérést a különböző változatokban.

3.6.1.2. A sperma

Az aranyhal sperma minőségét számos paraméter jellemzi, mint a motilitás, a koncentráció, a mikrobiom, valamint a molekuláris markerek. Ezeket befolyásolja az egyedek genetikai háttere, a takarmányozás, a hőmérséklet, a fotoperiódus, a vízminőség, valamint az alkalmazott kezelési módszer (Kowalski & Cejko, 2019).

Mozgás és kinetika

Bár az évek során több spermaminőségi biomarkert is leírtak, a leggyakrabban alkalmazott, a mozgó spermiumok százalékos arányának (motilitás) meghatározása. A sperma nagy arányú motilitása a sikeres termékenyülés egyik előfeltétele. A sperma mozgásának értékelése korábban szubjektív becslésén alapult (Rurangwa et al., 2004). A technológiai fejlődésnek köszönhetően mára azonban számos módszert dolgoztak ki ezen paraméterek objektív értékelésére. A modernebb számítógépes videóelemzésen alapuló rendszerek, mint a CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), a sperma aktiválását követően a motilitási értékkel egyidejűleg rögzítenek mozgási irányra, valamint sebességre vonatkozó paramétereket is. Ezek közé tartozik a mozgó (motility - MOT) és progresszívan mozgó spermiumok aránya (progressive motility - pMOT), valamint a sebességi értékek: görbevonallú sebesség (curvilinear velocity - VCL), egyenes vonalú sebesség (straight line velocity - VSL) és a hímivarsejt sebessége mozgásának átlagolt útvonalára számolva

(average path velocity - VAP). Továbbá a rendszer kinetikai értékeket is képes meghatározni, mint például a spermium ténylegesen megtett útvonalának az egyenestől számított eltérése (linearity - LIN), a hímivarsejt átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése (straightness - STR) és a hímivarsejt teljes mozgási útvonalának az átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése (WOB - wobble) (Gallego & Asturiano, 2018).

Az aranyhal spermája fejést követően 17–97 % pMOT, 80–120 $\mu\text{m/s}$ VSL, 81–161 $\mu\text{m/s}$ VCL, valamint 79–97% STR értékekkel rendelkezik. Ezen mutatók a tartási hőmérséklettől (Zadmajid et al., 2013), a takarmány összetételétől (Bagheri et al., 2013; Tizkar et al., 2015; Mehdinejad et al., 2019), a különféle anyagoknak való kitettségétől (Schoenfuss et al., 2002; Van Look & Kime, 2003; Hatef et al., 2012a; Hatef et al., 2012b; Chantzaropoulos et al., 2015), valamint a sperma tárolási körülményeitől (Taghizadeh et al., 2013; Bernáth et al., 2017) függően változhatnak. Bernáth et al., (2017) három változat motilitását vizsgálva figyelték meg különbségeket, melyet alapul véve több változat és szaporodásbiológiai mutató bevonásával végeztem kutatásomat.

Mennyiség és koncentráció

A motilitás mellett a sperma koncentrációja és mennyisége gyakran rögzített spermaminőségi paraméterek. A spermakonzentráció alapvető reprodukciós mutató a halaknál, így az aranyhal esetében is, mivel közvetlen hatással van a termékenyülés sikerességére, meghatározó szerepe van a tenyésztés során (Kowalski & Cejko, 2019). Aranyhal esetén számos tanulmányban vizsgálták ezen paramétereket, mint külső hatás, illetve valamilyen kezelés indikátora. Az irodalomban elég tág intervallumban található adat mind a koncentráció értékek (1×10^7 – 14×10^{10} spz/ml), mind a mennyiségek vonatkozásában (7–1300 μl). Kyle et al., 1985-ös tanulmányukban leírták, hogy az ívásra felkészült ikrással és/vagy tejesekkel együtt tartott érett tejesektől nagyobb mennyiségű sperma nyerhető, mint a stimulus nélküli, hímekből álló csoportokban tartott egyedektől. Ennek okát vizsgálva, Mangiamale és Thompson (2012) tesztoszteronnal kezelt tejesek esetén már egy órán belül megnövekedett sperma mennyiséget és sűrűséget rögzítettek, összekötve a szociális tényezők hatását az ívási viselkedést szabályozó hormonális mechanizmusokkal. Zadmajid et al. (2013) a különböző évszakokban mért spermakonzentrációban írt le különbségeket, melyeket ívási időszakon kívüli felkészítés mellett vizsgált. Aranyhal esetén takarmánykiegészítők hatását vizsgálva, a karotinoidok (Tizkar et al., 2015), valamint probiotikum (Mehdinejad et al., 2019) alkalmazása pozitívan befolyásolták a mililiterenkénti sejtszámot, míg a takarmány szójatartalmának emelése negatívan hatott a koncentrációra (Bagheri et al., 2013). Az aranyhalban végzett eddigi kutatások főként külső tényezők hatásainak vizsgálatára korlátozódtak, arról azonban kevés adat áll rendelkezésre

(Bernáth et al. 2017), hogy a különböző változatok, vonalak között van-e különbség ezen mutatók között.

Tárolás

A sperma hűtve történő tárolása (~4 °C) egy egyszerű és költséghatékony eljárás, mely megkönnyítheti a tenyésztési programokat az akvakultúrában. Lehetővé teszi a sperma megőrzését *in vitro* szaporítás, minőségvizsgálat, keltetőházi szaporítás, szelektív *in vitro* tenyésztés, betegségek diagnosztizálása, szállítás, mélyhűtés, valamint molekuláris vizsgálatok céljára. A veszélyeztetett és fenyegetett halfajok spermájának rövid távú tárolásra alkalmas protokollok kidolgozása hasznos eszköze lehet genetikai állományuk megőrzésének. Szaporítás során a sperma hűtve történő tárolása során végzett vizsgálatok információt nyújtanak a tenyésztésbe bevonni kívánt állomány szaporodási képességéről (Contreras et al., 2019).

A sperma mélyhűtése (fagyasztása; -196 °C) nem kizárólag a termelés, hanem a genetikai örökítőanyag megőrzése és a tenyészállomány javítása szempontjából is jelentős módszer, mely leginkább lazacfélék, tokfélék és pontyfélék esetében alkalmazott. A sperma mélyhűtésének előnyei közé tartozik, hogy a szaporítás során egy időben biztosítható mindkét nem ivarterméke, a fel nem használt sperma megőrizhető, lehetővé válik a hímivartermék más halgazdaságokból történő szállítása, valamint a génállomány megőrzése genetikai szelekciós programokhoz vagy fajmegőrzési célokra. A sperma mélyhűtése továbbá fontos szerepet tölthet be a transzgenikus vonalak csírasejt-megőrzésében (Cabrita et al., 2010). Ezenfelül a tárolt sperma felhasználásával történő szaporítás csökkentheti a szükséges tejes egyedek számát az anyaállományon belül, mérsékelve a tejes anyaállomány takarmányozási és infrastrukturális igényeit. Egy tejes spermája több ikrás esetén is felhasználható a termékenyítés során (akár az értékes tejes elhullását követően is) (Glenn et al. 2011). Az aranyhal esetén, mint tenyésztett díszhal és széles körben alkalmazott modellfaj, a sperma megőrzése biztosítja az életképes spermiumok folyamatos rendelkezésre állását, lehetővé téve a szaporítást még akkor is, ha a tejesek és az ikrások ivarsejt termelése nincs szinkronban.

Tárolás során a hígító vagy immobilizáló oldat spermához történő hozzáadása megfelelő ionos és ozmotikus környezetet teremt, megakadályozva az aktiválódást, megnövelve így a sperma fiziológiai élettartamát (Morisawa et al., 1983). Glenn et al., 2011-es vizsgálatában több elegy tesztelését követően a C-F HBSS (kalcium mentes Hank sóoldat) (310 mOsmol/kg) bizonyult a leghatékonyabbnak. Tanulmányukban utalást tettek arra, hogy a baktériumok aktivitása idővel csökkentheti a sperma motilitását. Chantzaropoulos et al. (2015) rövid távú tárolás (1 h, 4 °C) során különböző kémhatású oldatokban, antibiotikum (penicillint és sztreptomycin) hozzáadása mellett, vizsgálták a pH hatását a motilitásra és az aktivációs időre. Munkájuk alapján az enyhén

savas közeg jelentős minőségromlást okoz az aranyhal spermájában. Bernáth et al. (2017) három aranyhal változat (calico, fekete teleszkópszemű, oranda) spermájának hígítás nélküli, rövidtávú (48 h) hűtött (4 °C) tárolása során eltéréseket rögzítettek azok minőségi paramétereiben (pMOT, VCL). A calico mintái esetén jelentős mértékben gyengébb értékeket rögzítettek a fekete teleszkópszemű és az oranda változatoknál. Az égrenéző aranyhal sperma rövid távú tárolásának vizsgálata során a legmegfelelőbb módszernek a sperma 4 °C-on, fenolvörös tartalmú Hank-oldatban történő tárolása bizonyult, mely akár 17 órán át is megőrizte a sejtek életképességét (>60%) (Li et al., 2024b).

Számos tanulmány foglalkozott már az aranyhal spermamélyhűtési protokolljának kidolgozásával, törekedve a lehető legmagasabb felolvasztást követő minőségi értékekre. Nathanailides et al. (2011) különböző védőanyagok vizsgálata során 5–10% dimetil-szulfoxid (DMSO) tojássárgával történő kombinálásával magasabb motilitási értékeket és termékenyülési arányt értek el, mint 10% etilén-glikollal. Nurlaili et al. (2023) ezen protokollt kiegészítve 20 perces fagyasztást megelőző ekvilibrációs időt állapítottak meg. Kutluyer et al. (2015) aranyhal sperma mélyhűtésére több mélyhűtési protokollt hasonlítottak össze, a felolvasztást követő legmagasabb motilitást ($45\pm 7\%$) és mozgási időtartamot 1,5 mM koncentrációjú L-metioninnal rögzítették pellet formában mélyhűtve. A kutatócsoport (Kutluyer et al., 2016) egy későbbi vizsgálata alapján a hígítóhoz taurin hozzáadását javasolta 4 mM koncentrációban a felolvasztást követő magas motilitási és alacsonyabb DNS fragmentáltság érdekében. Taghizadeh et al. (2013) mélyhűtést követő tárolási vizsgálata során a NaCl+szacharóz alapú hígító+10–20% DMSO védőanyag alkalmazása mellett penicillin és sztreptomycin antibiotikumok hozzáadásával rögzítette a legmagasabb motilitási értékeket. Taheri-Khas et al. (2024) NaCl+glükóz alapú hígító, valamint 15% DMSO és penicillin antibiotikum hozzáadásával érte el a legmagasabb termékenyülést a mélyhűtést követően. Bernáth et al. (2017) vizsgálatában 1:9 arányban hígítva (10% sperma:10% metanol+80% hígító) mélyhűtötték a korábban említett változatok (calico, fekete teleszkópszemű, oranda) spermáját. A mélyhűtést követő tárolás során eltérést írtak le a változatok mintáinak minőségében. A vizsgálatban a calico változat hímvivarterméke érzékenyebbnek bizonyult a pMOT és a VCL paraméterekben (Bernáth et al., 2017). Aranyhal esetében a legtöbb tanulmány a sperma tárolása (hűtött és mélyhűtött) során a mozgási paraméterekre összpontosít, azonban az azt befolyásoló mikrobiológiai változásokra nem terjednek ki a vizsgálatok, ennek ellenére több kísérletben is beszámolnak antibiotikum alkalmazásáról.

Mikrobiom

A kutatók az elmúlt években különös hangsúlyt fektettek az emberek és állatok mikrobiom összetételének leírására, a kondícióhoz és az egészséghez kapcsolódó tulajdonságokkal való jótékony és káros összefüggések azonosítása céljából (Foo et al., 2017). A mikrobiom és a spermaminőség kapcsolatával foglalkozó tanulmányokat egyre nagyobb számban lehet megtalálni mind humán (Farahani et al., 2021; Chatzokou et al., 2025), mind pedig különböző állatfajokban, mint például Pietrain sertés (Gòdia et al., 2020), üregi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) (Marco-Jiménez et al., 2024), vaddisznó (McAnally et al., 2023), kecske (Mocé et al., 2023). Halak esetén a baktériumok jelenlétét a spermában több tanulmányban is vizsgálták a tárolás során. A mikrobiális növekedést atlanti lazac (*Salmo salar*) esetén (Stoss & Refstie, 1983) csökkent termékenyülési aránnyal, ponty esetén (Saad et al., 1988) csökkent spermamotilitással és termékenyüléssel, csatornaharcsánál (*Ictalurus punctatus*) (Christensen & Tiersch, 1996) és egy brazil halfajnál, a piracanjubánál (*Brycon orbignyanus*) (Viveiros et al., 2010) csökkent spermamotilitással hozták összefüggésbe (Contreras et al., 2019). Ezzel szemben nagyon kevés tanulmány vizsgálta a spermamikrobiom összetételét, valamint annak összefüggését a sperma fejest követő, tárolást megelőző minőségével (Liyanage et al., 2026). Csatornaharcsa esetében *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Aeromonas*, és *Klebsiella* nemzetségbe tartozó fajokat rögzítettek rövidtávú tárolás során (Jenkins & Tiersch, 1997). A *Barbonymus gonionotus* spermájának vizsgálata során hat baktériumot (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus safensis*, *Commamonas testosteroni*, *Aeromonas punctata* subsp. *caviae*, *Brevibacillus laterosporus*, *Sphingomonas paucimobilis*) izoláltak a friss, valamint az antibiotikummal nem kezelt mélyhűtött mintákból (Boonthai et al., 2016). A tenyésztett sarkvidéki szemling (*Salvelinus alpinus*) esetén mind a tejesek, mind az ikrások ivartermékének baktérium és gombaközösségét azonosították, és írtak le összefüggéseket a mikrobiom összetétel és a sperma egyes minőségi paraméterei (a közepes sebességgel mozgó spermiumok aránya, gyorsan mozgó spermiumok aránya, VCL, VAP, VSL) között (Palaiokostas et al., 2023). Liyanage et al. (2026) tanulmányukban idő specifikus változást figyeltek meg a kék harcsa (*Ictalurus furcatus*) sperma baktérium közösségének összetételében, a *Pseudomonas* és *Aeromonas* fajok nagyobb számban voltak jelen 48 és 72 órát követően. Ezen felül jelentős minőségromlást tapasztaltak a tárolási kísérlet során, csökkent mozgási és életképességi, valamint megnövekedett lipidperoxidációs értékeket rögzítettek. Aranyhal esetén, tudomásom szerint jelenleg nem áll rendelkezésre adat a sperma baktérium és gombaközösségének összetételéről. Az említett összefüggések alapján a hímivartermék mikrobiális közösségének vizsgálata szaporításbiológiai szempontból kiemelt jelentőségű, mivel

a mikrobiom összetétele befolyásolhatja a sperma minőségét, tárolhatóságát és termékenyítőképességét.

3.6.2. A gonado-szomatikus index és szövettan

A gonado-szomatikus index, mely az ivarmirigynek az egyed teljes testsúlyhoz viszonyított arányát fejezi ki, és az ivarszerv szövettani képe, széles körben használt szaporodásbiológiai mutatók. Segítségükkel vizsgálható az ivarérettség, az ívási időszak, valamint felmérhető a reprodukzív rendszer funkcionális állapota. Az említett vizsgálati tulajdonságok ezen felül alkalmazhatóak a környezeti (Spanò et al., 2004; Li et al., 2009) vagy táplálkozási tényezők (Bagheri et al., 2013; Mahlouji et al., 2025), valamint hormonális kezelések (Kookaram et al., 2019) szaporodására gyakorolt hatásának mérésére. A különböző vizsgálatok alapján az aranyhalak GSI-értékei a tejes és ikrás egyedeknél jelentősen eltérnek. Tejes esetén 1,4–7,7%, míg ikrásoknál 1,7–28,4% közötti értékeket mértek a természetes és kontrollált környezet, valamint a takarmányozás függvényében. A szövettani vizsgálat a GSI meghatározása mellett elengedhetetlen az ivarsejtek fejlettségi állapotának pontos meghatározáshoz (Kagawa et al., 1983), részletes betekintést nyújt az ivarszervek érésébe, differenciálódásába és külső stresszorokra adott reakciójába. A petefészek esetében meghatározó paraméter a vitellogenezis stádiumában lévő és érett oociták aránya, a kortikális alveolusok jelenléte, a tüszőfal integritása, valamint az atrézia mértéke (Blazer, 2002; Ferrão et al. 2020). A here szövettani vizsgálatok a herecsatornák (tubulusok) szervezettsége, a spermatogenezis stádiumainak megoszlása, a spermiumok mennyisége, a Sertoli-sejtek morfológiája, továbbá a nekrozis és apoptózis előfordulása tekinthető kulcsfontosságú mutatóknak (Blazer, 2002).

3.6.3. Az RLN3 géncsalád szerepe a hímivarú csontos halak reprodukciós szabályozásában

Az RLN3 géncsalád, magában foglalva a *rln3a* és *rln3b* paralógokat, jelentős szerepet játszik a hímivarú halak szaporodásában. A csontos halak két RLN3 paralóggal (*rln3a* és *rln3b*) rendelkeznek (Good-Avila et al., 2009; Yegorov et al., 2009), amelyek szubfunkcionalizáción estek át, és eltérő, de egymást kiegészítő szerepet töltenek be a neuroendokrin és a reprodukciós szabályozásban (Donizetti et al., 2009; Alnafea et al., 2019). Zebradánió és medakán végzett expressziós vizsgálatok megerősítik, hogy az *rln3a* és *rln3b* konzerváltak és szövetspecifikus expressziós mintázatokat mutatnak, alátámasztva specializált funkcióikat a halak szaporodásában (Donizetti et al., 2009; Good-Avila et al., 2009; Alnafea et al., 2019). Az *rln3a* túlnyomórészt a herékben, különösen a Leydig-sejtekben fejeződik ki, nélkülözhetetlen az androgéntermeléshez, a

hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengelyen keresztül hat, és alapvető szerepet játszik a spermatogenezisben, a sperma motilitásban és a termékenyítő képességben. Yang et al. (2020) nilusi tilápiában (*Oreochromis niloticus*) végzett kísérletük során az *rln3a* gén kiütése here hipertrófiához, az ivarsejtek számának csökkenéséhez vezetett, míg a gén mutációja sperma deformációt, csökkent termékenyítő képességet és motilitást eredményezett. Az *rln3a* gén csendesítése továbbá gátolta más kulcsfontosságú gének kifejeződését a csírasejtekben és Leydig-sejtekben (Yang et al., 2020). Az *rln3b* főként agyban expresszálódik, de a hímek szaporodása szempontjából kulcsfontosságú. A gén szabályozza a HPG tengely szabályozó génjeinek és a szteroidszintézissel kapcsolatos gének kifejeződését, ezáltal mutációja késleltetett spermatogenezist, rendellenes here szerkezetet, csökkent spermiumszámot és spermamotilitást, valamint alacsonyabb termékenyülést eredményez (Xu et al., 2024). Mind a *rln3a*, mind a *rln3b* paralógban történő mutációk megzavarják a HPG tengelyt, befolyásolva a reprodukcióhoz szükséges hormonális jelátviteli és visszacsatolási mechanizmusokat (Yang et al., 2020; Xu et al., 2024; Wu et al., 2024). Az RLN3 gének nélkülözhetetlenek a hímivarú halak egészséges szaporodásbiológiai fejlődéséhez, evolúciós konzerváltságuk és szubfunkcionalizációjuk kiemeli alapvető szerepüket a csontos halak szaporodásban.

3.7. Az aranyhal szaporítása és lárvanevelése

Bár az aranyhalak képesek a spontán ívasra akváriumban vagy tavi környezetben, a hormonális indukció alkalmazása megkönnyíti a szaporítás ütemezését a kísérletek vagy a termelés során (Ota, 2021b; Taheri-Khas et al., 2024). Az aranyhal mesterséges szaporításában többféle oltási protokollt alkalmaznak, melyek célja a végső ivarsejtérés, a spermiáció és az ovuláció kiváltása. A gyakorlatban elterjedt GnRH-alapú készítmények (pl. Ovaprim, Ovopel) és gonadotrop hormonok (pl. hCG, ponty hipofízis) megfelelő dózisban és optimális környezeti feltételek mellett alkalmazva magas beérési arányt, ikraminóséget, spermaminóséget és sikeres szaporítást eredményezhetnek (Targońska & Kucharczyk, 2011; Taheri-Khas et al., 2024). A hormonkezelést követően az ovuláció időzítése viszonylag jól előrejelezhető. Ovaprim alkalmazása esetén az ívas általában 12–16 órával az injekció beadását követően zajlik le (Ota, 2021b). Hasonló eredményről számolt be Targońska és Kucharczyk (2011) is, akik aranyhal esetében az alkalmazott hormonkészítménytől függően 10–16 órás ovulációs latenciaidőt figyeltek meg. Tejes egyedeknél a különböző gonadotrop hormonok és GnRH-alapú kezelések fokozzák a spermiációt, ezáltal növelik a fejéssel nyerhető sperma mennyiségét (Mylonas et al., 2017). A sikeres szaporodást emellett jelentősen befolyásolja a víz hőmérséklet is, amelynek optimalizálása javítja az ovulációs arányt, a termékenyülést és a lárvák túlélését (Taheri-Khas et al., 2024). Az érett tejesek és ikrások előzetes szelekciót és elkülönítést követően, bódítás mellett kerülnek

injektálásra (Ota, 2021b; Targońska & Kucharczyk, 2010). A sperma gyűjtése történhet száraz fecskendőbe vagy hígítóba, majd rövid ideig 4 °C-on tárolható. A lehető legmagasabb termékenyülési arány elérése érdekében felhasználás előtt mikroszkóp alatt vizsgálandó a minták motilitása és koncentrációja (Beirão et al., 2019; Ota, 2021b). Az egészséges ikratételek erőteljes ragadóságot mutatnak, többnyire zöldessárga színűek, melyek közül a zöldes árnyalatú ikra általában magasabb kelési arányt biztosít (Ota, 2021b). A termékenyítés leggyakoribb módja a száraz termékenyítés, az ikra fejése száraz műanyag edénybe történik, majd a hozzáadásra kerül a hímivartermék. Homogenizálást követően a termékenyítés történhet más pontyféléknél is alkalmazott termékenyítő oldattal (4 g NaCl; 3 g karbamid/l) (Woynárovich & Woynárovich, 1980), vagy rendszervízzel (Ota, 2021b; Taheri-Khas et al., 2024). Pontyfélék esetén az ikra ragadóságának megszüntetése és duzzasztása karbamidos oldattal (4 g NaCl; 20 g karbamid/l) történhet. A folyamat 1–1,5 óráig tart, melynek végére az ikra eredeti térfogatának többszörösére nő, tapintásra az ikrahéj rugalmas. A ragadóság teljes eltávolítása érdekében az ikratételek csersavas oldattal (0,5 g tannin/l) kezelendők, majd alapos öblítést követően Zuger-üvegekbe helyezhetők (Woynárovich & Woynárovich, 1980; Horváth, 2000). Az ikratételek inkubációja a leírt kezelés nélkül történhet akváriumban is, oxigéndús, tiszta vízben (Kashani et al., 2012). Az embriók egészséges fejlődéséhez 22 ± 1 °C szükséges, a kelés a hőmérséklet függvényében a termékenyítést követő 4–5. nap körül zajlik le (Urushibata et al., 2019; Motta et al., 2023). A lárvák a keléstől számított 1–2,5 napon kezdik kinyitni a szájukat és felvenni a táplálékot (Battle, 1940; Wiegand et al., 1989) a környezetükből, kezdetben pl. keltetett sórak (*Artemia salina*) formájában (Motta et al., 2023). A lárvanevelés során az optimális hőmérséklet 22 °C (Wiegand et al., 1988).

3.8. Az aranyhal embrionális- és lárva fejlődése

Az aranyhal fejlődési szakaszait több tanulmány is részletesen ismerteti (Battle, 1940; Tsai et al., 2013; Li et al., 2019). Hasonlóan más csontos halakhoz, az aranyhal termékenyült ikrájának barázdálódása meroblasztikus. A blasztodiszk első osztódása 24 °C-on körülbelül 40 perccel a termékenyülést követően kezdődik és két blasztodermát hoz létre, ezt követően 25–30 percenként zajlik az osztódás (Tsai et al., 2013; Ota, 2021c). Az aranyhal hólyagcsíra (*blastula*) állapota kilenc szakaszra osztható, 128-sejtes, 256-sejtes, 512-sejtes, 1024-sejtes, magas, hosszúkas, gömb, kupola és 30%-os rátüremkedés (epibolia) szakaszokra (Tsai et al., 2013; Li et al., 2019). A 24 °C-on történő embriógenezis folyamata során 8 órával a termékenyülést követően (hours post fertilization - hpf) megkezdődik a gasztruláció, 14 hpf-nél a szegmentáció, 26 hpf-nél a pharyngula stádium, mely során lezajlik a hallóhólyag záródása (otic vesicle closure – OVC) (Tsai et al., 2013). Az embrionális fejlődés során kialakul a dorzális-ventrális és az anterior-poszterior testtengely, valamint a mellúszó és a törzs izomrendszerének felépítése (Ota, 2021c). A zigótától a blasztula

állapotig nem figyeltek meg az ikerfarkú aranyhalra (oranda, ryukin) jellemző morfológiai sajátosságokat a szimpla farkú, közönséges aranyhal, korábban ismertetett azonos embrió stádiumaihoz képest (Tsai et al., 2013; Li et al., 2019). A gasztrulációs folyamat során a ryukin, az oranda és a szimplafarkú közönséges aranyhal változatoknál eltérő tendenciákat figyeltek meg. Az oranda embriók összájnyílásának (*blastopore*) záródása némi késéssel zajlik, a fejlődési ütem azonban nagyjából megegyezik a szimplafarkú aranyhaléval. Ezzel szemben a ryukin embriói mind az összájnyílás záródásában, mind a fejlődés ütemében jelentősen eltérnek tőle. A szegmentációs szakasztól kezdve az ikerfarkú embriók jellegzetes tulajdonságokat mutattak, például megnagyobbodott farokbimbót, elágazó úszószegélyt és különbségeket a Kupffer-hólyag fejlődésében, amely csökkent méretű volt és későbbi szakaszokban eltűnt. Annak ellenére, hogy az oranda és ryukin törzsek esetében késés volt megfigyelhető a szelvényeződésben, annak üteme állandó maradt, ami a molekuláris mechanizmusok konzerváltságára utal. A pharyngula szakaszban az ikerfarkú embriók elágazó farokúszó-szegélye, megnagyobbodott, vérszigettel és kissé meghosszabbodott szikzacskóval rendelkezett a szimplafarkú aranyhalhoz képest (Li et al., 2019) (1. táblázat).

1. táblázat. A szimpla és az ikerfarkú aranyhal embrió fejlődési stádiumainak összevetése (Li et al., 2019; Ota, 2021d).

Stádium	Szimplafarkú aranyhal (Tsai et al., 2013)	Az ikerfarkú aranyhal specifikus jellemzői (Li et al., 2019)
Zigóta	Perivitellinális tér; a citoplazma az animális pólus felé mozog a blasztodiszkusz kialakításához	
Barázdálódás	2–64 sejt	
Blasztula	128 sejt-30%-os epibólia; blasztodiszkusz alakulása	
Gasztrula	50%-os epibólia-100%-os epibólia; blasztoderma alakulása	
Szegmentáció	Szomiták kialakulása, Kupffer-vezikula megjelenése, szik kiterjedése, lencse és fülhólyagok, meghosszabbodott farok, formált agy	Szomiták kialakulása, nagyobb farokbimbó, a Kupffer-vezikula polimorf megjelenési mintázatai
Pharyngula	OVC, mellúszó megjelenése, retina és bőr pigmentációja, a középső úszószegély kialakulása	Kettéágazott középső úszószegély és megnagyobbodott vérszíget
Kelés	Mellúszó morfológia, xanthophore mintázatok, farokúszó-szegély alakja	Kettéágazott farokúszó-szegély és a szikhólyag hátsó részének kiterjedése

Aranyhalak esetén a kelés ideje nem alkalmazható a fejlődési stádium mutatójaként (Tsai et al., 2013), mivel egyedenként jelentős eltérés mutatkozik, és számos környezeti tényező is befolyásolja [például hőmérséklet (Battle, 1940), ikra sűrűség, oxigén koncentráció és egyéb tényezők (Kimmel et al., 1995; Tsai et al., 2013; Ota, 2021c)]. A lárvák 24 °C-on történő inkubáció esetén, körülbelül 3 nappal a termékenyülést követően (58–72 óra) kelnek ki, de a kelési idő és a stádiumok nem mindig szinkronizáltak a lárvák között, még ugyanazon ikratétel esetében sem (Tsai et al., 2013; Ota, 2021c). A lárvák keléskor körülbelül 5 mm hosszúak, úszóik különböznek a felnőtt egyedekétől. A korai fejlődési stádiumban egy pár mellúszó és farokúszó szegély figyelhető meg, míg a felnőtt egyedek egy pár mell- és hasúszóval, valamint páratlan farok alatti, hát- és farokúszóval rendelkeznek. A lárvák teste sötét pigmentfoltokkal borított, azonban ez a sötétebb szín idővel eltűnik, és a depigmentáció következtében sárgás színre változik, amelyet a melanoforák elvesztése okoz az egész testen. Ez a folyamat 2–6 hónapos kor között következik be (Omori & Kon, 2019).

4. Anyag és módszer

A vizsgálatok a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetének (AKI) létesítményeiben kerültek kivitelezésre. A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szent István Campus Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága kijelentette, hogy a kísérleteket a 2010/63/EU irányelvnek megfelelően, és engedélyükkel hajtottam végre (iktatószám: MATE-SZIC/1742-1/2022 és MATE-SZIC/1745-1/2022).

4.1. A kísérleti állomány tartása és kezelése

4.1.1. A kísérleti állomány tartása

Az anyaállomány (2. táblázat) beszerzése hazai díszhaltenyésztőtől történt, a vizsgálatokhoz használt F2 generációt a tenyésztő maga állította elő. Az ivarérett állomány tartása a vizsgálatok ideje alatt ivaronként különválasztva az AKI 3 m³-es recirkulációs akvakultúra-rendszerében (RAS) történt. A rendszerbe helyezést két hét karantén időszak előzte meg. A rendszer az optimális vízminőség fenntartása érdekében programozható logikai vezérlővel (PLC) (Unitronics VS70, Velinor Kft., Budapest, Magyarország) volt felszerelve. A halakat tartó medencéből az elfolyó víz először fizikai, majd biológiai és UV-szűrésen ment keresztül, így biztosítva a károsanyag-mentes víz visszaforgását. A vizsgálatok során a folyamatosan monitorozott paraméterek értékei a következők voltak: hőmérséklet: 18–19 °C, oldott oxigén: 7–8 mg/l, vízcseré: 100 l/óra, 12:12 óra világos:sötét fotofázis. A hetente ellenőrzött paraméterek manuálisan, hordozható pH (HQ Hach, Company, Loveland, Colorado, Amerikai Egyesült Államok) és fotométer (VISOCOLOR® FISH analízis koffer PF-3 fotométer, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Németország) segítségével kerültek meghatározásra, melyek értékei a következők szerint alakultak: pH: 7,8–8,1, ammónium: < 0,02 mg/l, nitrit: < 0,02–0,1 mg/l, nitrát: 5,5–10 mg/l. A halak naponta egyszer 2% testtömeg-kg száraz takarmányt [Aqua Garant Vital Swim UNI 2 mm (nyersfehérje 34%, nyerszsír 12%, nyersrost 3,5%; Aqua Garant GmbH, Ausztria), illetve Coppens Wheat Germ búzacsírási koi táp 3 mm (fehérje 37%, zsír 6%, nyersrost 2,3%; Alltech Coppens, Nicholasville, Kentucky, Amerikai Egyesült Államok)] kaptak.

2. táblázat. A vizsgálatokban használt állomány testparaméterei. A változatonkénti mintaelemszámok (ikrás; tejes): közönséges aranyhal $N = 14$; 26, shubunkin $N = 14$; 27, fekete teleszkópszemű $N = 12$; 26 és oranda $N = 13$; 26. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
Az ikrás egyedek átlagos testtömege (g)	71,3±20,8	57,8±26,6	56,8±21,2	94,7±22,7
Az ikrás egyedek sztenderd testhossza (cm)	11,3±1,6	11,2±1,7	8,5±1,3	9,5±0,8
A tejes egyedek átlagos testtömege (g)	66,6±21,4	52,7±24,2	46,3±14,4	88,4±54,8
A tejes egyedek sztenderd testhossza (cm)	11,9±1,3	11,0±1,9	8,0±0,9	9,4±2,4

4.1.2. A kísérleti állomány kezelése

A vizsgálatok elvégzéséhez az anyaállomány szaporításra történő felkészítése a tenyésztő által alkalmazott módszertan szerint zajlott. A halak vízének hőmérsékletét a kísérleteket megelőzően egy héttel 21–22 °C-ra emeltem, illetve etetésüket két napra felfüggesztettem. A vizsgálatok során az egyedek bódítása az oltáshoz és a fejéshez egyaránt 0,4 ml/l 2-fenoxietanollal (99%) (2-fenoxietanol, 77699, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) történt (Bernáth et al., 2018). A spermiációt és az ovulációt fiziológias sóoldatban (0,9%-os NaCl) oldott hipofízissel indukáltam (Ittész szóbeli közlése alapján 2021). Az ikrás egyedek hormonkezelése két dózisban (10% 24 órával és 90% 12 órával a várható ovuláció előtt), testtömeg kilogrammonként 4 mg, míg a tejesek oltása egy dózisban, testtömeg kilogrammonként 2 mg hipofízissel 12 órával az ivartermék gyűjtése előtt történt. Az intraperitoneális injekciót a hasúszó tövébe adtam. A minták gyűjtését megelőzően az egyedek urogenitális pórusát szárazra töröltem az ivarsejtek aktiválódásának és szennyeződésének elkerülése érdekében. Az ivarterméket a hagyományos módszer szerint a hasfal masszírozásával nyertem ki. A gyűjtés ikrások esetén száraz tálba, tejesek esetén 1 ml-es steril fecskendőbe történt (6. ábra). Az ikratételeket termékenyítésig (20–30 perc) 18–20 °C-on, a tejet a vizsgálatok elvégzéséig, illetve szaporítás során felhasználásig (10–15 perc) 4 °C-on tároltam (Bernáth et al., 2017).



6. ábra. A hímivartermék gyűjtése száraz fecskendőbe (Forrás: Dr. Bokor Zoltán).

4.2. Kísérleti terv

A kutatómunka során végzett vizsgálatok több egymást követő kísérleti szakaszban valósultak meg.

- Az első vizsgálati periódus során, 2021 áprilisában a halak ívasra történő felkészítése két részletben zajlott. A spermaminőség meghatározására külön időpontban került sor, míg az ikraminőség-vizsgálatot és a szaporítási kísérletet egyidejűleg végeztem. A szaporítási kísérletből származó lárvák felhasználásával 2021 májusában lárvanevelési vizsgálatot állítottam be.
- A második vizsgálati periódusban, 2023 júniusában a rövid távú hűtött, valamint a mélyhűtött tárolási kísérletekhez kapcsolódó mikrobiológiai vizsgálatok mintavétele két eltérő időpontban történt. A szövettani és génexpressziós vizsgálatok mintavételezésére egy időpontban, szintén júniusban került sor.

4.3. Adatfeldolgozás és statisztikai programok

A kísérletek eredményeit minden esetben Microsoft Excel és Word (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Amerikai Egyesült Államok) segítségével dolgoztam fel. Az adatok statisztikai elemzéséhez IBM SPSS 25 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0., IBM Corp. Released 2017., Armonk, New York, Amerikai Egyesült Államok), GraphPad Prism 8

(GraphPad Prism Version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, Amerikai Egyesült Államok) és Statistica (TIBCO Software Inc., Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) programokat használtam. Az egyes vizsgálatok során alkalmazott statisztikai teszteket és azok paramétereit az adott vizsgálat módszertani leírásánál ismertetem.

4.4. Ivarsejtminőség vizsgálat és lárvanevelés

4.4.1. Spermaminőség meghatározás

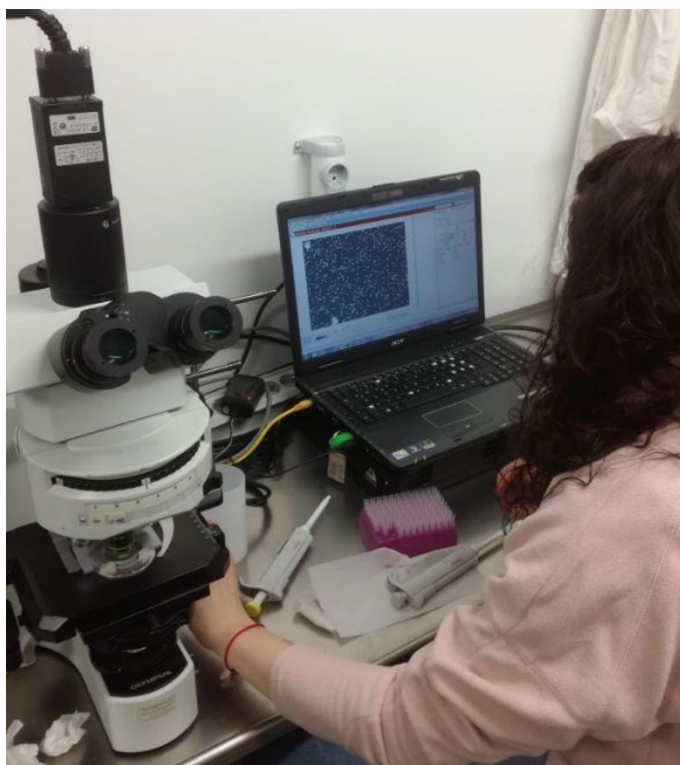
A sperma minőségének értékelése változatonként 8 egyed (3. táblázat) összehasonlításával történt.

3. táblázat. A sperma minőségi vizsgálatban használt tejes állomány testparaméterei A változatonkénti mintaelemszámok: közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 7$, fekete teleszkópszemű $N = 8$ és oranda $N = 8$. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
A tejes egyedek átlagos testtömege (g)	52,3±10,9	34,9±5,9	52,1±11,5	43,8±7,5
A tejes egyedek sztenderd testhossza (cm)	10,8±1,2	9,5±0,4	7,9±0,6	7,6±0,6

A hímek sperma mennyiségét (SV) (μl) közvetlenül fejest követően határoztam meg. A minták testtömeg-kilogrammonkénti mennyiségét (SV/BW) ($\mu\text{l}/\text{tkg}$) a sperma mennyiségének a testtömeghez viszonyított arányából számoltam ki (Cejko et al., 2011; Cejko et al., 2012; Cejko et al., 2014). A sejtsűrűség (spz/ml) meghatározásához a mintákat 1:999 (sperma:oldat) arányban hígítottam pontyra kidolgozott immobilizáló oldatban (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0, Saad & Billard, 1987), majd Bürker típusú sejtszámláló kamrába (Marienfield Superior, Paul Marienfield GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Németország) töltöttem. A sejtekről 200×-os nagyításon készítettem felvételeket fénymikroszkóphoz (Nikon Eclipse 600, Auroscience Kft., Budapest, Magyarország) csatlakoztatott digitális fényképezőgéppel (QImaging Micro Publisher 3.3, QImaging, Surrey, Kanada). A sejtek számának meghatározása ImageJ 1.8 (ImageJ for Windows, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Amerikai Egyesült Államok) képfeldolgozó programmal történt (Bernáth et al., 2016). A milliliterenkénti sejtszámot (N , spz/ml) a Bürker-kamrában megszámlált sejtek átlagos számából (X) számítottam ki. A kamra egy négyzetének térfogata $1/250 \mu\text{l}$ (terület: $1/25 \text{ mm}^2$, magasság: $1/10 \text{ mm}$). Ezt az értéket szorozva 1000-rel kaptam meg a ml-enkénti sejtszámot, majd a hígítási arány (1:999) alapján 1000-es szorzással korrigáltam az értéket: $N = X \times 25 \times 10 \times 1000 \times 1000$ (Bokor, 2009).

A spermaminták motilitási (pMOT, %) és kinetikai paramétereit (VCL, $\mu\text{m/s}$; VAP, $\mu\text{m/s}$; LIN, %; ALH, μm ; BCF, Hz) (Cabrita et al., 2008; Gallego & Asturiano, 2018) CASA rendszerhez (Sperm Vision™ v. 3.7.4., Minitube of America, Venture Court Verona, Amerikai Egyesült Államok) csatlakoztatott digitális kamerával (JAI CV-A10 CL, Minitube of America, Venture Court Verona, Amerikai Egyesült Államok) rögzítettem és értékeltem. A spermaminták aktivációját egy a ponty fajra kidolgozott aktiváló oldattal (45 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris, pH 8,0, Saad et al., 1988) végeztem, melyhez 0,01 g/ml szarvasmarha szérumból albumint (bovine serum albumin - BSA) adtam a sejtek letapadásának megakadályozása érdekében. A mintákat aktiváló oldatot tartalmazó Makler-kamrába (Sefi Medical Instruments, Haifa, Izrael) töltöttem 0,5:99,5 (sperma:aktiváló oldat) arányban, majd homogenizáltam. A mozgási paramétereket 10 másodpercen belül, legalább két ismétlésben vizsgáltam (7. ábra).



7. ábra. Aranyhal sperma minőségi paramétereinek rögzítése CASA rendszerrel (Forrás: Dr. Várkonyi Levente).

A spermaminőség vizsgálat eredményeinek értékelését a 4.3. fejezetben ismertetett programokkal végeztem. Az adatok normál eloszlásának vizsgálatára ($p < 0,05$ szignifikanciaszinten) Shapiro-Wilk- és Kolmogorov-Smirnov próbát alkalmaztam. A normál eloszlást nem mutató adathalmazok esetében arkusz szinusz-négyzetgyök [pMOT (%)] és logaritmikus transzformációt [VCL ($\mu\text{m/s}$), ALH (μm), BCF (Hz), sperma mennyiség (μl)] alkalmaztam. A különböző csoportok összehasonlítását egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) végeztem. A post hoc összehasonlításokhoz Tukey-, illetve Dunnett-féle T3-próbát használtam ($p < 0,05$). A sperma paraméterek és az aranyhalváltozatok közötti összefüggések

vizsgálatára permutációs varianciaanalízist (PERMANOVA) alkalmaztam. A változatok elkülönülését meghatározó paraméterek feltárására lineáris diszkriminancia-analízist (LDA) végeztem.

4.4.2. Ikraminőség meghatározás és szaporítási vizsgálat

Ikraminőség meghatározás

Ikrások (4. táblázat) esetén meghatároztam a pseudo-gonado-szomatikus index (PGSI, %) értékét, amelyet az alábbi képlettel számoltam: a lefejt ikra tömege/az ikrás tömege a fejtés előtt $\times$ 100 (Urbányi et al., 2006). Az ikraszemek grammonkénti számát fotó alapján, ImageJ 1.8 program segítségével határoztam meg. A számítást a következőképpen végeztem: 0,1 g-ban talált ikraszemek száma $\times$ 10.

Az ikraminőség vizsgálat eredményeinek értékelését a 4.3. fejezetben bemutatott programokkal végeztem. Az adatok normális eloszlásának vizsgálatára ($p < 0,05$ szignifikanciaszinten) Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztam. A normális eloszlást nem mutató adathalmazt [PGSI (%)] arkusz szinusz-négyzetgyök függvénnyel transzformáltam. A különböző csoportok összehasonlítását egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) végeztem. A post hoc összehasonlításokhoz Tukey-, illetve Dunnett-féle T3-próbát használtam ($p < 0,05$).

Szaporítási vizsgálat

A szaporítási kísérlet során meghatároztam a szaporítás hatékonyságát és összehasonlítottam a vizsgált változatok (4. táblázat) között a következőkben ismertetett mutatók alapján. A termékenyítést megelőzően a sperma mozgási és kinetikai paramétereit CASA segítségével határoztam meg a 4.4.1. fejezetben leírt módon. A minőségi értékelést követően az öt legmagasabb pMOT (%) értékkel rendelkező mintát kevertem össze és használtam fel a szaporítás során. Az egyedi ikratételeket változatonként összevontam (40 g ikra/változat), majd a spermamintával (330 μ l sperma/változat) alaposan elkevertem, ezt követően rendszervízzel aktiváltam [arány: $\sim 10:100:1$ (víz:ikra:sperma) Horváth et al., 1992]. A termékenyítést változatonként elkülönítve végeztem. Az ikra duzzasztása Woynárovich-oldattal (68 mM NaCl és 50 mM karbamid) történt (Woynárovich & Woynárovich, 1980), kb. 60-70 percig. A tételeket a csomósodás elkerülése érdekében 60 RPM (revolutions per minute, percenkénti fordulatszám) fordulatszámon rázattam egy vízszintes rázógépen (HS 501 Digital Plus Horizontal Shaker, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Németország). A ragadósság teljes elvétele érdekében az ikratételeket három lépésben kezeltem (1. 20 másodperc, 2. 15 másodperc, 3. 10 másodperc) cersavoldattal (0,5 g/l), majd mostam rendszervízzel (Woynárovich & Woynárovich, 1980). Az egyes változatok

ikratételeinek inkubációja 22–23 °C-on (oldott oxigén: 7,5 mg/l) három napig, változatoként egy-egy 7 literes Zuger-üvegben, zárt recirkulációs rendszerben történt (Horváth et al., 1992). Az ikrakeltetést a ponty hagyományos keltetőházi gyakorlatának megfelelően végeztem. A szinkronizált keltetés akkor kezdődött, amikor a lárvák kb. 2–3%-a megjelent a Zuger-üvegben. Ekkor az ikratételeket és a már kikelt lárvákat vékony műanyag cső segítségével egy csökkentett vízmennyiségű tálba eresztettem. A környező vízben lévő oldott oxigén csökkent koncentrációja serkenti és egyidejűvé teszi a kelést (Horváth et al., 2015). A szinkronizált folyamat során a potenciálisan kikelő lárvák 15 perc alatt kikeltek. A termékenyülést (%) a termékenyítést követő 24. órában (szegmentációs szakasz végén) határoztam meg a következő egyenlet segítségével: termékenyülési arány (%) = (termékenyült petesejt a Petri-csészében/az összes petesejt száma a Petri-csészében) × 100 (Okomoda et al., 2018). A kelési arányt (a kelés pillanatában) szintén Petri-csészében számoltam a következő képlettel: (kikelt lárvák/ikraszemek száma a Petri-csészében) × 100 (Bokor et al., 2019).

4. táblázat. A szaporítási és az ikra minőségi vizsgálatokban használt állomány testparaméterei. A változatokénti mintaelemszámok (ikrás; tejes): közönséges aranyhal $N = 8$; 7, shubunkin $N = 9$; 9, fekete teleszkópszemű $N = 7$; 7 és oranda $N = 8$; 7. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.

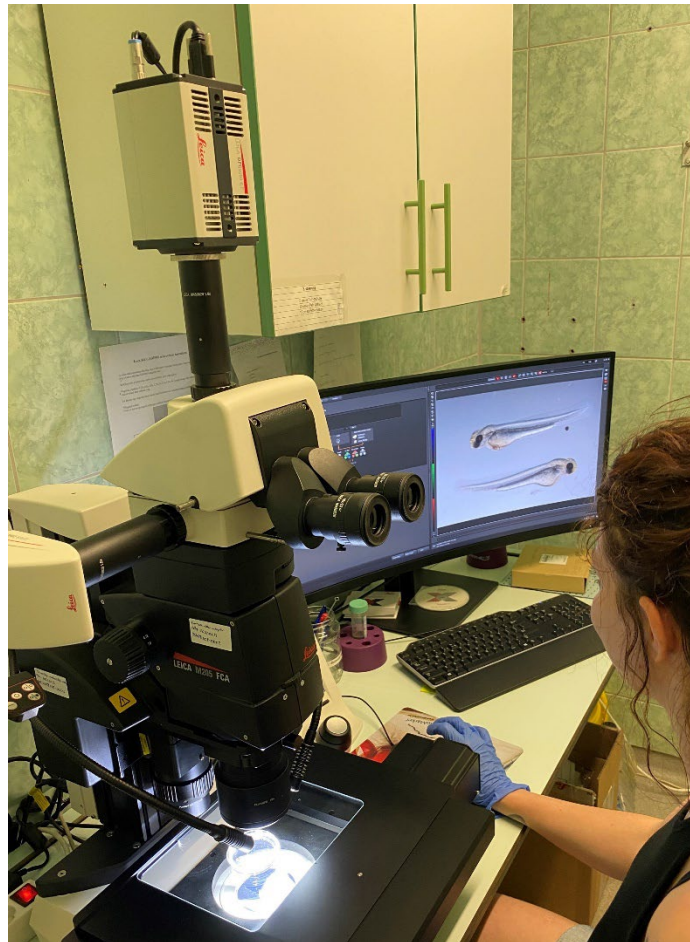
	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
Az ikrás egyedek átlagos testtömege (g)	58,3±9,8	42,1±6,5	66,9±21,6	82,9±14,6
Az ikrás egyedek sztenderd testhossza (cm)	10,0±1,0	10,2±0,7	9,0±1,2	9,4±0,7
A tejes egyedek átlagos testtömege (g)	55,9±10,7	34,1±6	48,4±11,6	52,7±8,6
A tejes egyedek sztenderd testhossza (cm)	11,6±0,9	9,5±0,6	8,4±0,9	8,1±0,5

A szaporítási vizsgálat eredményeinek értékelését a 4.3. fejezetben bemutatott programokkal végeztem. Az adatok normális eloszlásának vizsgálatára ($p < 0,05$ szignifikanciaszinten) Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztam. A normáeloszlást nem mutató adathalmazt arkuszszinus-négyszetgyök [pMOT (%)] és logaritmikus transzformációval [VCL (μ l/s), ALH (μ m), BCF (Hz)] transzformáltam. A különböző csoportok összehasonlítását egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) végeztem. A post hoc összehasonlításokhoz Tukey-, illetve Dunnett-féle T3-próbát használtam ($p < 0,05$). A termékenyülési és kelési arányt esélyhányadossal (Odds ratio) határoztam meg (szignifikancia szint: $p < 0,05$).

4.4.3. Lárvafejlődési vizsgálat

A szaporítási vizsgálatból származó lárvák PLC vezérelt recirkulációs Rack rendszerbe kerültek. A kísérleti rendszer 30 db egyenként 10 literes tartályból állt, biológiai és UV-szűrővel ellátva, 21–22 °C-on. Literenként 50 egyedet helyeztem négy akváriumba, két ismétlésben. A véletlenszerű mintavételezés három alkalommal történt a 0., 3. és 10. napon. A kelést követően változatanként 60 mintát gyűjtöttem, ezt követően 2×500 lárva/változatot helyeztem ki. A 3. és 10. napon minden tartályból alkalmanként 30–30 mintát vettem. A vizsgálat során összesen felhasznált lárvák száma 180/változat. A lárwanevelési kísérlet során a lárvák etetését 3 dph-tól 10 dph-ig sórak (*Artemia salina*) naupliákkal biztosítottam naponta háromszor *ad libitum*. A vizsgálatok előtt a lárvákat 168 mg/l MS222-vel (tricain-metán-szulfonát, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) (Matthews & Varga, 2012) bódítottam. Ezt követően a fényképek elkészítéséhez az egyedeket 3%-os metilcellulóz-oldatba (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) helyezve rögzítettem. A lárvákról $20\times$ nagyításban, 80 ms záridővel készítettem felvételeket a Leica M205 FA sztereomikroszkóphoz csatlakozott Leica DFC 7000T digitális kamerával, a Leica Application Suite X szoftver (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország) használatával (8. ábra).

A rögzített képek nem kizárólag a fejlődési rendellenességek vizsgálatára voltak alkalmasak, hanem az egyes változatok fejlődési homogenitásának ellenőrzésére is. A lárváknál vizsgált fejlődési rendellenességeket az alábbi csoportokba soroltam: szomiták – rosszul definiált/hiányzik, notochord – görbült/rosszul definiált, farok – torzult, uszonyok – kicsi/szabálytalan szélű, szív – rendellenes méret, feji régió – torzult, agy – csökkent/összenyomott, állkapocs – rendellenes alakulás, bél – rendellenes alakulás (Panzica-Kelly et al., 2012; Bernáth et al., 2018). A lárvák ($N = 40$ /változat/fejlődési stádium) átlagos teljes testhosszát (mm) és átlagos testtömegét (mg) 0, 3 és 10 dph időpontokban rögzítettem. A megmaradási arányt (megmaradt lárvák száma/kihelyezett lárvák száma $\times 100$) minden változat esetében a nevelési kísérlet végén, 10 dph-nál határoztam meg (Bokor et al., 2015). A három stádiumban ($N = 20$ /változat/fejlődési stádium) kiszámítottam a lárvák fejlődési rendellenességének arányát is (deform lárvák száma/összes vizsgált lárva $\times 100$) (Bernáth et al., 2018).



8. ábra. Aranyhal lárvák sztereomikroszkóppal történő fényképezése fejlődési rendellenességek meghatározása céljából (Forrás: Dr. Molnár József).

A lárvafejlődési vizsgálat eredményeinek értékelését a 4.3. fejezetben bemutatott programokkal végeztem. Az adatok normális eloszlásának vizsgálatára ($p < 0,05$ szignifikanciaszinten) Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztam. A normális eloszlást nem mutató adathalmazt [(testhossz (mm); testtömeg (mg))] logaritmikus transzformációval transzformáltam. A különböző csoportokat kétszemponyos varianciaanalízissel (ANOVA), a szignifikáns eltérések azonosítására Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztam ($p < 0,05$ szignifikanciaszinten). A deform lárva arányát és a megmaradási arányt esélyhányadossal (Odds ratio) határoztam meg (szignifikancia szint: $p < 0,05$). A különböző fejlődési stádiumokban mért lárvafejlődési mutatók, valamint a fejlődési rendellenességek és az aranyhalváltozatok közötti összefüggések vizsgálatára permutációs varianciaanalízist (PERMANOVA) alkalmaztam. A változatok közötti elkülönülést meghatározó mintázatok és a legnagyobb magyarázó erejű paraméterek feltárására lineáris diszkriminancia-analízist (LDA) végeztem.

4.5. A sperma mikrobiótájának vizsgálata

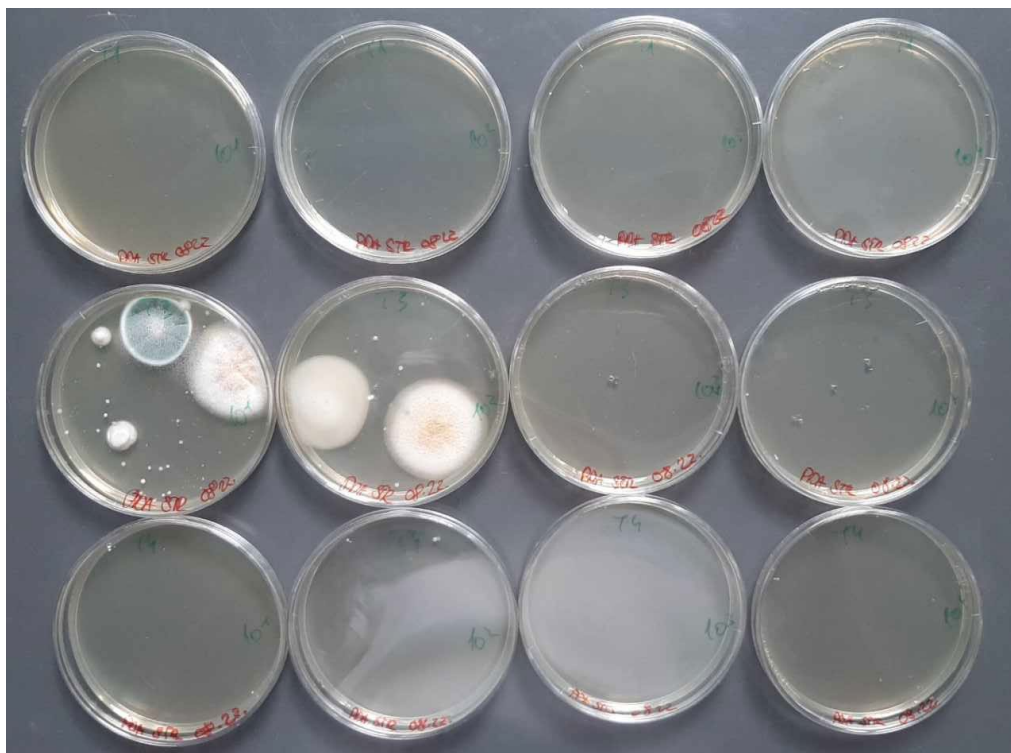
A mikrobiológiai vizsgálatokhoz használt tejes állomány (5. táblázat) mintavételt megelőző hormonkezelése, valamint fejése a korábbi, 4.1.2. fejezetben leírtakkal azonos módon történt, kiegészítve a mintavételt megelőző urogenitális nyílás alkoholos (70%-os etanol) fertőtlenítésével.

5. táblázat. A mikrobiológiai vizsgálatokban használt állomány testparaméterei. A vizsgálatonkénti mintalemszám: $N = 3$ /változat. Az adatok átlagértékeket és szórást jelölnek.

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
A tejes egyedek átlagos testtömege (g)	93,3±23,7	75,5±11,8	45±19,9	153,8±40,5
A tejes egyedek sztenderd testhossza (cm)	12,8±0,9	12,9±0,7	8,1±1,0	11,8±1,0

4.5.1. Rövidtávú tárolás

A lefejt spermából mintánként 10 µl-t szélesztettem ki agarlemezekre. A mintákból 100 µl felhasználásával tízszeres hígítási sort készítettem foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS: 8 g NaCl, 0,2g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄; 1 l desztillált víz) (Radó, 2019). A hígításokat steril mikrocentrifuga csövekben készítettem, a hígított mintákból 100 µl-t oltottam ki a táptalajok felszínére, majd steril szélesztőbot segítségével egyenletesen szélesztettem. A mintákból megmaradt 200–300 µl rövid távú tárolását, 4 °C-on 96 órán át végeztem. A minták steril oxigéncseréje 24 óránként történt lamináris fülke alatt. Az inkubációs idő leteltével PBS alkalmazásával ismételtén készítettem egy hígítási sort. A baktériumok telepképző egységeinek számát (CFU/ml) *Aeromonas* agar (AER) és tripton-szója agar (TSA) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) táptalajokon határoztam meg. A TSA táptalaj az összcsíraszám meghatározására szolgált, míg az *Aeromonas* agar szelektív módon az *Aeromonas* nemzetségbe tartozó baktériumok kimutatását tette lehetővé. A potenciálisan antibiotikum-rezisztens baktériumok kimutatása céljából szelektív tenyésztést végeztem gentamicinnel dúsított Mueller-Hinton Agar (MH) táptalajon (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A gombák tenyésztéséhez burgonya dextróz agar (PDA) táptalajt alkalmaztam, melyet a baktériumtelepek felszaporodásának visszaszorítása érdekében sztreptomomicinnel (SZ) dúsítottam. A baktériumok telepképző egységeinek számát (CFU/ml) 48 órás, 28 °C-on történő inkubálást követően határoztam meg. A gombatelepek izolálásához 25 °C-on, 5 napig inkubáltam a mintákat (9. ábra).



9. ábra. A változatok spermamintái PDA+SZ táptalajon szélesztve, 25 °C-on, 5 napos inkubációt követően (Forrás: saját felvétel).

4.5.2. Hosszútávú tárolás

A spermát, egy korábban a fejes domolykó (*Squalius cephalus*) esetében sikeresen alkalmazott hígítóban: 205 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH: $8,0 \pm 0,02$ (Bernáth et al., 2025), 0,25 ml-es műszalmába töltve mélyhűtöttem 1:9-es hígítási arány és 10% metanol (védőanyag) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) hozzáadása mellett. A minták hűtése 5 percig zajlott folyékony nitrogén gőzében, 3 cm-el annak felszíne felett (Bernáth, 2016; Várkonyi, 2021). A fagyasztott ivartermék tárolása 5 hónapig tartott folyékony nitrogént tartalmazó kanniszeres kannában (VWR XSS 48/10, VWR International Ltd., Debrecen, Magyarország) történt, $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A minták felolvasztását $40 \text{ }^\circ\text{C}$ -os keringetős vízfürdőben (Thermo Haake P5, Thermo Electron Corp, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) végeztem, mintánként 5 másodpercig (Bernáth, 2016). A fagyasztást megelőzően és a felolvasztást követően rögzítettem a sperma motilitási és kinetikai paramétereit a 4.4.1. fejezetben ismertetett módon, valamint meghatároztam a minták mikrobiális közösségét. A lefejt és felolvasztott spermából mintánként $10 \text{ }\mu\text{l}$ -t szélesztettem ki, majd steril PBS alkalmazásával $100 \text{ }\mu\text{l}$ felhasználásával hígítási sort készítettem. A tenyésztést, a rendelkezésre álló sperma korlátozott mennyisége okán, nem szelektív TSA és PDA+SZ táptalajokra végeztem. A baktériumok telepkepző egységeinek számát (CFU/ml) $28 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 48 órás inkubáció után határoztam meg, míg a gombák izolálása céljából a mintákat $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 5 napig inkubáltam. A mélyhűtés során

alkalmazott hígítóból és a minták olvasztásához használt vízből szintén elvégeztem a tenyésztést a fent említett táptalajokra az esetleges kontaminációk vizsgálata céljából.

A rövid- és hosszútávú tárolási vizsgálatok eredményeinek értékelését a 4.3. fejezetben bemutatott programokkal végeztem. A telepképző egységek számának és a spermiumok mozgási paramétereinek összehasonlítására Kruskal–Wallis-próbát alkalmaztam. Szignifikáns eltérés esetén a páronkénti összehasonlításokat Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel végeztem ($p < 0,05$).

4.5.3. Izolált törzsek identifikációja

Baktérium törzsek

A baktérium telepek tisztítása, szükség szerint több körben, TSA táptalajon, 28 °C-on inkubálva történt. A típusos telepek fajszintű azonosítását részleges 16S rRNS-szekvenálással végeztem. A DNS izolálást DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával végeztem a gyártói útmutatás alapján. A DNS minőségét gélelektroforézisben ellenőriztem. A vizsgálni kívánt DNS szakasz felsokszorozítása PCR (Mastercycler® ep gradientfrom Eppendorf, Eppendorf, Hamburg, Németország) segítségével DNS-polimeráz enzim alkalmazásával történt. A vizsgálataim során használt 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') és 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') a leggyakrabban alkalmazott primer pár a baktériumok faj szintű identifikációjára (Frank et al., 2008; Hou et al., 2018).

Az identifikálni kívánt DNS szakasz felsokszorozításához alkalmazott PCR Master Mix 49 µl végtérfogatra, 1 µl templát DNS-sel számolva:

- Taq puffer [(10× DreamTaq Green Buffer with 20 mM MgCl₂) Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok] 5 µl: KCl-t, (NH₄)₂SO₄-ot, valamint 20 mM MgCl₂-t tartalmazó puffer a DNS-polimeráz megfelelő működésének biztosítására,
- Forward primer [1 µM (27f)] 0,5 µl: a DNS templát (antiszensz) szálához kapcsolódó primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok),
- Reverz primer [1 µM (1492r)] 0,5 µl: a DNS értelmes (szensz) szálához kapcsolódó primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok),
- dNTP (4 mM) 10 µl: deoxinukleotid-trifoszfát, tartalmazza a DNS építéséhez szükséges nukleotidokat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok),

- Taq polimeráz [DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok)] 0,25 μl: hőstabil DNS polimeráz enzim, az amplifikálandó DNS szakasz megkettőződését teszi lehetővé,
- Milli-Q víz 32,75 μl: ultratiszta víz.

A PCR az alábbi hőprofilon zajlott le: 95 °C 3' 32× (94 °C 30" 52 °C 30" 72 °C 1') 72 °C 10' 4 °C ∞. A vizsgálatok során a PCR termékek tisztításához két szettet használtam, attól függően, hogy melyik állt rendelkezésre, melyek a maradék PCR-primerek és az amplifikáció után maradt felesleges dNTP-k foszforilálását teszik lehetővé. Az Exo-CIP™ Rapid PCR Cleanup (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) vagy ExS-Pure™ Enzymatic PCR Purification Kit (NimaGen, Nijmegen, Gelderland, Hollandia) termékeket a gyártó iránymutatása szerint alkalmaztam.

Az amplifikált DNS szakasz bázisrendjének meghatározása Sanger-, más néven láncterminációs szekvenálással történt. A folyamat során a normál nukleotidok (dNTP) mellett fluorokrómmal jelölt didezoxi nukleotidok (ddNTP) is jelen vannak, melyek beépülést követően, hidroxil csoport hiányában, gátolják a fragment további szintézisét. A szekvenáló PCR-hez a reakcióelegy egy mintára:

- Big Dye (BigDye™ Terminator v3.1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) 1 μl,
- Big Dye puffer (BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5× Sequencing Buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) 1,5 μl,
- Forward primer (27f, Eurofins Genomics, Ebersberg, Németország) 0,5 μl,
- DNS templát 4 μl,
- Milli-Q víz 3 μl.

A reakció az alábbi hőprofilon zajlott le: 96 °C 1' 28× (96 °C 10" 51 °C 5" 60 °C 4') 4 °C ∞.

A fluoreszcensen jelölt DNS visszanyerését etanolos kicsapással végeztem. A termékekhez 80 μl etanolos elegyet adtam hozzá, amely 3 μl (3 M) nátrium-acetátból (NaAc), 14,5 μl MQ vízből és 62,5 μl 96%-os etanolból állt. A mintákat 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, amit 20 percig centrifugálás (2360 × g/4600 rpm) követett 4 °C-on (Eppendorf 5810 R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Németország). A felülúszó eltávolítása után 180 μl 70%-os etanolt adtam a mintákhoz, majd ismételt centrifugálást (2360 × g/4600 rpm) végeztem 20 percig, 4 °C-on. A maradék felülúszó alkohol teljes eltávolítása érdekében a mintákat további 1 percig centrifugáltam (11 × g/1000 rpm), fejjel lefelé fordítva. A csapadékot 20 μl Hi-Di™ formamidban (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) oldottam fel, majd a mintákat 24 órán keresztül 4 °C-on inkubáltam (Tischner 2022). A Sanger szekvenálást Applied Biosystems 3500™ Genetic Analyzerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) végeztem, amely kapilláris elektroforézisen alapul, és alkalmas DNS-fragmensek elválasztására, valamint nukleotidsorrendjük meghatározására.

A reakció során kapott 16S rRNS szekvencia, mely hosszúsága 700–1490 bázispár, alkalmas a baktériumtörzsek azonosítására. A szekvenciák megjelenítéséhez, valamint azok vágásához a Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (MEGA11) (Tamura et al., 2021) szoftvert alkalmaztam. A szekvenciák azonosítása az EZBioCloud (CJ Bioscience, Inc., Seoul, Dél-Korea) nyilvános, ellenőrzött adat- és elemzési portáljának alkalmazásával zajlott. Az eljárás során a 700 bázispár küszöbértéket meghaladó szekvenciák 98,7%-nál nagyobb azonosság és a referencia genom 90%-ot meghaladó lefedettség mellett történt a faj vagy nemzetség szintű azonosítás (Chalita et al., 2024).

Gomba törzsek

A tenyésztett gombák azonosítását a sejtmagi riboszomális DNS (nrDNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) régiójának szekvenálásával végeztem. Az izolálást megelőzően a tiszta gombatenyészeteket 72 órán keresztül 25 °C-on inkubáltam 1% peptont, 2% glükózt és 0,5% élesztőkivonatot tartalmazó steril táplevesben. A kivonást egy kacsnyi mennyiségű micéliumból végeztem. A sejtek feltárásához mechanikai (2 g kvarchomok mintánként; fehér kvarc, 50–70 mesh, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) és kémiai módszert alkalmaztam: mintánként 300 µl 10%-os Na-lauroil-szarkozinát (anionos felületaktív anyag) adtam a sejtfal és a membránok roncsolásának elősegítésére. A minták kézi homogenizálóval történő homogenizálását 20 perces inkubáció követte 65 °C-on, Dry Block termosztát (Bio TBD-100, Biosan, Riga, Lettország) berendezésben, vortexeléssel megszakítva. Ezt követően a mintákat jégre helyezve szobahőmérsékletűre hűtöttem (5–10 perc), majd 150 µl (3M, pH 5,5) Na-acetátot adtam hozzá. A fázisokat 5 perc, 11340 g-n történő centrifugálással választottam szét. A DNS kicsapását a felülúszóhoz (kb. 300 µl) 1 ml hozzámért -20 °C-os, 70%-os izopropanollal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) végeztem. Az elegyítést 15 perc 11340 × g történő centrifugálás követte. A felülúszót leöntöttem, a pelletet két egymást követő mosással tisztítottam (1 ml, -20 °C-os 70%-os etanol), 5 perc centrifugálást követően (11340 × g) leöntöttem a felülúszót. A kicsapott DNS-t szárítást követően 30 µl steril MQ vízben oldottam fel, majd felhasználásig -20 °C-on tároltam. A DNS minőségét gélelektroforézisben ellenőriztem. A vizsgálni kívánt DNS szakasz felsokszorosítása PCR segítségével DNS-polimeráz enzim alkalmazásával történt. A vizsgálat során ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') és

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') gomba specifikus primereket használtam faj vagy nemzetség szintű identifikációra (Op De Beeck, et al. 2014; Tischner, 2022; Suhajda et al., 2025). A PCR-hez használt Master Mix reakcióelegy 23,5 µl végtérfogatra, 1,5 µl templát DNS-sel számolva:

- DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) 12,5 µl,
- Forward primer (ITS1F) 0,25 µl: a DNS templát (antiszensz) szálához kapcsolódó primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok),
- Reverz primer (ITS4) 0,25 µl: a DNS értelmes (szensz) szálához kapcsolódó primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok),
- Milli-Q víz 10,5 µl.

A PCR az alábbi hőprofilon zajlott le: 95 °C 3' 35× (95 °C 30" 55 °C 30" 72 °C 30") 72 °C 3' 4 °C ∞. A vizsgálatok során a PCR termékek tisztítását az előző 'Baktérium törzsek' alfejezetben ismertetett módon végeztem.

Az amlifikált DNS szakasz bázissorendjének meghatározása a 'Baktérium törzsek' alfejezetben ismertetett módon történt. A reakcióelegy egy mintára:

- Big Dye 1 µl,
- Big Dye puffer 1,5 µl,
- Forward primer (ITS1F, Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) 0,5 µl,
- DNS templát 2 µl,
- Milli-Q víz 5 µl.

A reakció az alábbi hőprofilon zajlott le: 28× (96 °C 10' 50 °C 5" 60 °C 4') 4 °C ∞.

A DNS minták kicsapását 'Baktérium törzsek' alfejezetben ismertetett módon végeztem. A nyers szekvenálási adatokat FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Denver, Colorado, Amerikai Egyesült Államok) szoftverrel ellenőriztem és korrigáltam. A szekvenciák azonosítását az NCBI BLAST rendszerében, a Nucleotide BLAST (BLASTn) alkalmazásával végeztem (Tischner, 2022; Suhajda et al., 2025).

4.6. Szövettani elemzés

Az anyaállomány (6. táblázat) tartása és kezelése a 4.1. fejezetben leírt módon zajlott. A halak leölése az egyedek fenoxietanollal (0,6 ml/l) történő túlaltatásával történt. A kopoltyúmozgás megszűnését követően 10-15 perccel az egyedek elhullását egy másodlagos fizikai módszerrel, a koponya alatti gerincszakasz átvágásával erősítettem meg (Heo, 2013). A vizsgálathoz a here és a

petefészek egészét gyűjtöttem be, majd mérést követően meghatároztam a GSI értékét az ivarszerv tömegének testtömeghez viszonyított arányából. Az ivarszerveket feldolgozásig 8%-os pufferolt formaldehid oldatban (Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország) tároltam. A felboncolt szervrészeket szövettani kazettákba helyeztem, majd a mintákat a következőképpen fixáltam: az automatizált szövettelőkészítő-gép (Shandon Citadel 2000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) segítségével három lépésben Patosolv (70%, 90%, 100%) és két lépésben Patoclear oldatban (Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország) dehidratáltam, majd xilol oldatos (Xylene, Biochem Chemopharma, Cosne-sur-Loire Cours, Franciaország) mosást követően paraffinban (Histoplast, Eprelia Holdings Ltd., Portsmouth, NH, Amerikai Egyesült Államok) fixáltam. A szervrészeket ezt követően beágyazó készülékkel (Leica HistoCore Arcadia H+C, Deer Park, IL, Amerikai Egyesült Államok) paraffinba ágyaztam. A beágyazott blokkokból 2–5 µm-es metszeteket készítettem félautomata mikrotómmal (Leica RM2245 Microtome, Deer Park, IL, Amerikai Egyesült Államok), amelyeket 42–45 °C-os vízfürdőben és fűtőlapon (HIR-3D és HP-3, Kunz Instruments Ab, Nacka, Svédország) tárgylemezre rögzítettem, majd ezt egy éjszakás 42 °C-os inkubáció követte. A minták festése hematoxilín (Gill 2 Hematoxylin, Eprelia Holdings Ltd., Portsmouth, NH, Amerikai Egyesült Államok) és eozin (Eosin Y solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) festékekkel történt lemezfestő gép (Shandon Varistain 24-4 A, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) alkalmazásával. A here metszetek esetén a festett mintákról öt-öt mezőt rögzítettem QCapture Pro 6 szoftverrel (QImaging, Surrey, BC, Kanada) fénymikroszkóphoz (Nikon Eclipse 600, Auroscience Kft., Budapest, Magyarország) csatlakoztatott kamerán (MicroPublisher 3.3 RTV, QImaging) keresztül. A spermatogenezis különböző érési szakaszaiban lévő sejtek és szövetek arányát (spermatogónium A, spermatogónium B, spermatocita, spermatida, spermium, üres lumen, kötőszövet) ImageJ 1.53 képfeldolgozó programmal határoztam meg. Az ikrás egyedek esetében az oogenezis érési szakaszaiban lévő sejtek arányának meghatározása manuálisan, a mikroszkópon keresztül történt. A vizsgálat során a következő stádiumokat különítettem el: perinukleoláris, kortikális alvelus, vitellogenikus, érett, valamint atretikus állapot. Az értékelés a metszetek teljes területére kiterjedt, átlagosan 721±408 sejt/metszet alapján.

A szövettani vizsgálat eredményeinek értékelését a 4.3. fejezetben bemutatott programokkal végeztem. Az adatok normális eloszlásának vizsgálatára Shapiro-Wilk tesztet használtam ($p < 0,05$). A nem normális eloszlást mutató adatsorokat arcsin függvényrel (perinukleoláris, vitellogenikus, érett, atretikus) transzformáltam. Az oogenezis fázisaiban lévő sejtek arányát egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA), Tukey és Dunnett's T3 posthoc tesztekkel hasonlítottam össze ($p < 0,05$) a változatok között. A spermatogenezis különböző szakaszaiban

lévő sejtek arányának összehasonlítására a változatok között Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztam ($p < 0,05$).

4.7. Génexpresszó meghatározás RT-qPCR segítségével

A kísérleti egyedek számának minimalizálása érdekében a vizsgálati állomány (6. táblázat) megegyezett a szövettani vizsgálathoz használttal. A vizsgálandó egyedek agy és here szöveteit kriocsövekbe helyeztem. A minták tárolása feldolgozásig 2 ml-es kriocsövekben, folyékony nitrogént tartalmazó kanniszteres kannában történt, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A minták RNS izolálását TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, Amerikai Egyesült Államok) oldattal végeztem a gyártó protokollja alapján (Balogh 2024). A vizes és szerves fázisok szétválasztása (fázisszétválasztás) kloroformmal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) történt, melynek során az RNS a felülúszó, átlátszó, rétegben maradt. Az RNS kicsapása során izopropanolt adtam az elkülönített felülúszó réteghez. Centrifugálást követően a pellet mosását 75%-os etanollal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) végeztem. Az RNS-t, az alkohol teljes eltávolítása után, nukleázmentes vízben oldottam fel. A mintákban előforduló DNS maradéktalan eltávolítására DNáz (DNase I, Thermo Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) kezelést végeztem. Az RNS koncentrációját és minőségét spektrofotométerrel (NanoDrop One, Thermo Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) mértem. A komplementer DNS-t (cDNS) random hexamer primer, valamint reverz transzkriptáz enzim (Random Hexamer Primer, RevertAID Reverse Transcritase, Thermo Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) felhasználásával, annak gyártói útmutatója alapján készítettem. A háztartási, illetve a vizsgált génhez alkalmazott primerek saját tervezésűek voltak, amelyeket a Primer Premier 6.25 szoftverrel (Premier Biosoft, Palo Alto, Amerikai Egyesült Államok) készítettem. A kvantitatív valós idejű PCR (RT-qPCR) reakciót 5X Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Észtország) felhasználásával, StepOne v2.3 szoftverrel (Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System, Thermo Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) végeztem. A vizsgált gén (*rln3a*) kifejeződését a *beta-actin* háztartási gén (7. táblázat) (Maruyama et al. 2006) kifejeződéséhez viszonyítva, normalizált mRNS szintben fejeztem ki (Ivánovics, 2023).

A génexpressziós vizsgálat eredményeinek értékelését a 4.3. fejezetben bemutatott programokkal végeztem. Az adatok normális eloszlásának vizsgálatára Shapiro-Wilk tesztet használtam ($p < 0,05$). A normális eloszlást nem mutató normalizált mRNS értékeket logaritmikus transzformációval transzformáltam. Az adatokat egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA), Tukey és Dunnett T3 posthoc tesztekkel hasonlítottam össze ($p < 0,05$) a változatok között. Az

aranyhalak egyedeinél Pearson-féle korrelációt ($p < 0,05$) végeztem nyílt forráskódú R 4.4.1 szoftverrel (R Core Team 2024) a mért GSI és mRNS szintre vonatkozóan.

6. táblázat. A szövettani és génexpressziós vizsgálatokban felhasznált állomány testparamétereit. A változatonkénti mintaelemszámok (ikrás; tejes): közönséges aranyhal $N = 6; 5$, shubunkin $N = 5; 5$, fekete teleszkópszemű $N = 5; 5$ és oranda $N = 5; 5$. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek.

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
Az ikrás egyedek átlagos testtömege (g)	88,6±19	86,1±25,5	42,8±10,8	113,6±21
Az ikrás egyedek sztenderd testhossza (cm)	12,7±1	12,9±1,4	7,5±0,6	9,8±0,8
A petefészek tömege (g)	1,5±0,7	14,1±7,3	6,3±3,4	7,0±2,9
A tejes egyedek átlagos testtömege (g)	72,6±7,4	83,8±13,3	35,4±12,1	131,1±40,1
A tejes egyedek sztenderd testhossza (cm)	12,7±0,7	13,3±1,1	7,4±0,9	11,2±3,6
A here tömege (g)	1,8±0,9	5,8±1,0	2,2±1,2	3,8±1,9

7. táblázat. A real-time PCR vizsgálatokhoz használt gének és a hozzájuk tartozó primerek.

Gén	Primer	Termék méret	Tapadási hőmérséklet
<i>beta-actin</i>	F: 5'-CAGGAGATGGGAACCGCC-3'	103 bp	59 °C
	R: 5'-CAGGGCAACGGAAACGC-3'		
<i>rln3a-2ex1</i>	F: 5'-AGTGTGTCTGCTGGCTG-3'	136 bp	58 °C
	R: 5'-TGTGTTTGTCAAGGAGCGTTTC-3'		

5. Eredmények és azok megbeszélése

5.1. Az ivarsejtminőség és lárvafejlődés vizsgálat eredményei és azok megbeszélése

5.1.1. Spermaminőség meghatározás eredményei

A négy változat alap spermatológiai paramétereinek összehasonlítása során, a sperma mennyisége, a testtömeg-kilogrammonkénti sperma mennyisége és a sejtsűrűség között nem volt statisztikailag igazolható különbség (8. táblázat).

8. táblázat. A négy aranyhal változat alap spermatológiai paraméterei. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 8$, fekete teleszkópszemű $N = 8$, oranda $N = 8$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).

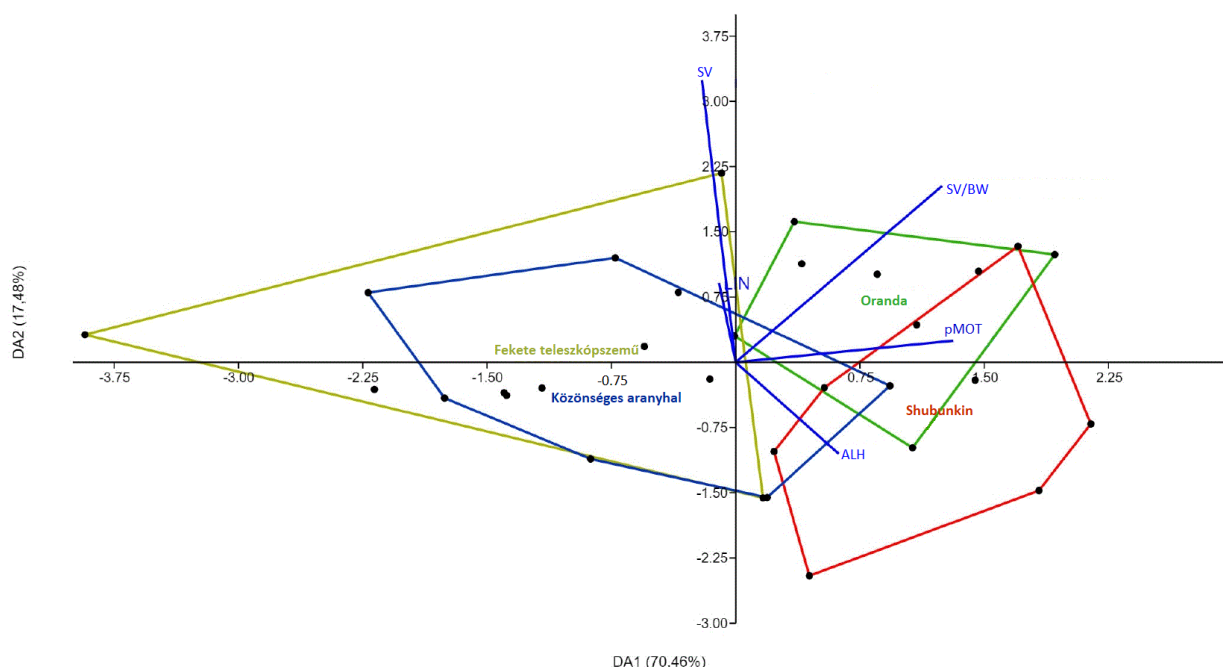
	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
SV (μl)	211±95 ^a	183±77 ^a	255±164 ^a	273±85 ^a
SV/BW (μl/ttkg)	4000±1422 ^a	5130±1735 ^a	4934±2674 ^a	6123±1385 ^a
Sejtsűrűség (spz/ml)	$34 \times 10^9 \pm 11 \times 10^9$ ^a	$34 \times 10^9 \pm 11 \times 10^9$ ^a	$36 \times 10^9 \pm 7 \times 10^9$ ^a	$34 \times 10^9 \pm 4 \times 10^9$ ^a

A CASA rendszerrel mért motilitási paraméter, azaz a pMOT esetén szignifikánsan magasabb érték volt megfigyelhető a shubunkin és az oranda csoportokban, mint a fekete teleszkópszemű változatnál. A fekete teleszkópszemű és a közönséges aranyhal között azonban nem volt statisztikailag igazolható különbség ebben a minőségi mutatóban. A sperma kinetikai paramétereinek, a VCL, VAP, LIN, ALH és BCF értékeiben nem volt jelentős mértékű eltérés a változatok között (9. táblázat).

9. táblázat. A négy változat CASA rendszerrel mért sperma motilitási és kinetikai paraméterei. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 8$, fekete teleszkópszemű $N = 8$, oranda $N = 8$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
pMOT (%)	87±7 ^{ab}	89±7 ^a	79±13 ^b	91±2 ^a
VCL (µm/s)	129±19 ^a	147±9 ^a	126±21 ^a	140±8 ^a
VAP (µm/s)	118±17 ^a	137±9 ^a	120±21 ^a	131±8 ^a
LIN (%)	78±6 ^a	80±10 ^a	85±7 ^a	83±8 ^a
ALH (µm)	2,08±0,47 ^a	2,14±0,45 ^a	1,64±0,48 ^a	1,92±0,52 ^a
BCF (Hz)	29±2 ^a	29±2 ^a	28±1 ^a	29±2 ^a

A lineáris diszkriminancia-analízis (LDA) alapján a közönséges aranyhal és a fekete teleszkópszemű változat jelentősen elkülönülnek a shubunkin és oranda változatoktól a spermaminőségi és mennyiségi paraméterek tekintetében. Az elkülönülést elsősorban a pMOT, az ALH és az SV/BW paraméterek határozták meg, amelyek magasabb értékei elsősorban a shubunkin és az oranda változatokhoz kapcsolódtak (10. ábra).



10. ábra. A négy aranyhal változat (közönséges aranyhal, shubunkin, fekete teleszkópszemű, oranda) elkülönítése lineáris diszkriminancia-analízissel (LDA) a spermaminőségi paraméterek (SV, SV/BD, pMOT, LIN, ALH) alapján.

A szaporítás során felhasznált spermaminták CASA rendszerrel mért progresszív motilitásában statisztikailag igazolható különbség volt megfigyelhető a változatok között. Az

oranda esetén szignifikánsan alacsonyabb progresszív motilitás értéket rögzítettem, mint a közönséges aranyhal és a fekete teleszkópszemű változatoknál. A shubunkin ugyanazon paramétere a többi változattal összevetve nem mutatott szignifikáns különbséget. A változatok spermamintáinak kinetikai paraméterei között nem találtam jelentős mértékű eltérést (10. táblázat).

10. táblázat. A négy változat, szaporítás során használt, CASA rendszerrel mért sperma motilitási és kinetikai paraméterei. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 7$, shubunkin $N = 9$, fekete teleszkópszemű $N = 7$, oranda $N = 7$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
pMOT (%)	92±3 ^a	84±11 ^{ab}	91±2 ^a	78±11 ^b
VCL (µm/s)	146±7 ^a	138±17 ^a	147±6 ^a	128±20 ^a
VAP (µm/s)	139±6 ^a	131±19 ^a	140±5 ^a	123±19 ^a
LIN (%)	84±6 ^a	84±7 ^a	85±14 ^a	88±3 ^a
ALH (µm)	1,84±0.36 ^a	1,79±0.20 ^a	1,88±0.41 ^a	1,54±0.28 ^a
BCF (Hz)	30±1 ^a	28±1 ^a	29±1 ^a	27±1 ^a

5.1.2. Spermaminőség meghatározás eredményeinek megbeszélése

A tejesek által termelt sperma mennyisége és a benne lévő spermiumok száma egyaránt a hímek szaporodási képességének reprezentatív paraméterei (Stacey et al., 2001). Az elmúlt évtizedekben az aranyhalak spermatermelését, elsősorban a közönséges változatét, több céllal is kiterjedten tanulmányozták. A hormonális kezelés hatásának vizsgálata során Depincé et al. (2020) 16 órával a kezelést követően 93,7±28,6 µl spermamennyiséget rögzítettek, amely a negyedik napra jelentős mértékben, 36,1±14,4 µl-re, csökkent. Taheri-Khas et al. (2024) a hormonális kezelést hőmérsékleti optimalizálással kombinálták, azonban az eltérő hőmérsékleten kezelt állományainál nem rögzítettek jelentős mértékű különbséget a spermamennyiségek között (28 °C: 366,66±49,23 µl; 22 °C: 354,16±62,00 µl; 16 °C: 304,16±68,94 µl). Ezzel összhangban Zadmajid et al. (2013) sem számoltak be évszakhoz köthető változásról. Tarkhani et al. (2012) a vizsgálatomban mért spermamennyiségek (közönséges aranyhal: 211±95 µl; shubunkin: 183±77 µl; fekete teleszkópszemű: 255±164 µl; oranda: 273±85 µl) közel kétszeresét, 0,48±0,11 ml (480±110 µl) gyűjtötték a kontrollcsoportból, míg a 17 β-ösztadiollal kezelt csoport esetén 0,44±0,10 ml-t (440±100 µl) mértek. Bozkurt (2006) kezelés nélküli vizsgálatában szintén magasabb, 0,32±0,24 ml (320±240 µl) spermamennyiséget rögzített. A szakirodalomban fellelhető adatok alapján az aranyhal spermamennyisége 60–540 µl között lehet, ami összhangban áll az

általam mért értékekkel. Mindez arra utal, hogy a sperma térfogata fajon belül is jelentős variabilitást mutathat. A környezeti feltételek, a hormonális kezelés, valamint a takarmányozás jelentős mértékben befolyásolják a hímivartermék mennyiségének alakulását, ami magyarázza az egyes vizsgálatok közötti különbségeket.

A különböző halfajok testtömeg-kilogrammonkénti spermamennyiségéről korlátozott információ áll rendelkezésre. A pontyfélék családján belül a fejes domolykó ($19,61 \pm 3,42$ ml/ttkg) (Cejko et al., 2011) és a ponty ($6,40 \pm 3,38$ ml/ttkg) (Cejko et al., 2014) esetén írtak le értékeket ebben a mutatóban. Az irodalmi adatokkal összevetve az aranyhal (közönséges aranyhal: $4,0 \pm 1,42$ ml/ttkg; shubunkin: $5,13 \pm 1,74$ ml/ttkg; fekete teleszkópszemű: $4,93 \pm 2,67$ ml/ttkg; oranda: $6,12 \pm 1,38$ μ l/ttkg) a pontyhoz közelítve, de attól is valamivel alacsonyabb testtömeg-kilogrammonkénti spermamennyiséggel rendelkezik. Ez alapján elmondható, hogy a *Carassius auratus* fajon belül a változatok között nincs jelentős mértékű eltérés, azonban családon belül, a genetikailag egymástól távolabb álló fajok között jelentős eltérések mutatkozhatnak.

A spermiumkoncentráció a sperma minőségének egyik meghatározó mutatója (Rurangwa et al., 2004; Zadmajid et al., 2013), ugyanakkor önmagában nem biztosít magas motilitást vagy termékenyülési arányt (Geffen & Evans, 2000; Williot et al., 2000; Rurangwa et al., 2004). A szakirodalmi adatok alapján az aranyhalaknál jelentős egyedi és szezonális variabilitás figyelhető meg. Zadmajid et al. (2013) évszakonkénti eltéréseket írtak le, ahol a spermiumkoncentráció a téli ($65,09 \pm 80,40 \times 10^9$ spz/ml) és nyári ($57,30 \pm 10,41 \times 10^9$ spz/ml) időszakban szignifikánsan magasabb volt a tavasszal ($48,00 \pm 7,08 \times 10^9$ spz/ml) és ősszel ($40,42 \pm 16,54 \times 10^9$ spz/ml) mért értékekhez képest. A takarmányozás szerepét több vizsgálat is kiemelte, Tizkar et al. (2015) az asztaxantin- és β -karotin-kiegészítés hatására a kontrollcsoporthoz képest magasabb sejtkoncentrációt figyeltek meg (asztaxantin: $13,8 \pm 0,4 \times 10^9$ spz/ml; β -karotin: $16,3 \pm 0,4 \times 10^9$ spz/ml; kontroll: $11,4 \pm 0,3 \times 10^9$ spz/ml). Hasonló nagyságrendű értékeket közölt Bozkurt (2006) is ($13,00 \pm 2,03 \times 10^9$ spz/ml). A hormonkezelések ugyanakkor ellentétes hatást válthatnak ki, Tarkhani et al. (2012) szerint a 17β -ösztadiol csökkentette a spermaminőségi paramétereket, amely a kontrollcsoport ($6,12 \pm 0,07 \times 10^9$ spz/ml) és a kezelt csoport ($5,78 \pm 0,08 \times 10^9$ spz/ml) különbségében mutatkozott. Bernáth et al. (2017) eredményeihez (fekete teleszkópszemű, oranda, calico) hasonlóan a jelen vizsgálatban sem mutatkozott szignifikáns különbség a spermiumkoncentráció vonatkozásában az egyes változatok között. Az aranyhal spermium koncentrációját illetően a szakirodalmi adatok viszonylag tág intervallumban találhatók meg, az általam rögzített értékek (8. táblázat) mind a négy változat esetén beleesnek ebbe a széles tartományba. A közölt és az általam rögzített adatok alapján a sperma mennyisége és koncentrációja nem csak fajonként, de fajon belül is nagy mértékű variabilitást mutathat (Kowalski & Cejko, 2019). Ennek oka, hogy a genetikai meghatározottság mellett az évszakai változások, a

környezeti és tartástechnológiai feltételek, valamint a takarmányozás is jelentős mértékben befolyásolhatja a spermiumok koncentrációját és térfogatát (Zadmajid 2013; Kowalski & Cejko, 2019). A magas sejtsűrűség ugyanakkor feltehetően kompenzálja az alacsonyabb sperma mennyiséget (Alavi et al., 2007).

A spermiumok minőségének számszerűsítésére több módszer is rendelkezésre áll, de mind közül a motilitás a leggyakrabban alkalmazott eljárás, mivel számos faj esetében összefüggést mutat a termékenyítés sikerességével. Ebből kifolyólag a halak spermájának motilitását ma már az egyik legmegbízhatóbb biomarkernek tartják a sperma minőségének meghatározására (Rurangwa et al., 2004; Gallego & Asturiano, 2018). Az aranyhal változatok spermamintáinak CASA-val történő értékelését több vizsgálat során is elvégeztem (9., 10. táblázat). Az első kísérletemben a fekete teleszkópszemű tejesek spermamintái mutattak csökkent pMOT-értékeket. A többi vizsgált paraméterben nem jelentkezett különbség. A szaporítás során az oranda értéke volt szignifikánsan alacsonyabb a többi változathoz képest. Kutluyer et al. (2015) vizsgálatában az Ovopel-kezelést követően $90\pm5,0\%$ spermamotilitást mértek, míg Tizkar et al. (2015) karotinoid takarmánykiegészítéssel jelentős javulást értek el (kontroll: $89,0\pm0,7\%$, asztaxantin: $92,1\pm0,6\%$, β -karotin: $91,9\pm1,0\%$). Bernáth et al. (2017) három aranyhal változatban vizsgálták a rövid- és hosszú távú spermatárolást, a kontrollcsoportban a vizsgálatomhoz hasonló tendenciát figyeltek meg, bár alacsonyabb progresszív motilitási értékekkel (fekete teleszkópszemű: $54\pm37\%$; oranda: $79\pm15\%$; calico: $78\pm21\%$).

A VCL-értékek vonatkozásában vizsgálatom eredményei hasonlóak Bernáth et al. (2017) adataihoz (fekete teleszkópszemű $108\pm27 \mu\text{m/s}$; oranda $128\pm121 \mu\text{m/s}$; calico $116\pm24 \mu\text{m/s}$), Seyedi et al. (2021) toxikológiai vizsgálatában ugyanakkor a kontrollcsoport VCL-értékei ($44,24\pm3,01 \mu\text{m/s}$) is jelentősen alacsonyabbak voltak, a szelén-nanorészecske-kezelés pedig tovább csökkentette a spermaminőségi paramétereket. Az általuk vizsgált VAP ($31,92\pm2,83 \mu\text{m/s}$), LIN ($44,6\pm0,79\%$) és BCF ($7,15\pm1,17 \text{ Hz}$) értékek még a jelen vizsgálat alacsonyabb eredményeit is jelentősen alulmúlták.

Az eredményeim és a korábbi tanulmányok közötti eltérések összességében azt mutatják, hogy a sperma minőségi és mennyiségi paramétereit számos tényező befolyásolja, többek között az állomány eredete, a takarmányozás, a környezeti feltételek, valamint az anyaállomány és sperma kezelése. Ez hangsúlyozza a környezet és az állomány-specifikus sajátosságok figyelembevételének jelentőségét az aranyhal változatok tenyésztése és kutatási célú alkalmazása során.

5.1.3. Ikraminőség meghatározás és szaporítási vizsgálat eredményei

Ikraminőség meghatározás

Az ikrás egyedek alap szaporodásbiológiai paramétereiben jelentős eltéréseket rögzítettem a változatok között. Az oranda esetén szignifikánsan magasabb PGSI értékek voltak megfigyelhetők, mint a közönséges aranyhal és a shubunkin változatokban. Emellett a fekete teleszkópszemű aranyhalnál szignifikánsan magasabb PGSI értéket határoztam meg, mint a közönséges aranyhalnál. A grammonkénti ikraszám szignifikánsan alacsonyabb volt a fekete teleszkópszemű változatban, mint a közönséges aranyhal esetén, míg a shubunkin és az oranda változat egyik vizsgált csoporttól sem tért el szignifikánsan (11. táblázat).

11. táblázat. A négy változat ikrás egyedeinek alap szaporodásbiológiai paramétereit. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 8$, shubunkin $N = 9$, fekete teleszkópszemű $N = 7$, oranda $N = 8$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
PGSI (%)	9±5 ^a	10±4 ^{ab}	16±3 ^{bc}	18±4 ^c
Ikraszemek száma/g	1733±606 ^a	1633±387 ^{ab}	1091±69 ^b	1431±435 ^{ab}

Szaporítási vizsgálat

A szaporítási kísérlet során mind a termékenyülési, mind a kelési arányban eltéréseket találtam a változatok között. Az oranda esetében szignifikánsan magasabb termékenyülési arányt határoztam meg a közönséges aranyhal, a shubunkin és a fekete teleszkópszemű változatokhoz képest. A fekete teleszkópszeműnél szignifikánsan alacsonyabb kelési arányt rögzítettem, mint a másik három változatnál (12. táblázat).

12. táblázat. A termékenyülési (közönséges aranyhal $N = 182$, shubunkin $N = 203$, fekete teleszkópszemű $N = 176$, oranda $N = 167$), és kelési (közönséges aranyhal $N = 180$, shubunkin $N = 190$, fekete teleszkópszemű $N = 130$, oranda $N = 152$) arány a négy aranyhal változatban. Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
Termékenyülési arány (%)	71 ^a	79 ^a	79 ^a	93 ^b
Kelési arány (%)	63 ^a	69 ^a	44 ^b	71 ^a

5.1.4. Ikraminőség meghatározás és szaporítási vizsgálat eredményeinek megbeszélése

Ikraminőség meghatározás

Az ikrások esetében a pszeudo-gonado-szomatikus index összefüggést mutatott a testalakkal, a nyújtottabb testű aranyhalaktól (közönséges aranyhal, shubunkin) a gömbölyded alakú (fekete teleszkópszemű, oranda) változatok felé növekvő tendencia volt megfigyelhető. Urbányi et al. (2006) a pontyfélék családjának képviselőinek vizsgálata során hasonló PGSI indexeket [bodorka (*Rutilus rutilus* L.): 18% (0,18); dévérkeszeg (*Abramis brama* L.): 20% (0,2); karikakeszeg (*Blicca bjoerkna* L.): 15% (0,15); márna (*Barbus barbus* L.): 9% (0,09)] rögzítettek a vizsgálatomban mért értékekkel (közönséges aranyhal: $9\pm 5\%$; shubunkin: $10\pm 4\%$; fekete teleszkópszemű: $16\pm 3\%$; oranda: $18\pm 4\%$). Nowosad et al. (2014) ugyanezen családon belül a nyúldomolykó (*Leuciscus leuciscus* L.) esetében szintén hasonló PGSI értékeket ($9,5\text{ °C}$: $17,6\pm 2,8\%$, 12 °C : $16,7\pm 3,8\%$ és $14,5\text{ °C}$: $18,0\pm 4,3\%$) mértek különböző felkészítési hőmérsékleteken laboratóriumi körülmények között.

Ismereteim szerint a munkám volt az első vizsgálat az aranyhal és annak változatai grammonkénti ikraszámának meghatározására, de általánosságban is elmondható, hogy nem sok szakirodalmi adat áll rendelkezésre erre vonatkozólag. A sziámi vörösúszójú márna (*Leptobarbus hoevenii*) esetén 590 ± 30 ikraszem/g-ot rögzítettek (Sutisna et al., 2023) Walser & Phelps (1993) vizsgálatukban 11–42 grammonkénti ikraszemet állapítottak meg csatornaharcsánál. Eredményeimhez (1733 ± 606 , shubunkin 1633 ± 387 , fekete teleszkópszemű 1091 ± 69 , oranda 1431 ± 435) valamivel közelebbi értéket rögzítettek az aranyhal közeli rokona, a ponty esetén 929 ± 146 ikraszem/grammal (Bishai et al., 1974). A grammonkénti ikraszemek száma fajonként eltérő az ikra méretéből és a szaporodási stratégiából kifolyólag. Az értéket befolyásolhatja továbbá az ikraszemek átmérője és a tenyészegyedek ikraminősége is, mely a genetikai meghatározottság mellett nagymértékben függ a takarmányozástól (Brooks et al., 1997; Koenigbauer & Höök, 2023). Az általam megfigyelt változatok közötti eltérések arra utalnak, hogy a mesterséges szelekció eredményeként kialakított eltérő testalakulások és az azokhoz kapcsolódó élettani sajátosságok hatással lehetnek az oociták méretére és az ikrások reprodukciós kapacitására. Ez az adat tenyésztéstechnológiai szempontból is igen jelentős, lehetővé teszi a pontos sperma/ikra arány meghatározását.

Szaporítási vizsgálat

A vizsgálatom eredményei alapján megfigyelhető különbség a négy aranyhal változat termékenyülési és kelési arányaiban, melyek részben összhangban állnak a korábbi

szakirodalomban közölt értékekkel, ugyanakkor új információkkal is szolgálnak a változatok közötti reprodukciós képességek eltéréseiről. A termékenyülési és kelési arányokat együtt értékelve, az oranda rendelkezett a legstabilabb szaporodási képességgel a vizsgálat körülményei között. A szakirodalomban közölt eredmények széles tartományt fednek le, ami jól mutatja a fajon belüli biológiai és genetikai variabilitást, valamint a tenyésztéstechnológiai lépések hatását. Tarkhani et al. (2012) vizsgálatukban 95% feletti termékenyülési arányokat rögzítettek, a 17 β -ösztradiollal kezelt csoportok esetén szignifikánsan magasabb értékeket, mint a kontroll csoportnál. Ezek az arányok a vizsgálatomban szereplő oranda változat értékeit közelítik. Ezzel szemben az általuk közölt kelési arányokkal (kontroll: ~87%) összehasonlítva mind a négy változat (közönséges aranyhal: 63%; shubunkin: 69%; fekete teleszkópszemű: 44%; oranda: 71%) jelentősen alacsonyabb eredményeket ért el. A Tizkar et al. (2015) által bemutatott tanulmányban (karotinoidokkal dúsított takarmány vizsgálata) a termékenyülési (90,0 $\pm$ 0,8%) és az inkubáció során a túlélési (jelen munkában kelési) arányt (74,3 $\pm$ 0,6%) az oranda kivételével minden általam vizsgált változat alulmúlta. Al-Khalaf et al. (2020) a legyezőfarkú aranyhalon végzett vizsgálatukban (0; 5; 10 g kakaóbabliszt kg/takarmány) a kontrollcsoport kelési aránya (72,83 $\pm$ 5,03%) szintén az oranda változat értékeihez volt hasonló. Dwiardani et al. (2020) két változat, az oranda (94%) és a rizsszemes aranyhal (93,66%) esetében, az általam orandánál kapott eredményekkel összehangban lévő termékenyülési arányt rögzítettek, ugyanakkor a kelési arány (oranda 91,83%; rizsszemes aranyhal 92,48%) jelentősen magasabb volt, mint vizsgálatomban. A fekete teleszkópszemű változat alacsony kelési aránya (44%) több irodalmi megfigyeléssel is összehangban van. Li et al. (2019) kimutatták, hogy a szimplafarkú és ikerfarkú változatok embriogenezeise eltérő mintázatot mutat, ami befolyásolhatja a túlélési arányt. Bár ez a magyarázat részben alátámasztja a teleszkópszemű változat eredményeit, az oranda (szintén ikerfarkú) magasabb kelési aránya (71%) arra utal, hogy a farokforma önmagában nem elegendő prediktor.

Ota (2021b) szerint egyes változatok embriói súlyos elváltozásokkal és magas mortalitással rendelkezhetnek, de a szimplafarkú közönséges aranyhal és a reprezentatív ikerfarkú törzsek, az oranda és a ryukin magas túlélési arányt mutatnak az embrionális fejlődés során.

5.1.5. Lárvafejlődési vizsgálat eredményei

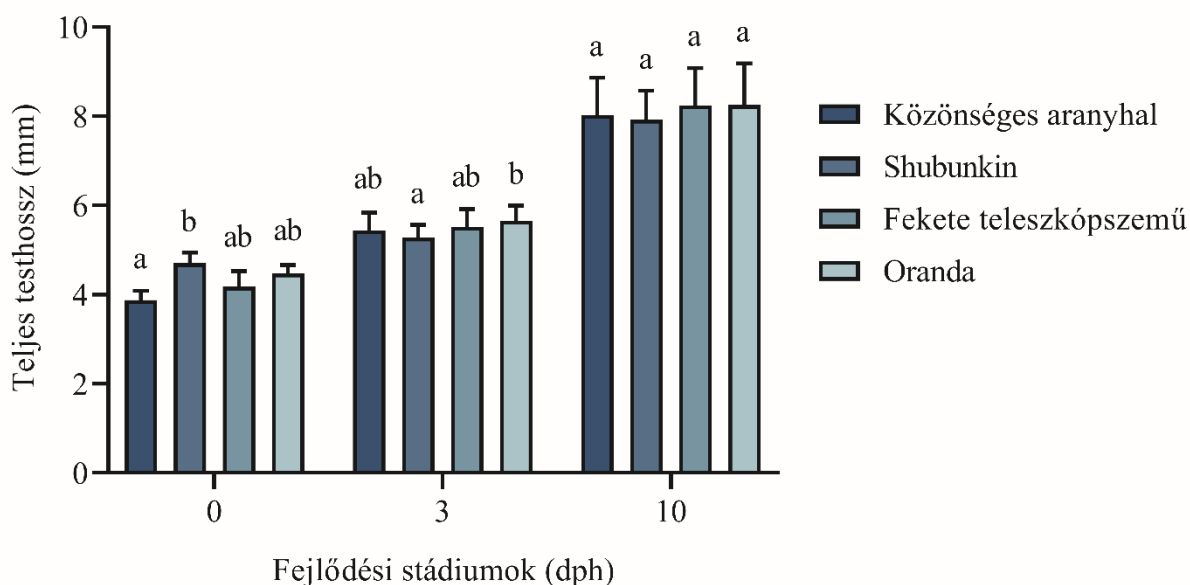
A lárvavizsgálat során a négy változat egyedeinek fejlődése a vizsgált stádiumokban viszonylag homogénnek bizonyult.

A frissen kelt (0 dph) lárvák teljes testhossz mérése során szignifikánsan alacsonyabb értéket rögzítettem a közönséges aranyhalnál (3,9 $\pm$ 0,2 mm), a shubunkin (4,7 $\pm$ 0,2 mm) változathoz képest. A fekete teleszkópszemű (4,2 $\pm$ 0,3 mm) és oranda (4,5 $\pm$ 1,0 mm) változatoknál azonban

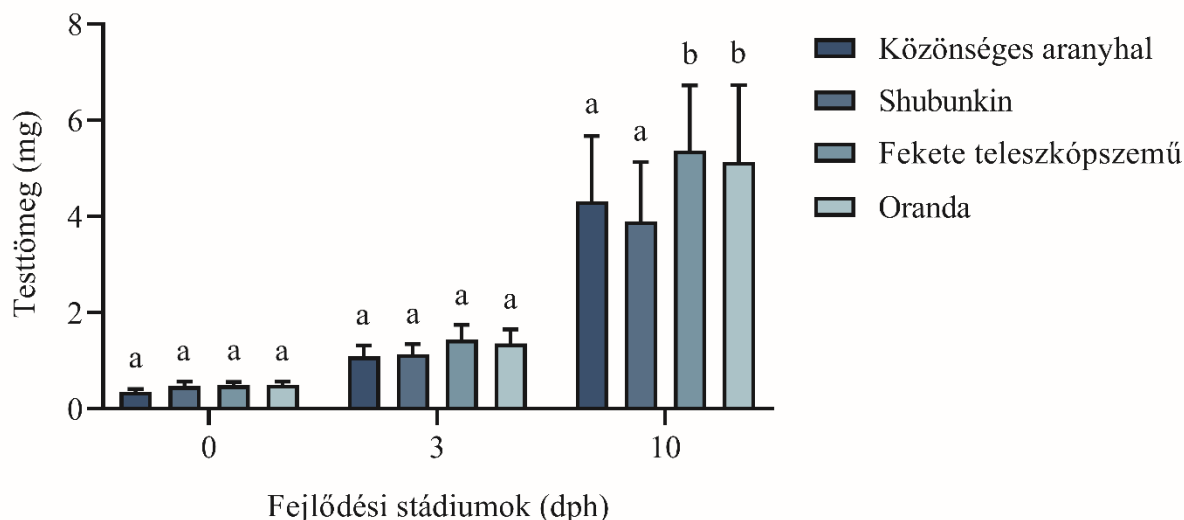
nem mértem jelentős eltérést a többi változathoz képest (11. ábra). Ugyanazon fejlődési stádium testtömeg mérésénél nem találtam különbséget a változatok között (közönséges aranyhal $0,35 \pm 0,06$ mg; shubunkin $0,47 \pm 0,1$ mg; fekete teleszkópszemű $0,49 \pm 0,07$ mg; oranda $0,5 \pm 0,6$ mg) (12. ábra).

A kelést követő harmadik napon (3 dph) a shubunkin ($5,3 \pm 0,3$ mm) teljes testhossza szignifikánsan alacsonyabb volt az orandáénál ($5,6 \pm 0,3$ mm), míg a közönséges ($5,4 \pm 0,4$ mm) és fekete teleszkópszemű aranyhálnál ($5,5 \pm 0,4$ mm) nem volt jelentős eltérés a többi változathoz képest (11. ábra). A lárvák testtömege (közönséges aranyhal $1,1 \pm 0,2$ mg; shubunkin $1,1 \pm 0,2$ mg; fekete teleszkópszemű $1,4 \pm 0,3$ mg; oranda $1,4 \pm 0,3$ mg) között nem mutatkozott jelentős különbség (12. ábra).

A 10. napon (10 dph) hasonló teljes testhossz értéket rögzítettem a közönséges aranyhal ($8,0 \pm 0,8$ mm) a shubunkin ($7,9 \pm 0,7$ mm), a fekete teleszkópszemű ($8,2 \pm 0,8$ mm) és az oranda ($8,2 \pm 0,9$ mm) esetén is (11. ábra). A nyújtott testalakú közönséges aranyhal ($4,3 \pm 1,35$ mg) és shubunkin ($3,9 \pm 1,2$ mg) változatok testtömege azonban szignifikánsan alacsonyabb volt ebben a szakaszban, mint a gömbölyű testalakú fekete teleszkópszemű ($5,4 \pm 1,4$ mg) és oranda aranyhalaké ($5,1 \pm 1,6$ mg) (12. ábra).

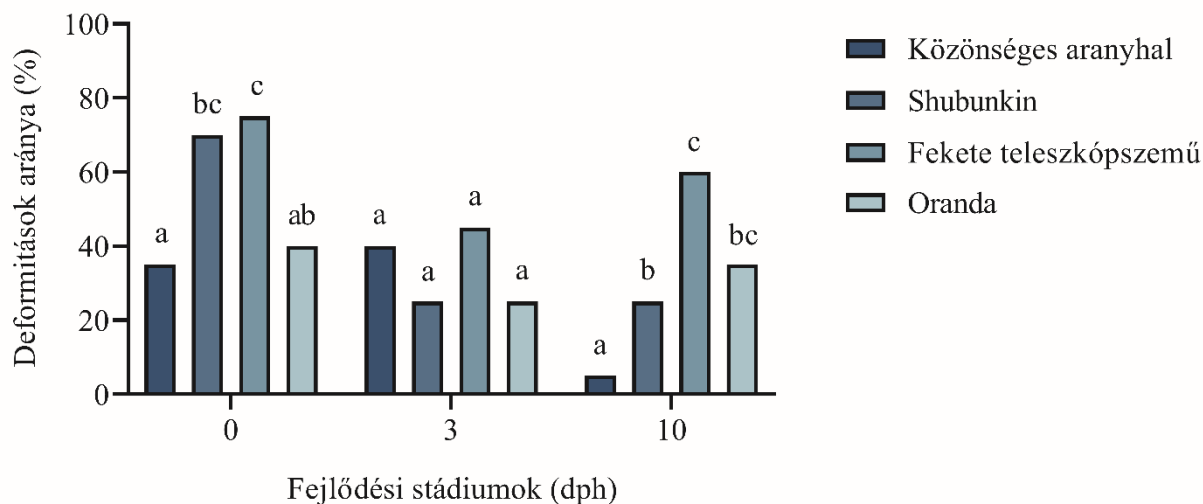


11. ábra. Az egyedek teljes testhossza 0, 3 és 10 dph fejlődési szakaszokban. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 40$ /változat/stádium). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$).



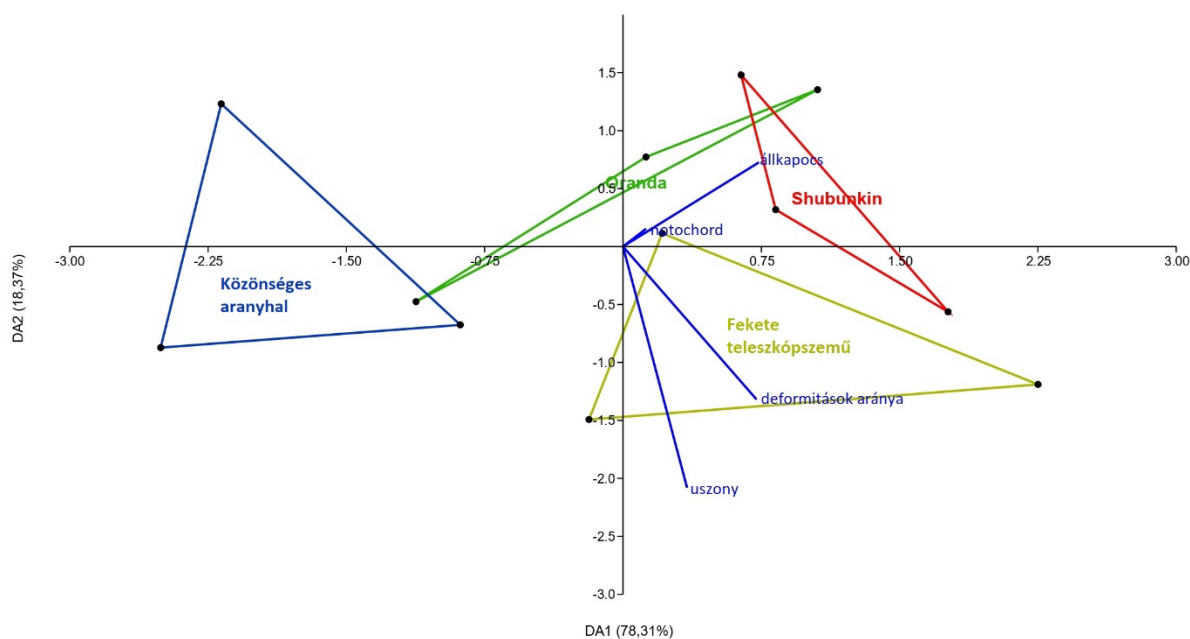
12. ábra. Az egyedek átlagos testtömege 0, 3 és 10 dph fejlődési szakaszokban. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 40$ /változat/stádium). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$).

A lárvák morfológiai elemzése során több esetben egyedenként egynél több rendellenességet figyeltem meg. Kelés után a shubunkin (70%) és a fekete teleszkópszemű aranyhalnál (75%) szignifikánsan nagyobb arányban rögzítettem morfológiai rendellenességet, mint a közönséges aranyhal (35%) és oranda (40%) változatoknál. A kelést követő harmadik napon nem volt kimutatható szignifikáns különbség a vizsgált változatoknál előforduló deformitások arányában (közönséges aranyhal 40%; shubunkin 25%; fekete teleszkópszemű 45%; oranda 25%). A 10. napon a rendellenességek előfordulása szignifikánsan alacsonyabb arányban volt megfigyelhető a közönséges aranyhalban (5%), mint a többi változatban (shubunkin 25%, fekete teleszkópszemű 60%, oranda 35%). A fekete teleszkópszemű aranyhalnál ugyanakkor jelentősen magasabb arányban rögzítettem deform lárva, mint a közönséges aranyhal és shubunkin változatoknál (13. ábra).



13. ábra. A rögzített deformítások előfordulásának aránya a négy változatban 0, 3 és 10 dph fejlődési szakaszokban ($N = 20$ /változat/stádium). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$).

Az LDA alapján a közönséges aranyhal a lárvadeformítások mintázata alapján egyértelműen elkülönült a többi változattól, és esetében összességében alacsonyabb deformítási arány volt megfigyelhető. A shubunkin változat elkülönülését elsősorban az állkapocsdeformítások magasabb előfordulása magyarázta, míg a fekete teleszkópszemű aranyhal esetében az uszonydeformítások és az összes deformítás nagyobb aránya volt meghatározó. Az oranda változat kevésbé markáns elkülönülést mutatott (14. ábra).



14. ábra. A négy aranyhalváltozat lineáris diszkriminancia-analízis (LDA) alapú elkülönülése a leggyakoribb deformitástípusok (állkapocs-, notochord- és úszódeformítások), valamint a teljes deformítási arány alapján.

A 10 napos lárvanevelés végén a megmaradási arány szignifikánsan magasabb volt a közönséges aranyhal esetén, mint a shubunkin és oranda változatoknál. A fekete teleszkópszemű nem mutatott szignifikáns eltérést a többi változathoz képest (13. táblázat).

13. táblázat. A megmaradási arány a négy aranyhal változatban ($N = 1000/\text{változat}$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott paraméter esetében ($p < 0,05$).

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
Megmaradási arány (%)	95 ^a	91 ^b	93 ^{ab}	92 ^b

5.1.6. Lárvafejlődési vizsgálat eredményeinek megbeszélése

Li et al. (2019) átfogó fejlődésbiológiai tanulmánya, a zigótától a kifejlett stádiumig, azt mutatja, hogy már a korai szegmentációs stádiumtól kezdve kimutathatók eltérések az ikerfarkú díszváltozatok (ryukin, oranda) és a szimplafarkú közönséges aranyhal változatok fejlődésében.

Ezzel a megfigyeléssel összhangban a 10 napos lárvanevelési vizsgálatban 0 és 3 dph-nál nem volt egyöntetű a változatok testhossznövekedése, azonban a 10. napon már nem mutatkozott jelentős testhosszkülönbség a változatok között. A fekete teleszkópszemű (0 dph: $4,2 \pm 0,3$ mm, 3 dph: $5,5 \pm 0,4$ mm) és az oranda (0 dph: $4,5 \pm 1,0$ mm, 3 dph: $5,6 \pm 0,3$ mm) fejlődési értékei megegyeztek az ikerfarkú változatokról, Li et al. (2019) által közölt adatokkal [3 dpf-nél (0 dph) 4,2 mm; 6-7 dpf-nél (3-4 dph) 6 mm].

Az elnyújtott testalakú, szimplafarkú közönséges aranyhal és shubunkin változatok testtömeg-növekedése a 10. napra jelentősen elmaradt a gömbölyded testalakú, ikerfarkú változatokétól, míg a fekete teleszkópszemű ($5,4 \pm 1,4$ mg) és az oranda ($5,1 \pm 1,6$ mg) egyedek 10 dph-nál nagyobb testtömeget értek el, addig a közönséges aranyhal ($4,3 \pm 1,35$ mg) és a shubunkin ($3,9 \pm 1,2$ mg) szignifikánsan kisebb értékeket mutattak. A háromnapos lárvák tömege ugyanakkor összhangban volt az Abi-Ayad & Kestemont (1994) által közölt adatokkal, ami a kezdeti fejlődési szakaszok hasonlóságára utal. A hosszúkás testforma feltehetően hozzájárulhat a kelés utáni első tíz nap lassabb növekedési üteméhez.

Kísérletemben több morfológiai elváltozást is rögzítettem, összhangban Li et al. (2019) vizsgálatával, ahol az ikerfarkú változatoknál már a korai fejlődési szakaszban úszódeformitásokat, valamint rendellenes csontváz alakulást rögzítettek. Yan et al. (2022) két ikerfarkú változat, a pirossapkás oranda és a ranchu lárváinak morfológiai vizsgálata során a ranchu változat esetén figyelt meg jelentős, a csontvázat és az úszókat érintő deformitásokat. Ota (2021d) szintén számos fejlődési rendellenességet rögzített, abnormális úszóhólyag-, hasi-, feji-, úszó- és gerincalakulást a normális testformától eltérő változatoknál (oranda, ranchu). A négy

vizsgált változat közül a legmagasabb rendellenességi arányt a fekete teleszkópszemű aranyhálnál állapítottam meg, ami összhangban áll azzal, hogy kifejlett korban ez a változat rendelkezik a legtöbb sajátos fenotípusos bélyeggel.

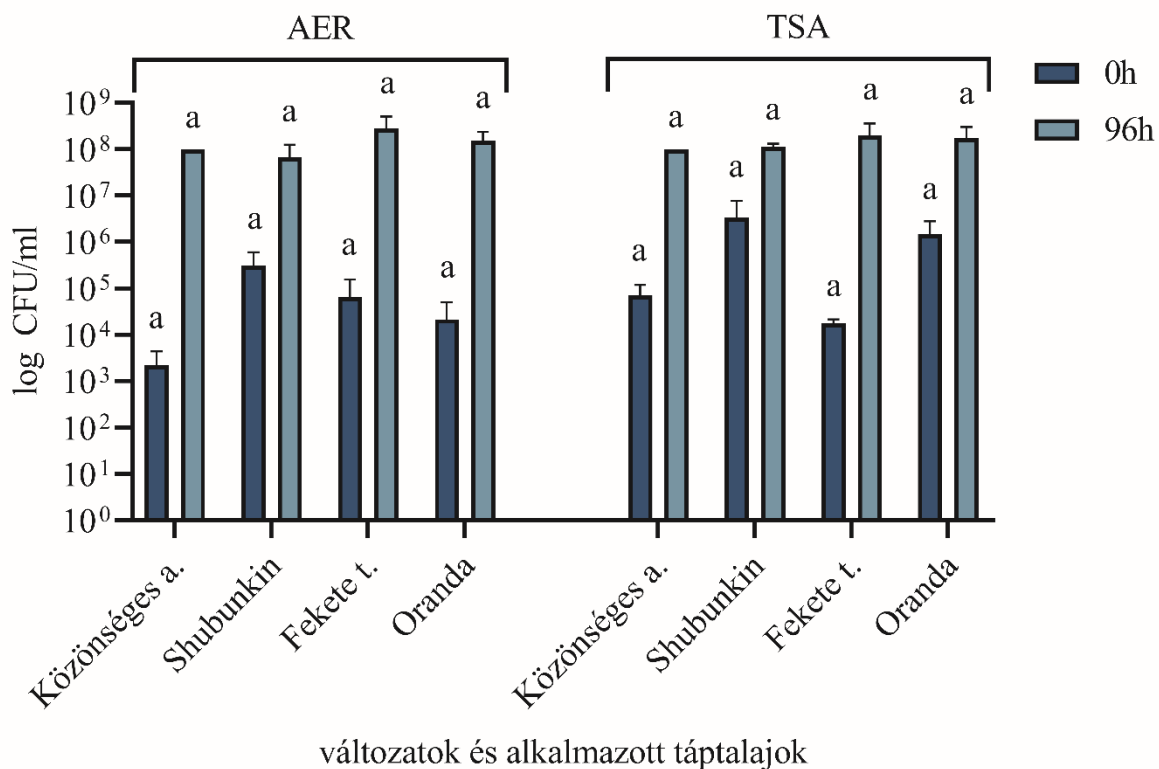
A megmaradási arányok (közönséges aranyhal 95%; shubunkin 91%; fekete teleszkópszemű 93%; oranda 92%) valamivel alacsonyabbak voltak, mint az Abi-Ayad & Kestemont (1994) által 24 °C-on leírt 97,5%, valamint Kestemont (1995) 20 °C-on mért 97,8–99,7% közötti értékei. Ugyanakkor meghaladták Mellisa et al. (2018) comet aranyhal esetében, 25–27 °C-on rögzített $85,00 \pm 5,77\%$ -os megmaradási arányt. Kaiser et al. (2003) 24 °C-on 96,4%-os eredménye szintén a magasabb értékek közé tartozott az *Artemia*-val etetett lárvák esetében, míg Mamun et al. (2025) oranda változatnál mindössze 69%-os megmaradási arányt mértek a kelést követő egy héttel (26 °C). A rendelkezésre álló megmaradási arányok a közönséges aranyhaltól eltérő változatok esetén alacsonyabbnak bizonyultak az általam mért adatoknál. Ebben szerepet játszhat a változatok genetikai hátteréből fakadó érzékenység, valamint az eltérő környezeti feltételek, mivel ezen vizsgálatokban jelentősen magasabb hőmérsékleten zajlottak a lárvanevelések. A kísérletem során kapott eredmények, különösen a közönséges aranyhaltól eltérő változatok esetén, kedvezőnek mondhatók a fellelhető vizsgálatok eredményeinek vonatkozásában.

A szakirodalmi adatokkal összevetve megállapítható, hogy a különböző aranyhalváltozatok fejlődési ütemében és a fejlődés stabilitásában jelentős eltérések mutatkoznak, amelyek feltehetően a hosszú távú mesterséges szelekció során kialakult fenotípusos és genetikai különbségekkel hozhatók összefüggésbe.

5.2. A sperma mikrobióta vizsgálatának eredményei és azok megbeszélése

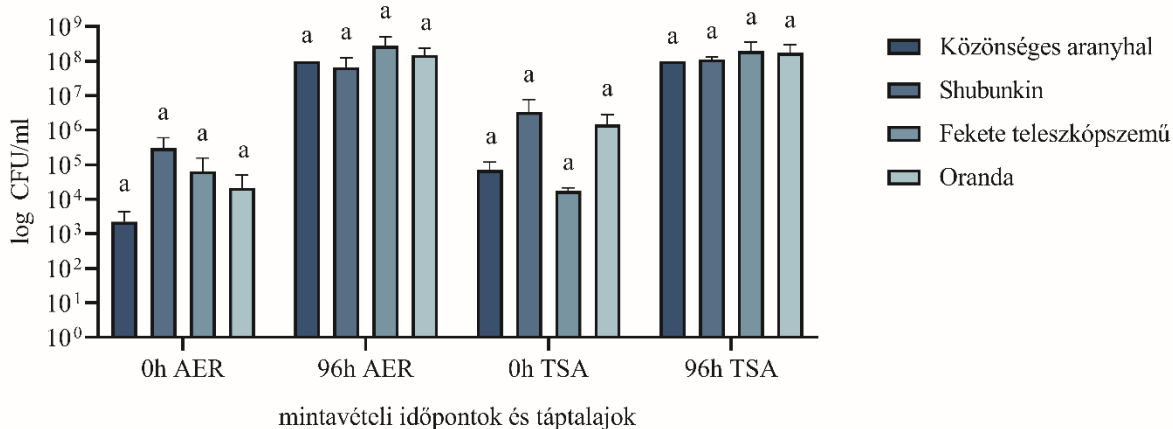
5.2.1. Rövid távú tárolás eredményei

A telepszám vonatkozásában az AER táptalajon a friss mintákban a telepszám $2,2 \times 10^3$ és $1,1 \times 10^5$ CFU/ml, míg 96 óra elteltével $6,7 \times 10^7$ és $2,8 \times 10^8$ CFU/ml között alakult. Habár nem volt szignifikáns különbség sem a változatok között adott vizsgálati időpontban, sem az adott változat mintái között 0 és 96 óránál, egyértelmű növekedés volt megfigyelhető a telepszámokban a tárolás végére (15–16. ábra).



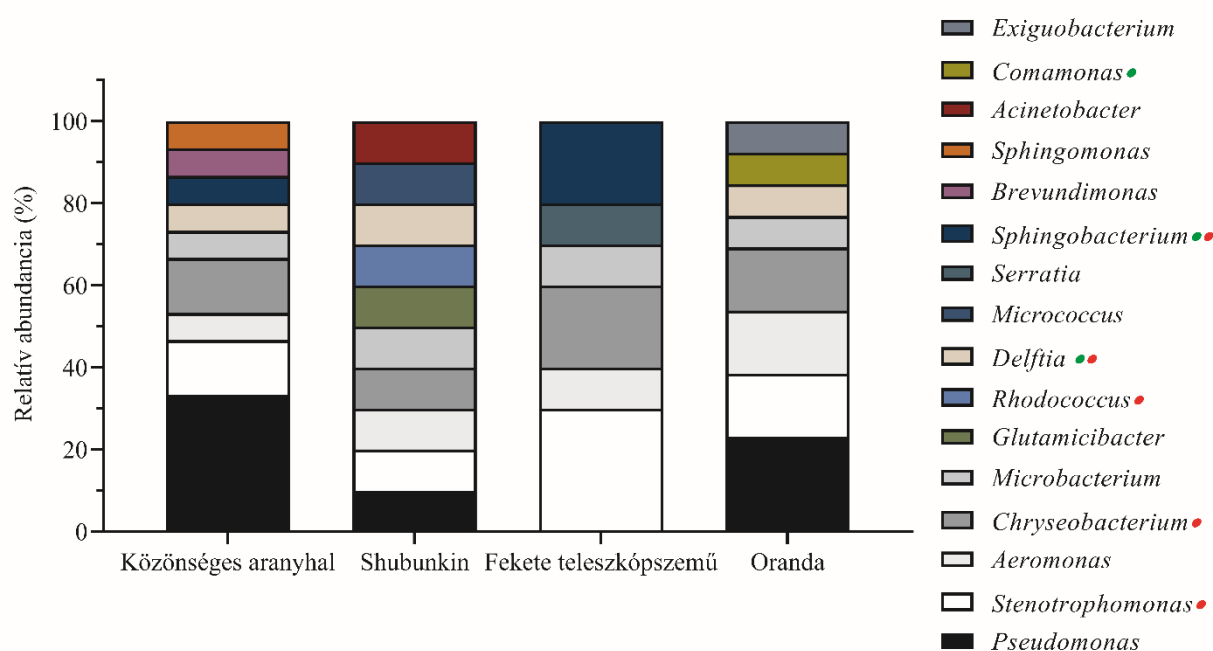
15. ábra. A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) 0 és 96 óránál, *Aeromonas* (AER) és TSA táptalajokon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmikus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3/\text{változat}$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek az egyes változatokon belül az időpontok között a két vizsgált táptalajon ($p < 0,05$).

A TSA táptalajon a friss minták $1,7 \times 10^4$ és $3,4 \times 10^6$ CFU/ml közötti értékeket mutattak, míg 96 óra elteltével valamivel egyöntetűbb, $1,1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ milliliterenkénti telepszámot rögzítettem a változatok mintáiban. A 96 órás tárolás végére egyértelmű növekedés volt megfigyelhető a kezdeti (0 h) állapothoz képest, azonban nem mutatkozott szignifikáns különbség sem a változatok, sem az időpontok között (15–16. ábra).



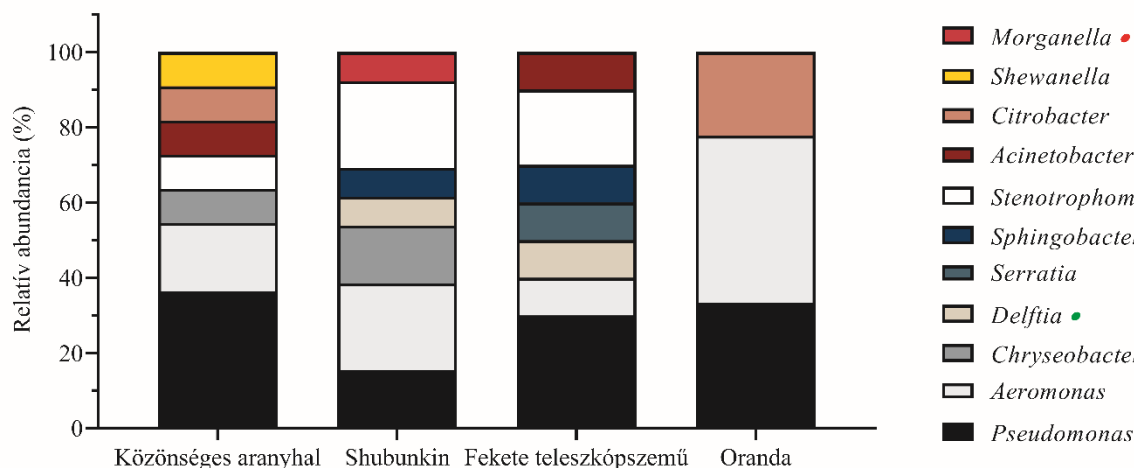
16. ábra. A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) 0 és 96 óránál, *Aeromonas* (AER) és TSA táptalajokon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmikus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3/\text{változat}$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek a változatok között azonos időpontban és táptalajon ($p < 0,05$).

A friss (0 h) minták esetén a közönséges aranyhal 15, az oranda változatokban 13 baktérium faj, míg a shubunkin és a fekete teleszkópszemű aranyhalak mintáiból, valamivel alacsonyabb számú, 10–10 faj került azonosításra. *Aeromonas veronii*, valamint a *Microbacterium*, *Chryseobacterium* és *Stenotrophomonas* nemzetségek több képviselője minden változatban megtalálható volt. A *Brevundimonas* (1) és *Sphingomonas* (1) nemzetség tagjait csak a közönséges aranyhal egy-egy egyedénél, az *Acinetobacter* (1), *Micrococcus* (1), és *Rhodococcus* (1) fajait a shubunkin szintén egy-egy egyedénél, míg *Glutamicibacter* (1) két egyedénél izoláltam. *Serratia* (1) fajt a fekete teleszkópszemű, *Exiguobacterium* (1) és *Comamonas* (1) fajokat pedig az oranda egy-egy egyedéből azonosítottam (17. ábra).



17. ábra. A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok spermamintáiban a rövid távú tárolás során 0 óránál ($N = 3/\text{változat}$). A piros pont sztreptomycin rezisztens, míg a zöld pont a gentamicin rezisztens fajok nemzetségeit jelölik.

A tárolás végén (96 h) a változatok mindegyikében a *Pseudomonas* (6), *Aeromonas* (6) és a *Stenotrophomonas* (2) nemzetség tagjai voltak többségében megtalálhatóak. *Shewanella* (1) fajt csak a közönséges aranyhal, *Morganella* (1) fajt a shubunkin változat mintáiból azonosítottam. *Serratia* (1) faj kizárólag a fekete teleszkópszemű változat esetén volt azonosítható (18. ábra). A friss mintákból, valamint a tárolást követően a *Rhodococcus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Morganella* nemzetségbe tartozó fajok fenotípusos rezisztenciát mutattak a sztreptomycin szemben (piros pont), míg a *Comamonas* nemzetség képviselőjénél gentamicin rezisztenciát (zöld pont) rögzítettem. A vizsgálat során több nemzetségnél (*Sphingobacterium*, *Delftia*, *Stenotrophomonas*) figyeltem meg a két alkalmazott antibiotikummal szembeni rezisztenciát (17–18. ábra).



18. ábra. A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok spermamintáiban a rövid távú tárolás során 96 óránál ($N = 3/\text{változat}$). A piros pont a sztreptomycin, míg a zöld pont a gentamicin rezisztens fajok nemzetségeit jelöli.

A gombatelepek vizsgálata során a rövid távú tárolás kezdeti időpontjában (0 h) a *Penicillium* nemzetség legalább egy tagját minden aranyhal változatból izoláltam. Ezen felül a fekete teleszkópszemű és az oranda esetén *Cladosporium halotolerans*t, a közönséges aranyhal és a shubunkin mintáiból *Aspergillus versicolor*t azonosítottam. A tárolás végén, 96 óra elteltével, a vizsgált változatok mintáiban kizárólag *Penicillium* fajokat azonosítottam. A *Penicillium chrysogenum* minden változatnál izolálható volt, míg a fekete teleszkópszemű, valamint az oranda változatok mintáiból további két fajt is identifikáltam.

5.2.2. Rövidtávú tárolás eredményeinek megbeszélése

A sperma rövid távú hűtve történő tárolása halak esetén egyszerű, költséghatékony módszer, amely lehetővé teszi a mesterséges termékenyítést, a szállítást és a keltetőházi munkafolyamatokat. A módszerrel fajtól és a tárolási körülménytől függően több napig megőrizhető a sperma termékenyítő képessége. Fajspecifikus hígítók alkalmazása és az optimális hőmérséklet (általában 0–4 °C) használata segít megőrizni a sperma funkcióját és megakadályozni a korai aktiválódást (Contreras et al., 2019). A tárolás során a hideg, valamint a mintákban lezajló biológiai folyamatok hatására megváltozhat a sperma mikrobiom összetétele, melynek akár negatív következményei lehetnek annak termékenyítő képességeire (Saad et al., 1988; Jenkins & Tiersch, 1997). Halak esetén a sperma tárolás során bekövetkező mikrobiomváltozásokról igen kevés adat áll rendelkezésre, ennek ellenére a szakirodalom alapján az antibiotikum alkalmazása általánosan javasolt (DeGraaf & Berlinsky, 2004). E gyakorlat alkalmazása ugyanakkor számos humán- és állategészségügyi kockázatot hordoz magában, emellett a termékenyülési arány csökkenéséhez is vezethet (Oplinger & Wagner, 2015).

A vizsgálatomban nem szelektív táptalajon mért kezdeti telepszámok ($1,7 \times 10^4$ és $3,4 \times 10^6$) összhangban állnak a Viveiros (2010) által piracanjubában meghatározott értékekkel ($1,4 \times 10^4$). A tárolás során a telepszám mindkét vizsgálatban növekedést mutatott, a Viveiros által a 2. és 4. napon mért értékek ($1,3 \times 10^6$, illetve $4,3 \times 10^8$ CFU/ml) hasonló nagyságrendűek voltak az általam 96 óra elteltével meghatározott telepszámokhoz ($1,1 \times 10^8$ – 2×10^8 CFU/ml).

A négy aranyhal változat spermamintáiból változatos baktériumközösséget izoláltam, melynek csökkenő tendenciája egyértelmű volt az idő előrehaladtával. Az azonosított baktériumnemzetségek egyaránt tartalmaztak fakultatív- és opportunistá patogén, valamint hasznos tagokat. Az *Aeromonas veronii* az édesvízi halak egyik jelentős kórokozója, mely számos virulenciagént hordoz és rendkívül jól alkalmazkodik, ezért komoly veszélyt jelent az akvakultúrára, valamint élelmiszerbiztonsági és közegészségügyi kockázatot is hordoz (Li et al., 2020). A *Pseudomonas* nemzetség tagjai igen nagy számban lelhetőek fel haltermelő gazdaságokban, akvakultúra rendszerekben, de általánosságban vizes környezetben (Duman et al., 2021). Számos képviselőjük, mint a *P. aeruginosa*, a halak normál mikrobiotájának része, azonban stresszhatások, például alultápláltság vagy túlszűfoaltság esetén a baktérium súlyos megbetegedéseket okozhat (Algammal et al., 2020). Az általunk izolált egyetlen igazoltan probiotikus hatású faj a *Micrococcus luteus* baktérium, mely nílusi tilápia esetén takarmánykiegészítésként alkalmazva javította a megmaradást, növekedést, és a halak egészségét (El-Rhman et al., 2009).

A tárolási vizsgálat végén többségében az *Aeromonas* (*A. media*, *A. rivipollensis*, *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. sp.*), a *Pseudomonas* (*P. allii*, *P. sp.*, *P. japonica*, *P. palmensis*, *P. putida*, *P. solani*), és a *Stenotrophomonas* (*S. rhizophila*, *S. geniculata*) képviselői voltak jelen, melyek többsége bizonyítottan pszichrofil (hidegkedvelő) és pszichrotoleráns (hidegtűrő) faj (Piński et al., 2020; Chauhan et al., 2023; Vincent & Charette, 2022) emellett fakultatív vagy opportunistá patogén fajok (Shameena et al., 2020; Lim & Hong, 2020). Több faj esetében is előfordult, hogy míg friss mintákból nem, a tárolás végén izolálhatók voltak. A beszennyeződés kizárása mellett feltételezhető, hogy a friss mintákban annyira kis csíraszámúak voltak jelen a később azonosított fajok, hogy nem voltak kimutathatóak.

Az általam izolált gomba nemzetségek (*Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*) mindegyike fellelhető vízi környezetben vagy vízi szervezetekben (Heydari et al., 2019). Az egyes nemzetségekbe tartozó fajok jelentős ökológiai és mikrobiológiai tulajdonságokkal rendelkezhetnek. A *Cladosporium sphaerospermum* kiemelkedő alkalmazkodóképességet mutat (Farouk et al., 2025), a *Penicillium citrinum* bioaktív anyagok termelésére képes (Terada-Nascimento et al., 2023), a *Penicillium brevicompactum* antimikrobiális aktivitással rendelkezik (Nicoletti & Trincone, 2016), míg az *Aspergillus versicolor* és a *Penicillium chrysogenum*

élelmiszer- és takarmánybiztonsági kockázatot jelenthetnek (Oliveira & Vasconcelos, 2020; Deng et al., 2021).

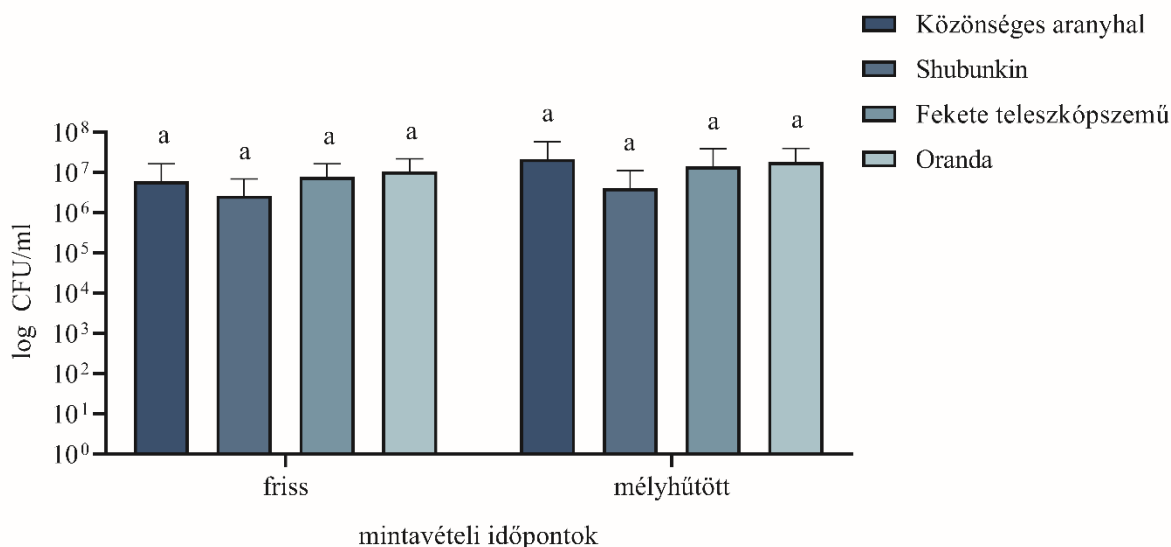
5.2.3. Hosszútávú tárolás eredményei

A hosszú távú tárolást követően a spermiumok mozgási és kinetikai paraméterei enyhén csökkentek a friss mintákhoz képest, azonban sem a friss és felolvasztott minták között az egyes változatokon belül, sem az azonos időpontban összehasonlított változatok között nem mutatkozott szignifikáns különbség (14. táblázat).

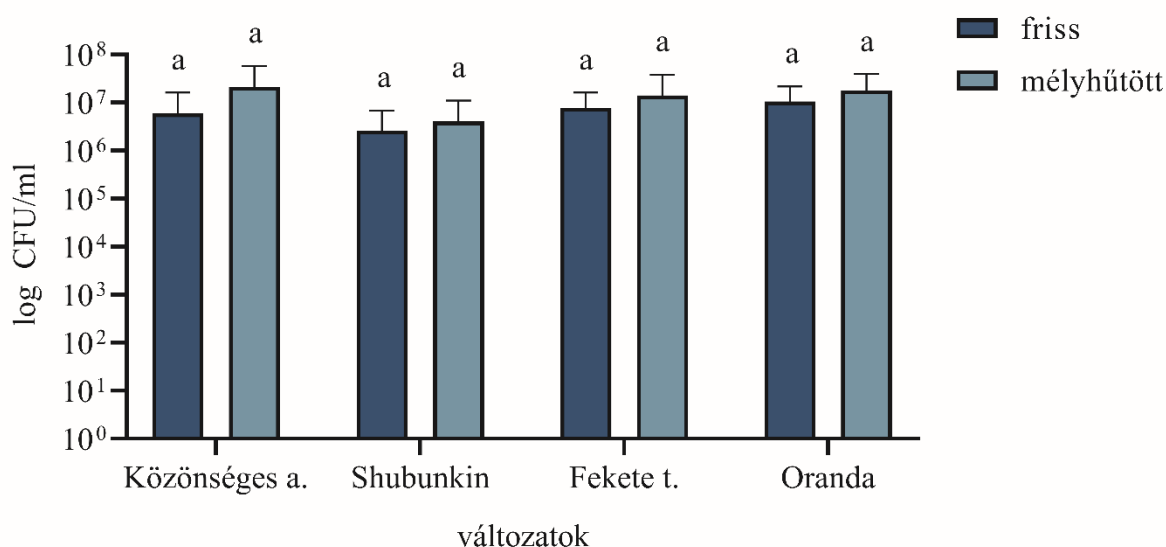
14. táblázat. A négy változat CASA rendszerrel mért sperma motilitási és kinetikai értékei mélyhűtést megelőzően és 5 hónappal azt követően. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 3/\text{változat}$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek a változatok között azonos időpontban, valamint az egyes változatokon belül az időpontok között ($p < 0,05$).

	Közönséges aranyhal		Shubunkin		Fekete teleszkópszemű		Oranda	
	friss	mélyhűtött	friss	mélyhűtött	friss	mélyhűtött	friss	mélyhűtött
pMOT (%)	83±6 ^a	57±10 ^a	56±45 ^a	56±12 ^a	94±4 ^a	60±14 ^a	84±23 ^a	60±12 ^a
VCL (µm/s)	74±22 ^a	35±6 ^a	48±41 ^a	35±15 ^a	83±20 ^a	34±7 ^a	86±44 ^a	34±13 ^a
VAP (µm/s)	63±25 ^a	28±5 ^a	40±37 ^a	28±15 ^a	67±19 ^a	26±4 ^a	70±43 ^a	26±12 ^a
LIN (%)	77±10 ^a	74±2 ^a	60±23 ^a	71±10 ^a	73±1 ^a	68±6 ^a	71±11 ^a	68±9 ^a
ALH (µm)	0,46±0,06 ^a	0,3±0,05 ^a	0,36±0,21 ^a	0,3±0,07 ^a	0,56±0,08 ^a	0,32±0,10 ^a	0,57±0,17 ^a	0,31±0,08 ^a
BCF (Hz)	12±3 ^a	7±1 ^a	6±6 ^a	6±2 ^a	14±1 ^a	7±2 ^a	11±4 ^a	8±3 ^a

A milliliterenkénti telepszámok a friss mintákban $2,6 \times 10^6$ és $1,1 \times 10^7$, míg a fagyasztott mintákban $4,1 \times 10^6$ és $2,1 \times 10^7$ között alakultak. Az elemzés alapján sem a változatok, sem a friss és felolvasztott minták között nem volt szignifikáns különbség. Míg a felolvasztást követően a telepszámok nem mutattak számottevő növekedést (19–20. ábra), a fajösszetétel jelentősen változatosabbá vált (21–22. ábra).

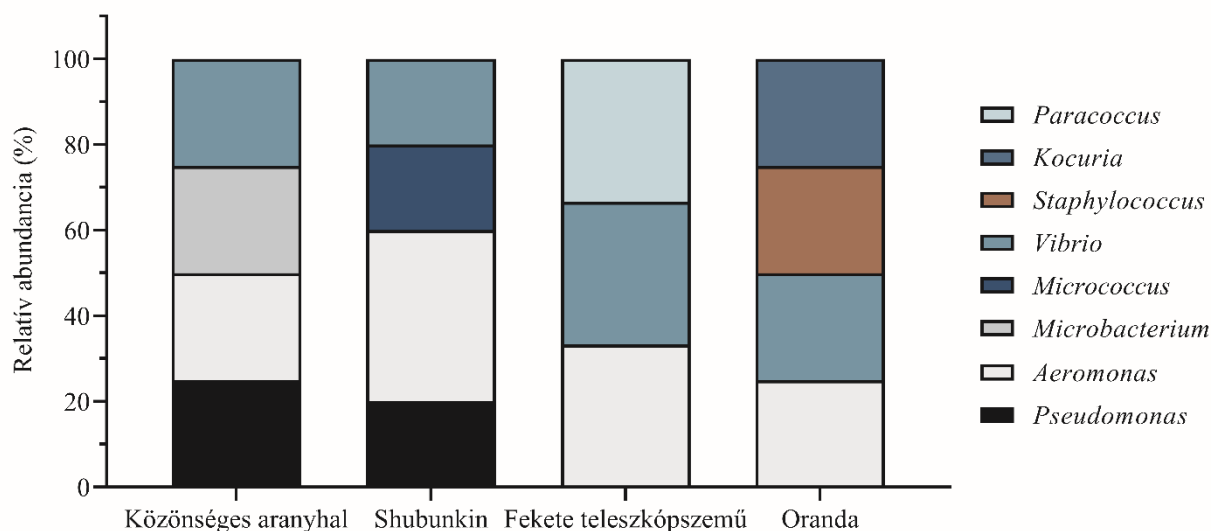


19. ábra. A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) friss és mélyhűtött mintákban TSA táptalajon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3$ /változat). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek a változatok között azonos időpontban ($p < 0,05$).



20. ábra. A négy aranyhal változat esetén rögzített telepszámok (CFU/ml) friss és mélyhűtött mintákban TSA táptalajon. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek, az értékek logaritmus skálán kerültek ábrázolásra ($N = 3$ /változat). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek az egyes változatokon belül az időpontok között ($p < 0,05$).

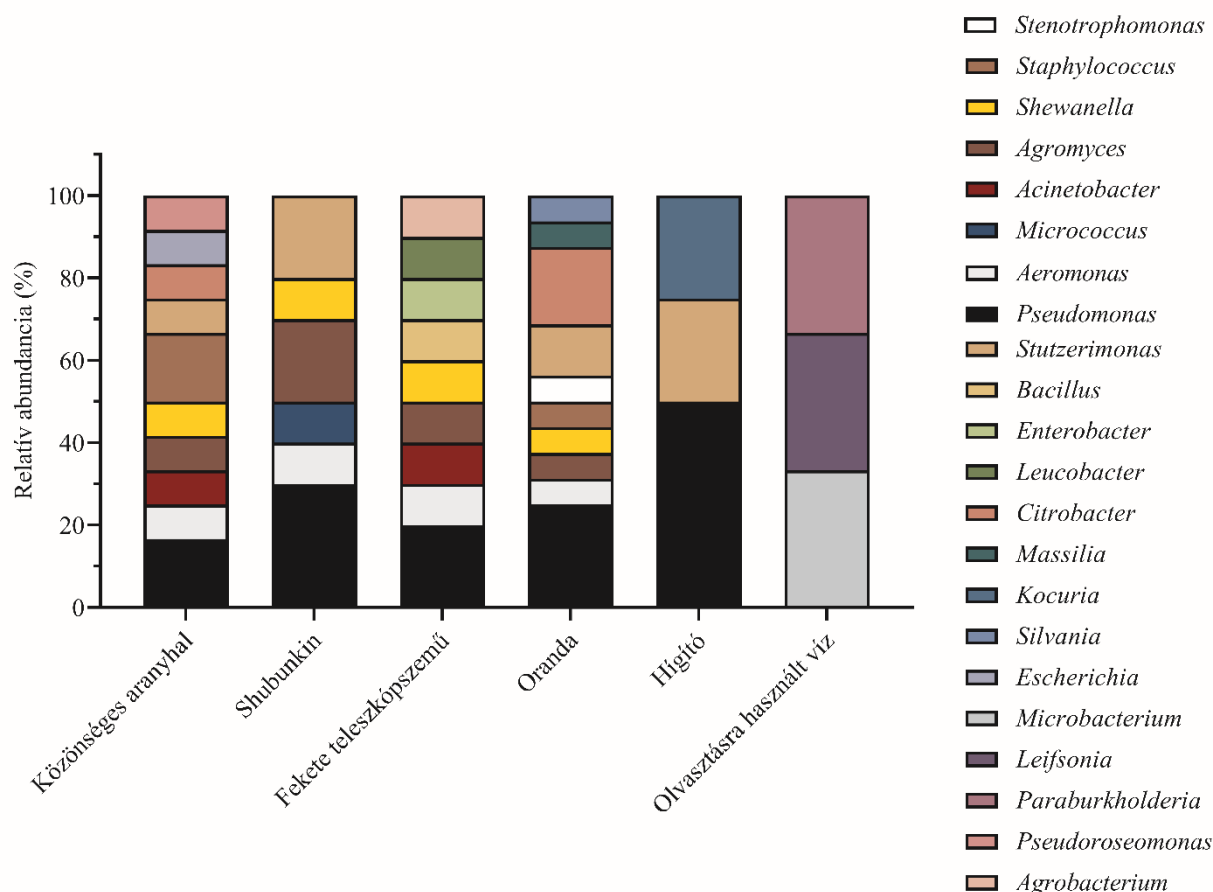
A hosszútávú tárolás kezdeti időpontjában változatonként 3–5 fajt azonosítottam a friss spermamintákból. *Aeromonas veronii*, valamint a *Vibrio* nemzetség tagjai minden változatban megtalálhatóak voltak. *Pseudomonas putida* pedig jelen volt a közösés aranyhal, valamint a shubunkin spermamintáiban. Ezen felül a közösés aranyhal mintából *Microbacterium tenebrionis*-t, shubunkinból *Micrococcus luteus*-t, fekete teleszkópszeműből *Paracoccus yeii*-t, valamint oranda-ból a *Staphylococcus* és *Kocuria* nemzetségek egy-egy képviselőjét azonosítottam (21. ábra).



21. ábra. A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok friss spermamintáiban a hosszú távú tárolást megelőzően ($N = 3/\text{változat}$).

Az öt hónapos, -196°C -on történő tárolását követően a négy változat spermájából összesen 18 baktériumnemzetség képviselőjét azonosítottam. Legnagyobb számban a *Pseudomonas* fajok fordultak elő, emellett az *Agromyces* egyes fajai és a *Shewanella xiamenensis* valamennyi változat esetében jelen voltak. A felolvasztást követően minden mintából ismét kimutatható volt az *Aeromonas veronii*, valamint a shubunkin spermájából korábban izolált *Micrococcus luteus* is. Az identifikált fajok nem voltak változatspecifikusak. A mélyhűtés során alkalmazott hígítóból négy fajt izoláltam, amelyek közül kettő, a *Pseudomonas juntendi* és a *Stutzerimonas kunmingensis*, a felolvasztott mintákban is jelen volt, ugyanakkor a minták fajdiverzitásában bekövetkezett változás ennek ellenére is számottevőnek bizonyult. A felolvasztás során használt vízből izolált fajok nem voltak visszanyerhetőek a mintákból (22. ábra).

A gombaközösség vizsgálata során friss állapotban a közönséges aranyhal spermájából egy *Penicillium* fajt azonosítottam, míg a shubunkin esetén nem izoláltam gombát. A fekete teleszkópszemű változat spermájában *Penicillium* (1), *Aspergillus* (2), valamint *Trichosporon* (1) fajokat, az orandáéban pedig *Penicillium* (3), *Aspergillus* (1), és *Cladosporium* (1) képviselői fordultak elő. Olvasztást követően a fekete teleszkópszemű aranyhal mintáiból egy *Aspergillus*, az orandáéból pedig egy *Penicillium* fajt izoláltam.



22. ábra. A baktérium nemzetségek megoszlása a különböző aranyhal változatok spermamintáiban az 5 hónapos tárolást követően felolvasztott mintákba ($N = 3/\text{változat}$).

5.2.4. Hosszútávú tárolás eredményeinek megbeszélése

A hímivartermék mélyhűtése és fagyasztva történő tárolása jelentős változásokat idéz elő, többek között a spermiumsejtek szerkezeti károsodását, a mozgási képesség csökkenését és a mitokondriális működés megváltozását. A hosszú távú tárolás során, feltételezhetően az alacsony mintaelemszámból kifolyólag, a mozgási (pMOT: közönséges aranyhal: $83 \pm 6\%$; shubunkin: $56 \pm 45\%$; fekete teleszkópszemű: $94 \pm 4\%$; oranda: $84 \pm 23\%$) és kinetikai paraméterek értékeiben nem volt jelentős különbség a kezdeti és az olvasztást követő minták (pMOT: közönséges aranyhal: $57 \pm 10\%$; shubunkin: $56 \pm 12\%$; fekete teleszkópszemű: $60 \pm 14\%$; oranda: $60 \pm 12\%$) között, mindössze csökkenő tendencia volt megfigyelhető. Ezzel szemben Bernáth et al. (2017) munkájukban szignifikáns különbséget mértek az általuk vizsgált változatok ($N = 5/\text{csoport}$) kezdeti motilitási értékei között (pMOT: oranda: $79 \pm 15\%$; calico: $78 \pm 21\%$; fekete teleszkópszemű: $54 \pm 37\%$), valamint a kezdeti és mélyhűtést követő adatok (pMOT: oranda: $46 \pm 12\%$; calico: $55 \pm 15\%$; fekete teleszkópszemű: $24 \pm 19\%$) között is.

A hímivartermék fagyasztása továbbá, hatással van a mikrobiális közösségre is, egyes vizsgálatok a minták olvasztást követő baktérium csíraszám csökkenéséről (Boonthai et al., 2016), míg más tanulmányok a fajösszetétel megváltozásáról számoltak be (Fu et al., 2024; Cojkic et al.,

2025). Boonthai et al. (2016) a pontyfélék egyik képviselőjének, a *Barbonymus gonionotus*-nak a sperma vizsgálata során, eredményeimtől eltérően, jelentősen alacsonyabb kezdeti mililiterenkénti baktérium telepszámot ($6,4 \pm 1,7 \times 10^3$) és még alacsonyabb fagyasztást követő telepszámot ($3,4 \pm 1,5 \times 10^3$) rögzítettek. Cojkic et al. (2025) bika spermán végzett vizsgálatainak eredményei hasonló mintázatot mutatott az aranyhal sperma mélyhűtése során kapott eredményeimmal. A teljes baktériumszám a fagyasztást követően viszonylag stabil maradt, de az összetétel megváltozott. A mintákban eltérő fajösszetétel mutatkozott friss állapotban, 6 és 13 nap fagyasztva történő tárolást követően. Fu et al. (2024) humán spermán végzett mélyhűtési kísérletükben, eredményeimhez hasonlóan, jelentős faj diverzitás növekedést figyeltek meg a fagyasztott mintákban. Vizsgálatukban összefüggést állapítottak meg bizonyos baktériumok jelenléte és a sperma minősége, valamint a sperma felolvasztást követő regenerációja között.

A vizsgálat során talált nemzetségek, az *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* és *Shewanella* képviselőit több esetben is izolálták vízből vagy vízhez köthető organizmusból. A *Pseudomonas* fajok különösen figyelemre méltók a hideg környezethez való alkalmazkodóképességük miatt (Chauhan et al., 2023), *Pseudomonas* sp. és *Pseudomonas putida* a hűtve és fagyasztva tárolt ivartermékek esetén az egyik leggyakrabban izolált fajok (Jenkins & Tiersch, 1997; Holcomb et al., 2005; Boonthai et al., 2016). Az *Aeromonas veronii*-t több esetben is azonosították jelentős kórokozóként mind egészséges, mind pedig beteg édesvízi halakban; szepszist, fekélyesedést és tömeges elhullást okozva olyan fajokban, mint a ponty és a nílusi tilápia (Raj et al., 2019; Zhang et al., 2025). Emellett zoonotikus ágensként is ismert, vagyis vízi szervezeteken keresztül az emberre is potenciális veszélyt jelent (Li et al., 2020; Peng et al., 2025). Az *Acinetobacter* fajokat vízi környezetekben is kimutatták, és bár elsősorban környezeti monitorozás és antibiotikum-rezisztencia kapcsán kerülnek előtérbe, halakban opportunistá kórokozóként is megjelenhetnek (Lupo et al., 2018; Milligan et al., 2023; Raj et al., 2025). Ezen fajok többsége kizárólag olvasztást követően volt izolálható a mintákból. Az általam izolált gomba nemzetségek (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichosporon*, *Cladosporium*) mind jól dokumentált halak esetén, illetve vízi környezetben, leginkább környezeti szennyezőként vagy opportunistá kórokozóként jelennek meg (Sallenave-Namont et al., 2000; Atawodi et al., 2017). Jelenlétük az aranyhal spermájában feltételezhetően inkább környezeti vagy kezelési szennyeződésből fakadhat. Ezen nemzetségek képviselői károsíthatják a sperma minőségét, befolyásolva a szaporítás sikerét, valamint negatív hatást gyakorolhatnak az egyedek egészségi állapotára (Alam et al., 2023). Bielanski et al. (2003) vizsgálatukban több éven keresztül, folyékony nitrogénben, nyitott műszalmában tárolt szarvasmarha sperma és embriómintákból 32 baktérium- és egy gombafajt izoláltak. Munkájuk során megállapították, hogy a tárolás során a minták keresztszennyeződnek, annak következtében, hogy a sperma, valamint az embrió gyűjtési és fagyasztási technikái nem

steril protokollokon alapulnak. Mivel a laboratóriumi vizsgálatok során az általam használt mintatároló számos, különféle eredetű műszalma tárolására szolgál, feltételezhető, hogy az öt hónapos tárolás során a spermaminták a folyékony nitrogén közvetítésével más mintákból származó baktériumközösségekkel is érintkezhettek.

5.3. A szövettani vizsgálat eredményei

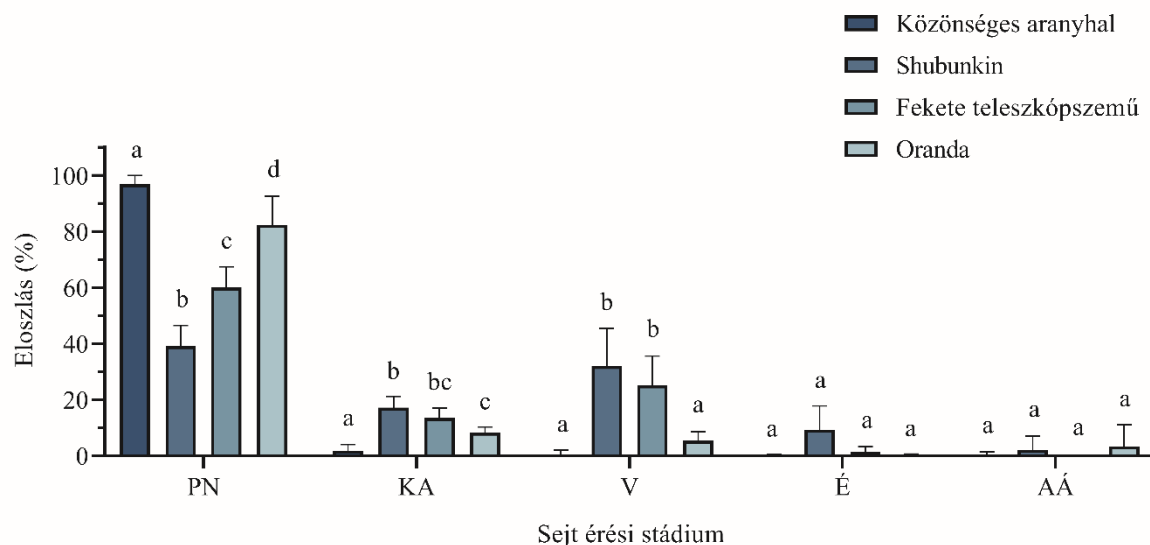
A változatok szövettani és gén expressziós vizsgálatokhoz felhasznált egyedeinek (6. táblázat) GSI-je mind a két ivar esetén jelentős eltéréseket mutatott. A shubunkin és fekete teleszkópszemű változatok GSI értéke mind az ikrások, mind a tejesek esetén szignifikánsan magasabb volt a másik két változathoz képest. A közönséges aranyhal ikrás egyedei statisztikailag igazolhatóan alacsonyabb átlagos GSI-vel rendelkeztek a többi változattal összehasonlítva (15. táblázat).

15. táblázat. A szövettani és génexpressziós vizsgálatokhoz felhasznált állomány gonado-szomatikus indexe (GSI). Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (ikrás; tejes: közönséges aranyhal $N = 6$; 5, shubunkin $N = 5$; 5, fekete teleszkópszemű $N = 5$; 5, oranda $N = 5$; 5). Az eltérő betűk az ivaron belül a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0,05$).

	Közönséges aranyhal	Shubunkin	Fekete teleszkópszemű	Oranda
Az ikrás egyedek GSI (%)	1,8±0,9 ^a	16,1±4,6 ^b	14,1±4,5 ^b	6±1,9 ^c
A tejes egyedek GSI (%)	2,5±1,3 ^a	7,2±2,4 ^b	6,0±1,9 ^b	2,9±1,2 ^a

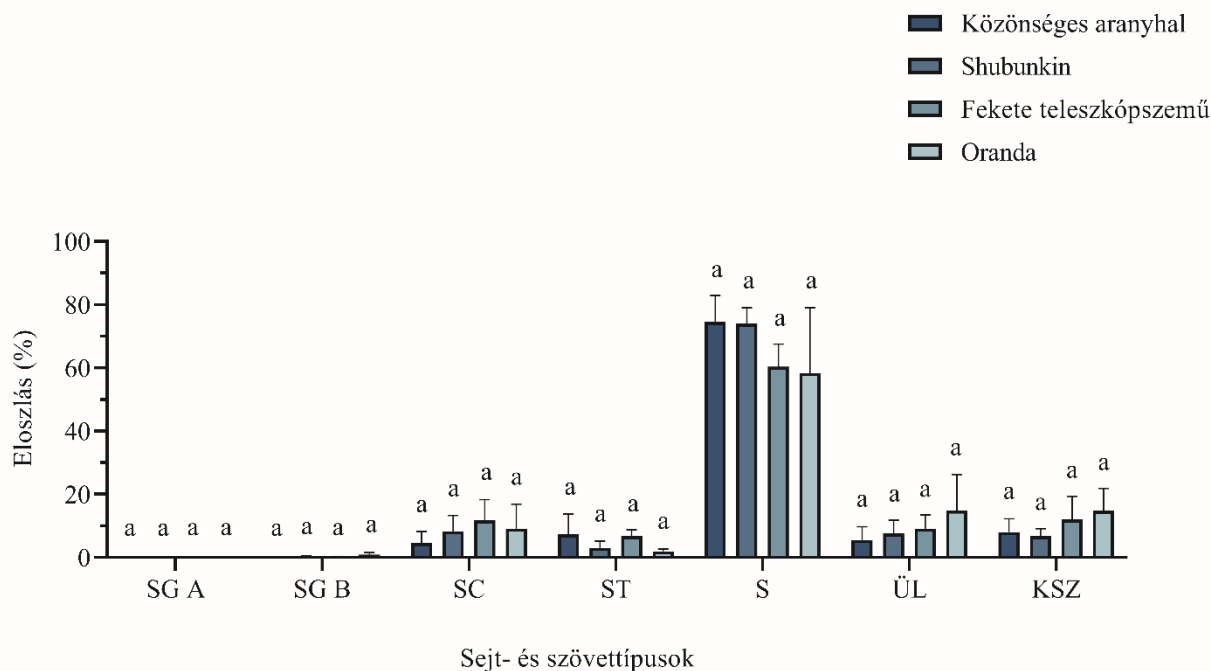
A petefészek, hormonkezelést követő, vizsgálata során mind a négy aranyhal változatban az ivarsejtek túlnyomó többsége az elsődleges növekedés I. szakaszában, a perinukleoláris stádiumban, volt. Ennek aránya azonban jelentős variabilitást mutatott a változatok között: a közönséges aranyhalnál (96,9±3,1%), az orandánál (82,4±10,1%) magasabb, míg a shubunkinnál (39,2±7,3%) és a fekete teleszkópszeműnél (59,9±7,4%) lényegesen alacsonyabb értékeket mértem. Az említett stádiumban mind a négy változat között szignifikáns különbség volt megfigyelhető. Az elsődleges növekedés II. szakaszában, a kortikális alveolus stádiumban lévő sejtek aránya a közönséges aranyhal (1,8±2,2%) esetén szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott, mint a shubunkin (17,2±4%), a fekete teleszkópszemű (13,5±3,6%), valamint az oranda (8,3±2%) változatoknál. A másodlagos növekedési szakasz, vitellogenikus stádiumában lévő sejtek aránya a shubunkin (32,1±13,3%) és a fekete teleszkópszemű változatok (25,2±10,4%) esetén volt a legmagasabb arányban. Ezek az értékek szignifikánsan meghaladták a közönséges aranyhal (0,6±1,4%) és az oranda (5,3±3,2%) értékeit. Vizsgálatom során a sejtek érési fázisát

tekintve az érett és az atretikus oociták voltak a legkisebb arányban rögzíthetőek, melyek értékeiben nem volt különbség a változatok között (23. ábra).



23. ábra. Az oogenezis érési szakaszaiban lévő sejtek aránya a négy változat esetén. Perinukleoláris stádium (PN), kortikális alveolus stádium (KA), vitellogenikus stádium (V), érett stádium (É), atretikus állapot (AÁ). Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek (közönséges aranyhal $N = 6$, shubunkin $N = 5$, fekete teleszkópszemű $N = 5$, oranda $N = 5$). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott fejlődési stádiumon belül ($p < 0,05$).

A here szövettani vizsgálata során, a hormonális kezelés utáni 12. órában mind a négy aranyhal változatnál a spermiumok fordultak elő legnagyobb arányban. A változatok között nem volt kimutatható szignifikáns különbség (közönséges aranyhal: $74,5 \pm 0,8\%$; shubunkin: $74 \pm 5,1\%$; fekete teleszkópszemű: $60,3 \pm 7,2\%$; oranda: $58,4 \pm 20,7\%$). A spermatogenezis korai szakaszaiban (spermatogónium, spermatocita, spermatida) szintén nem volt kimutatható szignifikáns eltérés a változatok között (24. ábra).



24. ábra. A spermatogenezis érési szakaszaiban lévő sejtek és szövetek aránya a négy változat esetén. Spermatogónium A (SG A), spermatogónium B (SG B), spermaticita (SC), spermaticida (ST), spermium (S), üres lumen (ÜL), kötőszövet (KSZ). Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 5$ /változat). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik adott stádiumon belül ($p < 0,05$).

5.4. A szövettani vizsgálat eredményeinek megbeszélése

A gonado-szomatikus index fontos biomarkere a reprodukzív érettségnek és az ívásra való felkészültségnek (Munkittrick & Leatherland, 1984). A különböző aranyhal változatokra vonatkozóan azonban kevés GSI-adat áll rendelkezésre. Az általam vizsgált, azonos és kontrollált körülmények között tartott változatok ivarérett egyedeinek GSI értéke (15. táblázat) jelentős különbségeket igen, azonban egyértelmű összefüggést a testalakulásokkal nem mutatott. Aranyhal esetén a GSI értéket leggyakrabban az ivari ciklus állapotának meghatározására használják adott körülmények között. Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2006) részben kontrollált rendszerben (kültéri betonmedencék, hőmérséklet: 21–30 °C, pH 7–8, oldott oxigén: 5,5–7 mg/l) tartott állományán 225–233 nap között határozta meg az ikrások érésének kezdetét 7,5–9,0%-os GSI mellett. Munkittrick & Leatherland (1984) vad aranyhalak ivari ciklusát vizsgálva, az ívási időszakban az ikrásoknál $13,5 \pm 0,9$, a tejeseknél $4,4 \pm 0,8$ GSI-t mértek. Kagawa et al. (1983) hasonló vizsgálatukban az ikrásoknál két csúcs, $13 \pm 0,7\%$ és $18,7 \pm 0,8\%$, volt megfigyelhető az ívási időszakon belül. A fátyolfarkú aranyhal GSI értéke 7,28%-ról indulva 19,11%-on érte el maximumot az ivari ciklus folyamán (Najim et al., 2012). Li et al. (2009) ívási időszakban folyóvízi környezetben ikrások esetén májusban: $7,22 \pm 4,70$; júniusban: $4,54 \pm 3,26$; júliusban: $1,70 \pm 0,94$, míg tejeseknél májusban: $1,89 \pm 1,37$; júniusban: $1,78 \pm 1,16$; júliusban: $1,40 \pm 0,53$ GSI-t rögzítettek. A környezeti tényezők jelentős hatást gyakorolhatnak a GSI-re, a szennyező

anyagokkal terhelt víz és az endokrin rendszert károsító vegyületeknek való kitettség különösen a tejes egyedeknél csökkenti a GSI-t és negatív hatással van a halak reprodukciós teljesítményére (Li et al., 2009). Ezzel ellentétben a jótékony hatású takarmánykiegészítők, mint karotinoidok ($12,71 \pm 0,84$) és probiotikumok ($18,83 \pm 0,3$), alkalmazásánál megnövekedett GSI értékeket rögzítettek ikrás aranyhalaknál (Mehdinejad et al., 2019; Tizkar et al., 2016).

Az általam végzett vizsgálatban ikrások esetén a különböző változatok között jelentős eltérések mutatkoznak az oociták fejlődési stádiumainak arányában. A közönséges aranyhal esetén az ivarsejtek döntő többsége a perinukleoláris stádiumban volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy a változat egyedei az ivari ciklusuk korai fejlődési fázisban voltak. Ezzel szemben a shubunkin és a fekete teleszkópszemű változatok ivarsejtjeinek magasabb aránya a vitellogenikus stádiumban előrehaladottabb érettségi állapotot jelez. Azonos körülmények között a különböző változatok ivarszerveinek eltérő érettségi állapota a változatokra jellemző fenotípusos sajátosságokkal és azok genetikai hátterével is összefüggésbe hozható, amely befolyásolhatja a reprodukciós ciklus alakulását. Emellett a csontos halaknál azonos populáción belül is megfigyelhető az aszinkron ivarsejtérés, melynek során az egyedek eltérő fázisban lehetnek a gametogenezis során (Tyler & Sumpter, 1996). Ez szintén magyarázatot adhat az ivarsejtek stádiumbeli variabilitására a változatok között. A szövettani elemzés megfelelően alátámasztja GSI értékeket. A perinukleoláris stádiumnál ellentétben, míg a többi fejlettségi állapotnál azonos tendencia volt megfigyelhető a GSI-vel. Ez összhangban áll a csontos halaknál leírtakkal, miszerint az oociták növekedésével és a vitellogenezis előrehaladtával a sejtek térfogata és tömege nagyságrendekkel nő, jelentős hatást gyakorolva a gonád tömegére és így a GSI-re (Tyler & Sumpter, 1996). A változatok ezen paramétere közötti eltérések tehát elsősorban az oociták érési állapotából, nem pedig a petesejtek számából adódtak.

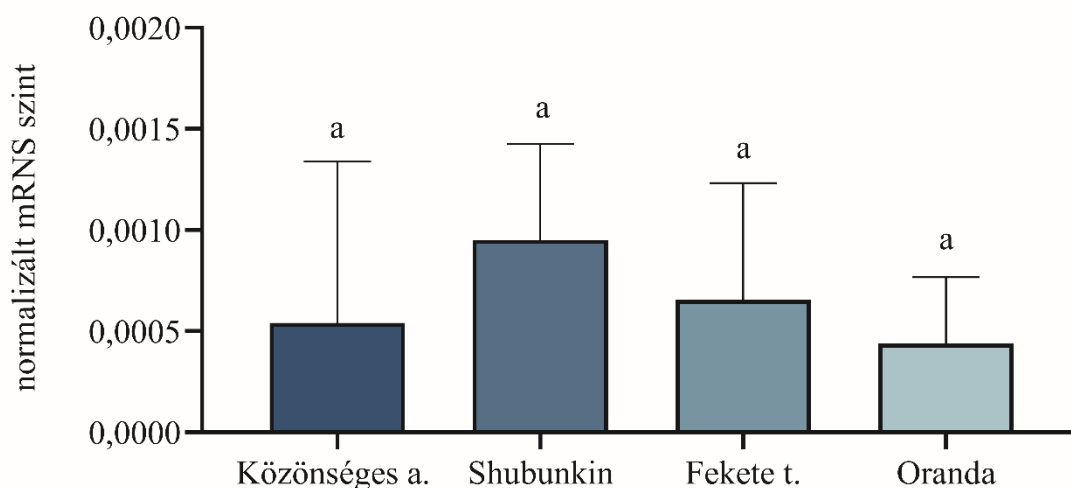
Ezzel ellentétben a tejeseknél, habár a GSI értékben statisztikailag kimutatható különbség volt a változatok között, a szövettani elemzés során nem mutatkozott eltérés a sejttípusok eloszlásában. A spermiumsejtek magas aránya továbbá, a spermatogenezis előrehaladott állapotát jelezte, így elmondható, hogy a hormonális kezelés hatékonyan indukálta a végső ivarsejtérést mind a négy változat esetén. A két ivar GSI-je és az ivarsejttípusok arányai közötti tendenciabeli különbségek feltételezhetően az ivarsejtek mérete és tömege közötti jelentős eltérésekből fakadóan nem mutathatók ki. A petesejtek nagy méretűek, jelentős citoplazmamennyiséggel rendelkeznek, ezért az oociták egy-egy fejlődési stádiumának arányváltozása a teljes gonád tömegét, és így a GSI-t, erőteljesen befolyásolja. Ezzel szemben a hímvarsejtek nagyságrendekkel kisebbek, ezért akár jelentős aránybeli eltolódás a spermatogenezis különböző stádiumai között sem eredményez érzékelhető változást a here tömegében (Schulz et al., 2010). Ennek következtében a GSI és az

ivarsejtarányok összevetése az ikrások esetében erősebb biológiai relevanciával bír, míg a tejeseknél a GSI kevésbé indikátora a spermatogenezis aktuális állapotának.

Vizsgálatom eredményei azt mutatják továbbá, hogy az azonos környezeti feltételek és a standardizált indukálási protokoll ellenére az egyes változatok érettségi állapota és ívásra való felkészültsége nem volt egységes egyik ivar esetén sem. Ez arra utal, hogy a genetikai háttérből és/vagy a változatspecifikus biológiai sajátosságokból fakadó különbségek jelentősen befolyásolhatják a hormonális kezelésre adott választ és az ivarsejtek végső érési ütemét.

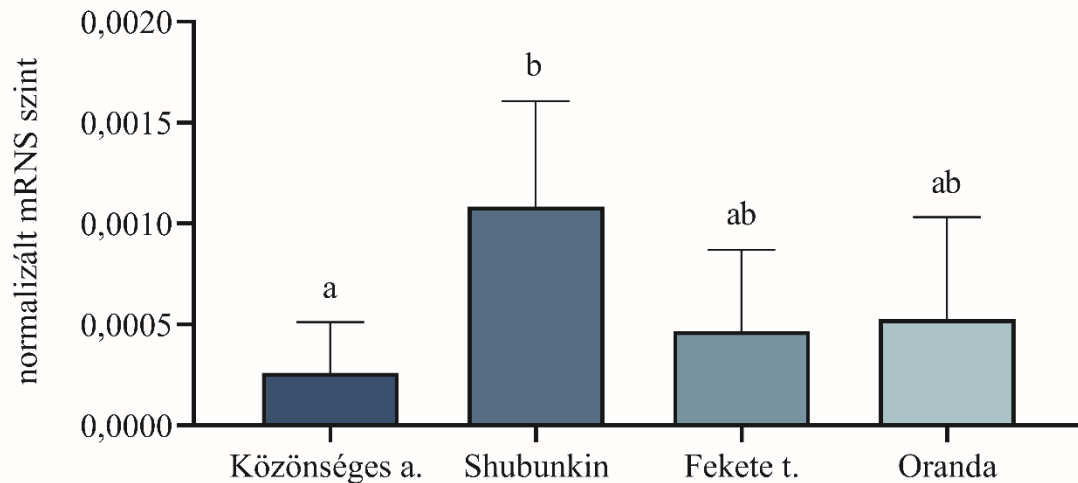
5.5. A génexpresszió meghatározás eredményei

A *rln3a* gén agyszövetben mért kifejeződésében nem volt szignifikáns különbség a változatok (6. táblázat) között (25. ábra).



25. ábra. A *rln3a* gén RT-qPCR által kifejeződése a változatok agyszöveiben. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 5$ /változat). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0,05$).

Az agyszövevtől eltérően a *rln3a* gén hereszöveiben mért kifejeződésének mértékében statisztikailag igazolható különbség mutatkozott. A here normalizált mRNA szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a közönséges aranyhalban, mint a shubunkin esetén. A fekete teleszkópszemű és az oranda értékei nem mutattak jelentős eltérést a többi változathoz képest (26. ábra).



26. ábra. A *rln3a* gén RT-qPCR által meghatározott kifejeződése a változatok here szöveteiben. Az adatok átlag±szórás értékeket jelölnek ($N = 5$ /változat). Az eltérő betűk a változatok közötti szignifikáns különbséget jelölik ($p < 0,05$).

A négy változat egyedeit együttesen vizsgálva ($N = 20$) szignifikáns, közepes erősségű pozitív korreláció volt kimutatható a GSI-értékek és a hereszövetben mért *rln3a* mRNA-szint között (Pearson-féle korreláció, $R = 0,5112$).

5.6. A génexpresszió meghatározás eredményeinek megbeszélése

A génexpressziós eredményeim fontos információval szolgálnak a relaxin-családba tartozó *rln3a* gén reprodukciós és neuroendokrin folyamatokban betöltött szerepéről aranyhal esetén. Az eredmények alapján az agyszövetben mért *rln3a* kifejeződése nem mutatott szignifikáns eltérést az egyes változatok között, ami arra utal, hogy a *rln3a* neuroendokrin szabályozásban betöltött szerepe stabilan konzervált a különböző változatokban. Ez összhangban áll a korábbi tanulmányokkal, amelyek szerint a gén csontos halakban evolúciósan erősen konzervált mind szekvenciájában, mind funkcióját tekintve, és olyan folyamatok kulcsszereplője, mint a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely, vagy a cirkadián ritmus működése (Alnafea et al., 2019; Błasiak et al., 2022; Good-Avila et al., 2009; Wu et al., 2024).

Az *rln3a* az agy mellett dominánsan a herékben, különösen a Leydig-sejtekben fejeződik ki. A rendelkezésre álló knockout adatok nilusi tilápiában azt bizonyítják, hogy az *rln3a* alapvető szerepet játszik a here normális szerkezetében és működésében. Hiánya a hímivarsejtek számának és a sperma minőségének jelentős csökkenését, valamint a hímivarszerv rendellenes növekedését eredményezi, mely növekedett GSI-t eredményez (Yang et al., 2020). Míg más vizsgálatok összefüggést találtak bizonyos neuroendokrin szabályozó gének, a *GnRH* és a *kisspeptin* expressziója, a GSI és a reprodukciós állapot között (Palomino et al., 2025), addig magát az *rln3a*-t nem vizsgálták közvetlenül ezekben az összefüggésekben. Nem áll rendelkezésre olyan közvetlen

vizsgálat, amely a természetes (nem mutáns) *rln3a* kifejeződésének mértékét és a GSI-t korreláltatta volna a normál reprodukciós ciklus során. A *rln3a* hereszövetben mért kifejeződésében a szövettani elemzéssel szemben szignifikáns eltérések voltak megfigyelhetők. A közönséges aranyhal hereszövetében szignifikánsan alacsonyabb volt a kifejeződés mértéke a shubunkinénál, a fekete teleszkópszemű és az oranda értékei azonban nem tértek el szignifikánsan a többi változattól. Mivel az *rln3a* ismertén a Leydig-sejtekben expresszálódik, és alapvető szerepet játszik az androgéntermelésben a HPG tengelyen keresztül, illetve kulcs szerepe van a spermatogenezis folyamatában, eredményeim arra utalhatnak, hogy a változatok között a here funkciójának intenzitásbeli különbségei molekuláris szinten is megjelennek. A négy változatban végzett vizsgálatom alapján a *rln3a* expressziójának mértéke összefüggést mutat az egyedek GSI értékeivel. Habár változatonként nem, a változatok összevonásával, statisztikailag igazolt korreláció volt kimutatható a GSI és a vizsgált gén kifejeződése között. Azonban tendencia megfigyelhető volt változat szinten is, a shubunkin esetében a magas GSI és a magas *rln3a* expresszió összhangban állhat a here aktívabb működésével, míg a közönséges aranyhal alacsonyabb expressziója a reprodukív aktivitás csökkent mértékére utalhat.

6. Következtetések és javaslatok

6.1. Következtetések

A fellelhető szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy az aranyhal szaporodásbiológiai mutatóiban megfigyelhető különbségeket számos tényező befolyásolhatja. A reprodukciós teljesítményre az egyedi tulajdonságok mellett, mint a testméret, kor és kondíció, nagy mértékben hatással vannak a külső tényezők. A környezet fizikai és kémiai paraméterei, a rendelkezésre álló tér és táplálék, valamint az ivararány mind befolyásolja a halak szaporodásbiológiáját. Munkám során az azonos korú, azonos populációból származó és egységes környezeti feltételek mellett tartott és kezelt aranyhal változatok vizsgálata lehetőséget biztosított, hogy a megfigyelt szaporodásbiológiai különbségek a változatokra jellemző fenotípusos sajátosságokkal és azok feltételezhető genetikai hátterével összefüggésbe hozhatók legyenek.

Eredményeim alapján egyértelmű különbség mutatkozik a négy változat alap szaporodási mutatóiban és a lárvák korai fejlődésében. Ikrások esetén jelentős eltérések mutatkoztak az ivarsejtek minőségi és mennyiségi paramétereiben, míg a tejesek esetén nem volt markáns különbség az egyes változatok között. Az ikrások testalakja és reprodukciós paraméterei között megfigyelhető volt egy bizonyos tendencia. A gömbölyű testalakkal rendelkező változatok (fekete teleszkópszemű, oranda) esetén magasabb pszeudo-gonado-szomatikus indexet, azonban alacsonyabb grammonkénti ikraszámot rögzítettem, mint az elnyújtott testformájú változatoknál (közönséges aranyhal, shubunkin). Ez arra utal, hogy a testforma, valamint az annak kialakítására irányuló szelekciós célok befolyásolhatják az ikrás egyedek relatív ivartermék-mennyiségét és potenciális reprodukciós kapacitását. Ugyanakkor a változatok ikrás egyedei nem mutattak jelentős eltérést a pontyfélék családjában korábban vizsgált fajokétól az ivarszerv testtömeghez viszonyított arányában. Eredményeim alapján a változatokra jellemző fenotípusos sajátosságok, és feltételezhetően azok genetikai háttere, hatással lehetnek a vizsgált reprodukciós paraméterekre, a két ivar szaporodásbiológiai tulajdonságait eltérő módon befolyásolva.

A lárvanevelési vizsgálat során a növekedés és fejlődés előrehaladtával csökkent a morfológiai rendellenességekkel rendelkező egyedek aránya. Ebben feltételezhető a természetes szelekció szerepe, ugyanakkor az eredmények alapján nem igazolható egyértelműen, hogy kizárólag ez állna a deformitási arány változásának hátterében. A fejlődési rendellenességek jellege változatspecifikus mintázatot mutatott, a szimplafarkú, elnyújtott testalakú változatoknál a feji régió deformációja nagyobb arányban fordult elő. Az ikerfarkú, gömbölyű egyedeknél ugyanakkor az uszonyok deformációja volt gyakrabban megfigyelhető. A fejlődési ütemben szintén testalakhoz köthető mintázatot rögzítettem. A kelést követő tizedik nap végére jelentős

testtömeggyarapodásbeli lemaradás volt tapasztalható az elnyújtott testformával rendelkező változatoknál. A fekete teleszkópszemű aranyhálnál megfigyelhető alacsony kelési arány és a fejlődési rendellenességek magasabb aránya feltehetően a gyengébb minőségű ikratételeknek, valamint a sajátos fenotípusos jegyeknek köszönhető. A szakirodalmi adatok, valamint eredményeim egyértelműen azt mutatják, hogy a mesterséges szelekció során kialakult fenotípusos sajátosságok már embrionális kortól eltéréseket eredményeznek az egyes változatok között. E különbségek a kelési sikerre, a lárvák fejlődésére és a megmaradásra egyaránt hatással vannak.

Az aranyhalak sperma mikrobiotájának vizsgálata során változatos baktérium- és gombaközösséget azonosítottam. Változatspecifikus összetétel nem volt megfigyelhető, ugyanakkor számos faj átfedést mutatott az egyedek mintái között. Ebből megállapítható, hogy az aranyhal sperma mikrobiotáját a környezet és a gazdaszervezet biológiai sajátosságai együtt befolyásolják. A sperma tenyésztendő mikrobiális közössége jelentős változáson ment keresztül a tárolási folyamatok során, ugyanakkor a baktériumflóra összetételének változását a mintákban található összcsíraszám nem reprezentálta. A rövid távú hűtve történő tárolás során pszichrofil és pszichrotoleráns, gyakran fakultatív- vagy opportunistá baktériumok váltak dominánssá. A gombák esetében a friss mintákban valamivel nagyobb diverzitás volt megfigyelhető (*Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*), míg 96 óra elteltével, kizárólag *Penicillium* fajok voltak izolálhatók. Ebből arra lehet következtetni, hogy az alkalmazott tárolási körülmény szelektív nyomást gyakorolt a sperma mikrobiális közösségére, elősegítve olyan fajok felszaporodását, amelyek potenciálisan negatív hatással lehetnek a sperma minőségére, ezáltal annak termékenyítőképességére és a szaporítás sikerességére. A *Penicillium* nemzetség fajai az eredmények alapján kompetitív előnnyel rendelkeztek a vizsgált körülmények között. Szakirodalmi adatok és a mélyhűtés során rögzített megnövekedett baktérium fajdiverzitás együttesen arra utal, hogy a folyékony nitrogénben, nyitott műszalmában történő, mintatárolás azok kontaminációját eredményezi. Ez nem kizárólag a spermaminták minőségi romlásához vezethet, de a minták felhasználása lehetőséget teremt a fakultatív- és opportunistá baktériumok továbbvitelére az utódállományba. Ugyanakkor a gombafajok számának és diverzitásának csökkenéséből következtethető, hogy a spermamélyhűtés, az extrém hidegben történő tárolás, valamint a felolvasztás erős szelekciós nyomást gyakorol a gombaközösségre. Csak bizonyos, stressztoleranciát mutató fajok képesek fennmaradni az említett környezeti feltételek mellett.

Az azonos körülmények és kezelési protokoll ellenére az egyes változatok ivarszervének relatív méretében, valamint a végső ivarsejt érésben eltérés volt megfigyelhető. Ikrások esetén a különböző érési stádiumok arányaiban rögzített különbségek azt mutatják, hogy a változatok eltérő hatékonysággal reagáltak a hormonkezelésre. Emellett általánosan megállapítható, hogy a

hormonkezelést követő 24 óra nem volt elegendő az érett oocita állapot eléréséhez. A spermiumok magas aránya ugyanakkor minden változatnál azt jelzi, hogy a hímek hasonló mértékben reagáltak a hormonális kezelésre, és az ivarérett egyedek az ivásra való felkészültség előrehaladott állapotában voltak. Az eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált aranyhalváltozatok hormonális indukcióra adott válasza eltérő lehet, ami különbségeket eredményezhet az ivarszervek fejlettségében és a végső ivarsejtérés előrehaladásában. Ezek a különbségek összefüggésben állhatnak a változatok eltérő genetikai hátterével és a fenotípusukhoz kapcsolódó élettani sajátosságokkal.

A molekuláris vizsgálat eredményei alapján a változatok agyszövetében rögzített *rln3a* expresszió mértékének hasonlósága, a szakirodalommal összhangban, a neuroendokrin funkciók konzerváltságát tükrözi. Ezzel szemben, a hereszövetben mért eltérések a spermatogenezis változatfüggő szabályozására utalhatnak.

A GSI értékeket, a szövettani eredményeket, valamint az *rln3a* kifejeződését együttesen értékelve az állapítható meg, hogy az egyes változatok eltérő mértékben reagálnak a hormonális indukcióra. Eredményeim alapján a spermatogenezis végső érési folyamatát befolyásoló mechanizmusok változatfüggő eltéréseket mutatnak.

A többezer éves mesterséges szelekció hatása egyértelmű nyomot hagyott a vizsgált aranyhal változatok szaporodási képességén és lárvafejlődésén. Eredményeim hozzájárulhatnak a mesterséges szelekció reprodukciós folyamatokra gyakorolt hatásának jobb megértéséhez.

6.2. Javaslatok

A doktori munkám eredményei alapján a következő javaslatokat fogalmaztam meg:

- a) Változatonként szisztematikus ivarsejt minőségi és mennyiségi vizsgálaton átesett anyaállományok kialakítása:
 - javaslom a szaporítását megelőzően egyedenként legalább a sperma motilitásának vizsgálatát, de célszerű további minőségi paraméterek rögzítése is;
 - javaslom a változatonként megfelelő sperma-ikra arány meghatározását.
- b) Ikrások esetén javaslom a ponty hipofízissel történő kezelés és a fejés közötti időintervallum további vizsgálatát és változatonkénti optimalizálását, beleértve a 24 óránál hosszabb időtartamok értékelését is, a nagyobb arányú érett oocita elérése érdekében.
- c) Javaslom az alkalmazandó hormondózis változatonkénti meghatározását, valamint összehangolni a két ivar kezelésének időzítését a szaporítás hatékonyságának növelése érdekében.

- d) Javasolt a mintavételi és tárolási protokollok finomítása a spermaminták begyűjtése és tárolása során fellépő mikrobiális kontamináció minimalizálása érdekében. A minták esetleges keresztszennyeződésének megelőzése céljából indokolt a zárható mintatároló edények alkalmazása, valamint a folyékony nitrogén mikrobiológiai tisztaságának fenntartása. Továbbá a tárolni kívánt minták antibiotikumos kezelése helyett alternatív (pl.: probiotikum alapú) módszerek kidolgozását javaslom.
- e) Gazdaságilag jelentős halfajok esetében indokolt az ivartermékek termékenyítő képessége és azok mikrobiomja közötti összefüggések feltérképezése. Továbbá, szükséges az izolált baktériumok és gombák által termelt bioaktív vagy toxikus metabolitok ivartermékminőségre és embriófejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálata.
- f) Javasolt az *rln3a* gén kifejeződésének vizsgálata az ivari ciklus különböző szakaszaiban.
- g) Javaslom az *rln3a* gén alkalmazhatóságának vizsgálatát, mint a here működésének molekuláris markere.

6.2.1. Az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága

Doktori munkám eredményei nem kizárólag tudományos értékkel bírnak, hanem gyakorlati szempontból is jelentősek. A különböző aranyhalváltozatok szaporodásbiológiai sajátosságainak igazolása lehetőséget biztosít a szaporítási technológiák változatspecifikus optimalizálására. Az ivartermékek minőségi és mennyiségi paramétereiben, valamint a hormonális indukcióra adott válaszban tapasztalt különbségek figyelembevételével növelhető a szaporítás eredményessége és az utódállomány minősége.

Az ikrások esetében megfigyelt eltérések alapján a szaporításra történő felkészítési protokollok és a fejés időzítésének változatokénti meghatározása hozzájárulhat a nagyobb mennyiségű érett ivarsejt kinyeréséhez. A spermaminőség vizsgálatára vonatkozó eredményeim alapján javasolt olyan szelekciós eljárások kidolgozása, amelyek során a tenyésztésbe vont egyedek kiválasztása objektív reprodukciós mutatók alapján történik. Ezt a gyakorlatot alkalmazva szaporodási szempontból stabil anyaállományok alakíthatók ki.

A spermaminták mikrobiológiai vizsgálata rávilágított arra, hogy a tárolási és mélyhűtési eljárások során jelentős változások következhetnek be a mikrobiális közösségek összetételében. Az eredményeim egyértelműen mutatják a gyakorlatban is alkalmazott halsperma tárolási protokolljainak hiányosságait. Ezen módszerek fejlesztése szükségszerű a minták mikrobiológiai biztonságának megőrzése és a keresztszennyeződések megelőzése érdekében. Halak esetén ez a

probléma egyaránt érinti a tenyészállományok és génbankok kialakítását célzó, valamint természetvédelmi és kutatási célú ivarsejtmegőrzési programokat.

A lárvafejlődés során tapasztalt változatspecifikus különbségek, valamint a kritikus fejlődési szakaszok ismeretével a változatok igényeinek megfelelő technológiai módosítások hajthatók végre a korai fejlettségi állapotú ivadékok nevelése során. Ezáltal javítható a lárvák túlélése és csökkenthető a fejlődési rendellenességek előfordulása.

6.2.2. A kutatás folytatásának lehetőségei

A doktori munkám témája és eredményei számos további kutatás alapjául szolgálhat. Indokolt lenne a vizsgált reprodukciós mutatók nagyobb egyedszámon és további aranyhalváltozatok bevonásával történő elemzése annak érdekében, hogy pontosabban meghatározható legyen a változatok sajátosságai és a reprodukciós teljesítmény közötti kapcsolat.

A hormonális indukcióra adott válasz változatfüggő eltéréseinek hátterében álló mechanizmusok feltárása érdekében indokolt lehet a szaporodás szabályozásában szerepet játszó gének expressziójának, a hormonális profil változásainak, valamint az ivarszervek szövettani átalakulásainak időbeli nyomon követése a hormonkezelést követően.

A spermamikrobiommal kapcsolatos eredmények alapján további kutatások szükségesek annak vizsgálatára, hogy az egyes mikroorganizmusok milyen mértékben befolyásolják az ivartermékek minőségét, a termékenyítési eredményeket, valamint az embrió- és lárvafejlődést. Különösen fontos lehet a mikrobiális közösségek funkcionális vizsgálata, valamint a potenciálisan patogén fajok szerepének pontos meghatározása.

A tárolási eljárások során érdemes lenne vizsgálni a különböző probiotikus vagy egyéb alternatív mikrobiológiai kezelések alkalmazhatóságát is.

A lárvafejlődés során megfigyelt változatokra jellemző fejlődési rendellenességek genetikai hátterének genomikai és transzkriptomikai módszerekkel történő vizsgálata hozzájárulhatna a mesterséges szelekció fejlődésbiológiai hatásainak jobb megértéséhez.

Az *rln3a* gén hereszövetben mért expresszió változatok közötti eltérései alapján indokolt lehet annak vizsgálata, hogy a gén milyen mértékben vesz részt a spermatogenezis szabályozásában, illetve összefüggésben áll-e a hormonális indukcióra adott reprodukciós válaszok közötti különbségekkel.

7. Új tudományos eredmények

1. Megállapítottam, hogy az azonos korú és körülmények között tartott aranyhal változatok egyedeinek (közönséges aranyhal, a shubunkin, a fekete teleszkópszemű, oranda) az ivartermék minőségi és mennyiségi paramétereiben jelentős eltérések mutatkoznak. Elsőként határoztam meg az aranyhal, azon belül is a négy változat grammonkénti ikraszámát. Továbbá, standardizált körülmények között először hasonlítottam össze a négy változat termékenyülési (közönséges aranyhal: 71%; shubunkin: 79%; fekete teleszkópszemű: 79%; oranda: 93%) és kelési arányait (közönséges aranyhal: 63%; shubunkin: 69%; fekete teleszkópszemű: 44%; oranda: 71%) és igazoltam jelentős eltéréseket közöttük. Ikrás aranyhalak esetén megállapítottam, hogy azonos hormonális kezelés hatására a végső ivarsejtérés eltérő, míg tejesek esetén azonos ütemben zajlik le a vizsgált változatokban.
2. Megállapítottam, hogy az általam vizsgált négy változat fejlődési rendellenességeinek aránya a kelést követően (közönséges aranyhal: 35%; shubunkin: 70%; fekete teleszkópszemű: 75%; oranda: 40%), illetve a 10. napon (közönséges aranyhal: 5%; shubunkin: 25%; fekete teleszkópszemű: 60%; oranda: 35%), valamint a lárvanevelést követő megmaradása (közönséges aranyhal: 95%; shubunkin: 91%; fekete teleszkópszemű: 93%; oranda: 92%) jelentős mértékben eltér. Továbbá, megfigyeltem, hogy a változatok lárváinak növekedési üteme és a deformitásban érintett testrészek összefüggést mutatnak a változatra jellemző testalakokkal.
3. Négy változat bevonásával elsőként írtam le az aranyhal hímivartermékének tenyésztethető mikrobiális közösségét friss mintákban, rövid távú hűtött (4 °C), valamint hosszú távú mélyhűtve (-196 °C) történő tárolás során. Eredményeim igazolják, hogy az aranyhal sperma mikrobiális közösségének diverzitása, valamint faj- és nemzetség szintű összetétele jelentősen megváltozik úgy a rövid távú hűtött, mint a hosszú távú mélyhűtött tárolás során.
4. Elsőként hasonlítottam össze a *rln3a* gén kifejeződésének mértékét eltérő fenotípusú aranyhal változatok agy- és hereszöveteiben. Vizsgálataim igazolták, hogy az agyszövetekben az expresszió konzervált, míg a hereszövetben eltérés figyelhető meg a változatok között, mely a here működésének változatok közötti különbségeire utal.

8. Összefoglalás

Az aranyhal kulturális szerepéből fakadóan évszázadokon át tartó mesterséges szelekción ment keresztül, melynek következtében egyedülálló fenotípusos sokféleséggel rendelkezik. Ennek köszönhetően a faj és annak vonalai kiváló evolúció- és fejlődésbiológiai modellként szolgálnak. A változatok közötti különbségeket számos tanulmány részletezi, az azokat létrehozó mesterséges szelekció hatását a szaporodásbiológiára azonban még nem vizsgálták átfogóan. Munkám célja az azonos körülmények között tartott és kezelt, fenotípusban jelentősen eltérő aranyhal változatok, a közönséges aranyhal, a shubunkin, a fekete teleszkópszemű és az oranda szaporodásbiológiai mutatóinak komplex vizsgálata volt. Kísérleteim kiterjedtek az ikrás és tejes egyedek ivartermékének minőségi és mennyiségi értékelésére, valamint szaporítás során a termékenyülés és kelés meghatározására. Lárvanevelési kísérletben vizsgáltam az ivadékok korai fejlődésének ütemét, a deformitások előfordulásának arányát, valamint a megmaradást. Kísérleteim során meghatároztam a hímivartermék tenyészthető mikrobiális (baktérium és gomba) közösségét friss állapotban, valamint rövid távú (5 nap) hűtött (4 °C) és hosszú távú (5 hónap) mélyhűtött (-196 °C) tárolás során. Ezen felül összehasonlítottam a változatok relatív ivarszerv tömegét, illetve szövettani vizsgálat alapján összevettem a változatok végső ivarsejterését. Ezen felül vizsgáltam és összehasonlítottam a *rln3a*, spermatogenezisben kulcsszerepet betöltő gén egy és hereszövetben kifejeződő mértékét. Eredményeim alátámasztják, hogy az eltérő szelekciós célok mentén kialakult fenotípusos sajátosságok a változatok reprodukciós képességeiben is megjelennek. Az általam vizsgált négy változat azonos korú, egységes körülmények között tartott egyedek között jelentős különbségek mutatkoztak a vizsgált szaporodásbiológiai mutatókban és a korai fejlődésben. Ikrások esetén összefüggés volt megfigyelhető a testalak és a reprodukciós paraméterek között, míg tejeseknél nem volt egyértelműen fenotípushoz köthető mintázat. A lárvafejlődés során előforduló deformitások jellege változspecifikusnak mutatkozott. A fekete teleszkópszemű aranyhal esetén rögzített alacsony kelési arány, valamint a rendellenesen fejlődő lárvák magas aránya az ikra gyenge minőségére utal, ami feltételezhetően a sajátos morfológiai bélyegeknél köszönhető. A tejesek ivartermékének mikribóta vizsgálata során, ugyan változat specifikus közösséget nem rögzítettem, azonban a négy változat bevonásával, tudomásom szerint először identifikáltam az aranyhal sperma tenyészthető mikrobiális összetételét. Továbbá leírásra került ezen közösség rövid távú hűtött és mélyhűtött tárolás során megváltozott összetétele. Ezek az adatok kiemelt gyakorlati jelentőséggel bírnak, rámutatva a spermatárolási protokollok mikrobiom alapú fejlesztésének szükségességére. Ikrások esetén a gonado-szomatikus index, valamint a szövettani elemzés alapján megállapítható, hogy a változatokra eltérően hatott a hormonális kezelés, ennek oka feltételezhetően a mesterséges szelekcióból eredő genetikai

különbség, és az egyedek közötti aszinkron ivarsejtérés. Tejesek esetén a gonado-szomatikus index, szövettani és molekuláris eredmények együttes értékelése arra utal, hogy a here működésének szabályozása eltér a vizsgált aranyhal változatok között, minek következtében azok eltérő hatékonysággal reagáltak a hormonkezelésre. Továbbá, a változatok agyszövetében mért *rln3a* egyöntetű kifejeződése annak a neuroendokrin szabályozásban betöltött, konzervált szerepére utal.

Doktori munkám eredményei megerősítik, hogy a több évszázados szelektív tenyésztés kimutatható hatást gyakorolt az aranyhal változatainak reprodukciós képességeire. A kialakult morfológiai bélyegek mellett befolyásolta az ivarsejtérés molekuláris hátterét, a spermatogenezis és oogenezis folyamatát, az ivarsejtek minőségét és termékenyítő képességét, az embrionális fejlődést, valamint a lárvafejlődést. Eredményeim igazolták továbbá, hogy a vizsgált változatok hímivarterméke tenyésztethető mikrobiális közösséggel rendelkezik, melynek összetétele a tárolási körülmények hatására változik. Az identifikált baktérium- és gombaközösségek potenciálisan befolyásolhatják az ivarsejtek minőségét és funkcionális tulajdonságait, ezáltal közvetetten a reprodukciós sikerességet is. Ezek ismeretében a tenyésztés hatékonyságának növelése érdekében szükségeszerű a változatspecifikus szaporítási protokollok kidolgozása.

9. Summary

Due to its cultural significance, the goldfish has undergone centuries of artificial selection, resulting in unique phenotypic diversity. Consequently, the species and its lines serve as an excellent model for evolutionary and developmental biological research. While differences between the variants have been studied, the effect of artificial selection on reproductive biology has not yet been comprehensively investigated. The aim of my work was to conduct a complex study of the reproductive biological indicators of phenotypically distinct goldfish variants, including common goldfish, shubunkin, black moor, and oranda, all maintained and treated under identical conditions. My experiments included the qualitative and quantitative evaluation of the gametes from both females and males, as well as the determination of fertilization and hatching rate during propagation. In a larval rearing experiment, I examined the early developmental rate of the larvae, the incidence of malformations, and determined the survival rate. During my experiments, I characterized the culturable microbial (bacterial and fungal) community of male gametes in fresh samples, as well as during short-term (5 days) refrigerated storage (4 °C) and long-term (5 months) cryopreservation (−196 °C). In addition, I compared the relative gonad weight of the variants and compared their final gamete maturation by histological examination. Furthermore, I investigated and compared the expression level of the *rln3a* gene, which plays a key role in spermatogenesis, in brain and testis tissues. My results suggest that phenotypic traits shaped by different artificial selection goals are reflected in the reproductive characteristics of the goldfish varieties. Despite identical age and standardised rearing conditions, significant differences were observed among the four variants in reproductive and biological parameters, as well as early developmental processes. In females, an association was observed between body shape and reproductive parameters, whereas no clear phenotype-related association was identified in males. The type of malformations that occur during larval development appears to be variant-specific. The low hatching rate and high proportion of abnormally developed larvae recorded in black moor indicate poor egg quality, which is presumably related to specific morphological characteristics. Although no variant-specific microbial community was identified in male gametes, this study is, to the best of my knowledge, the first to characterize the goldfish sperm microbiome by involving four variants. Furthermore, changes in microbial composition during short-term refrigerated and cryogenic storage were described. These findings have practical relevance, highlighting the need for microbiome-based optimization of sperm storage protocols. In females, based on the gonado-somatic index and histological analysis, it can be concluded that hormonal treatment affected the varieties differently, presumably due to genetic differences resulting from artificial selection and asynchronous gamete development among individuals. In males, the

combined evaluation of gonado-somatic index, histological, and molecular results indicates that testicular function regulation differs among the studied goldfish variants, resulting in variable responses to hormonal treatment. Furthermore, the uniform expression of *rln3a* measured in brain tissue across variants suggests its conserved role in neuroendocrine regulation.

The results of my doctoral research confirm that centuries of selective breeding have had a measurable effect on the reproductive performance of goldfish variants. Beyond shaping morphological traits, artificial selection has influenced the molecular background of gamete maturation, the processes of spermatogenesis and oogenesis, the quality and fertilizing capacity of gametes, embryonic and larval development. My results also confirmed that the sperm of the tested variants contains a culturable microbial community, the composition of which varies with storage conditions. The identified bacterial and fungal communities may influence the quality and functional properties of gametes, thereby indirectly affecting reproductive success. In light of these findings, the development of variant-specific artificial reproduction protocols is essential to improve breeding efficiency.

10. Mellékletek

M.1. Irodalomjegyzék

- Abe, G., Lee, S.-H., Chang, M., Liu, S.-C., Tsai, H.-Y., Ota, K.G. (2014): The origin of the bifurcated axial skeletal system in the twin-tail goldfish. *Nature Communications*, 5(1), 3360. DOI: [10.1038/ncomms4360](https://doi.org/10.1038/ncomms4360)
- Abi-Ayad, A., Kestemont, P. (1994): Comparison of the nutritional status of goldfish (*Carassius auratus*) larvae fed with live, mixed or dry diet. *Aquaculture*, 128(1–2), 163–176. DOI: [10.1016/0044-8486\(94\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90111-2)
- Alam, S., Afzal, G., Iqbal, Z., Hussain, R., Rizwan, M., Afzal, M., Mahmood, Y., Yamin, A., Raza, A.G., Farooq, U., Iqbal, S., Mustafa, G. (2023): Fungal zoonotic infections in fish an emerging threat to aquatic and terrestrial life. *Zoonosis*, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, 4, 611–624. DOI: [10.47278/book.zoon/2023.183](https://doi.org/10.47278/book.zoon/2023.183)
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M., Linhart, O. (2007): Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology*, 68(2), 276–283. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2007.05.045](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.045)
- Algammal, A.M., Mabrok, M., Sivaramasamy, E., Youssef, F.M., Atwa, M.H., El-Kholy, A.W., Hetta, H.F., Hozzein, W.N. (2020): Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *toxA* virulence genes and *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, and *tetA* antibiotic-resistance genes. *Sci. Rep.*, 10(1), 15961. DOI: [10.1038/s41598-020-72264-4](https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4)
- Al-Khalaifah, H.S., Amer, S.A., Al-Sadek, D.M., Khalil, A.A., Zaki, E.M., El-Araby, D.A. (2020): Optimizing the growth, health, reproductive performance, and gonadal histology of broodstock fantail goldfish (*Carassius auratus*, L.) by dietary cacao bean meal. *Animals*, 10(10), 1808. DOI: [10.3390/ani10101808](https://doi.org/10.3390/ani10101808)
- Alnafea, H., Vahkal, B., Zelmer, C., Yegorov, S., Bogerd, J., Good, S. (2019): Japanese medaka as a model for studying the relaxin family genes involved in neuroendocrine regulation: Insights from the expression of fish-specific *rln3* and *insl5* and *rxfp3/4*-type receptor paralogues. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 487, 2–11. DOI: [10.1016/j.mce.2019.01.017](https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.017)
- Andreu-Vieyra, C.V., Buret, A.G., Habibi, H.R. (2005): Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, 146(3), 1588–1596. DOI: [10.1210/en.2004-0818](https://doi.org/10.1210/en.2004-0818)
- Andrews, C. (1990): The ornamental fish trade and fish conservation. *J. Fish Biol.*, 37, 53–59. DOI: [10.1111/J.1095-8649.1990.TB05020.X](https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1990.TB05020.X)
- Atawodi, J.C., Yola, I.A., Kawo, A.H., Abdullahi, B.A. (2017): Fungi associated with african mudfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) in selected fish farms and dams in Zaria and its environs, Kaduna State, Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 10(1), 642–646. DOI: [10.4314/bajopas.v10i1.119S](https://doi.org/10.4314/bajopas.v10i1.119S)
- Bagheri, T., Imanpoor, M.R., Jafari, V., Bennetau-Pelissero, C. (2013): Reproductive impairment and endocrine disruption in goldfish by feeding diets containing soybean meal. *Anim. Reprod. Sci.*, 139(1–4), 136–144. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2013.02.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.003)

- Balogh, R.E. (2024): Az ivart kialakító tényezők vizsgálata afrikai harcsán (*Clarias gariepinus*). Doktori értekezés, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gödöllő, 113. o. DOI: [10.54598/005290](https://doi.org/10.54598/005290)
- Battle, H.I. (1940): The embryology and larval development of the goldfish (*Carassius auratus* L.) from Lake Erie. *Ohio J. Sci.*, 40(2), 82–93.
- Beirão, J., Boulais, M., Gallego, 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. DOI: [10.3390/ani14182701](https://doi.org/10.3390/ani14182701)
- Bernáth, G. (2016): A halsperma minősítési rendszerének gazdasági célú fejlesztése. Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, 112. o. DOI: [10.14751/SZIE.2016.014](https://doi.org/10.14751/SZIE.2016.014)
- Bernáth, G., Bokor, Z., Źarski, D., Várkonyi, L., Hegyi, A., Staszny, A., Urbány, B., Radóczy, J., Horváth, A. (2016): Commercial-scale out-of-season cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm and its application for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 170, 170–177. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2016.05.005](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.05.005)
- Bernáth, G., Ittész, I., Szabó, Z., Horváth, Á., Krejszeff, S., Lujić, J., Várkonyi, L., Urbányi, B., Bokor, Z. (2017): Chilled and post-thaw storage of sperm in different goldfish types. *Reprod. Domest. Anim.*, 52(4), 680–686. DOI: [10.1111/rda.12951](https://doi.org/10.1111/rda.12951)
- 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. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2018.01.014](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.014)
- Bernáth, G., Nagy, B., Bartucz, T., Csókás, E., Petényi, R., Bartos, I., Hegyi, Á., Csorbai, B., Ivánovics, B., Molnár, J., Urbányi, B., Bokor, Z. (2025): Large-scale cryopreservation affects sperm characteristics and hatching rate but not growth, malformation and survival rate in chub (*Squalius cephalus*) larvae. *Aquaculture*, 602, 742362. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2025.742362](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742362)
- Bielanski, A., Bergeron, H., Lau, P., Devenish, J. (2003): Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 46(2), 146–52. DOI: [10.1016/s0011-2240\(03\)00020-8](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00020-8)
- Billard, R. (1986): Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 26(4), 877–920. DOI: [10.1051/rnd:19860601](https://doi.org/10.1051/rnd:19860601)
- Bishai, H.M., Ishak, M.M., Labib, W. (1974): Fecundity of the mirror carp *Cyprinus carpio* L. at the Serow Fish Farm (Egypt). *Aquaculture*, 4, 257–265. DOI: [10.1016/0044-8486\(74\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(74)90038-6)
- Blanco, A.M., Sundarajan, L., Bertucci, J.I., Unniappan, S. (2018): Why goldfish? Merits and challenges in employing goldfish as a model organism in comparative endocrinology research. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 257, 13–28. DOI: [10.1016/j.ygcen.2017.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.02.001)
- Błasiak, A., Gugula, A., Gundlach, A., Olucha-Bordonau, F., Aniello, F., Donizetti, A. (2022): Relaxin ligand/receptor systems in the developing teleost fish brain: Conserved features with mammals and a platform to address neuropeptide system functions. *Front. Mol. Neurosci.*, 15:984524. DOI: [10.3389/fnmol.2022.984524](https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.984524)

- Blazer, V. (2002): Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 26, 85–101. DOI: [10.1023/a:1023332216713](https://doi.org/10.1023/a:1023332216713)
- Bobe, J., Labbé, C. (2010): Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165(3), 535–548. DOI: [10.1016/j.ygcen.2009.02.011](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011)
- Bobe, J. (2015): Egg quality in fish: Present and future challenges. *Animal Frontiers*, 5(1), 66–72. DOI: [10.2527/af.2015-0010](https://doi.org/10.2527/af.2015-0010)
- Bokor, Z. (2009): A harcsa (*Silurus glanis*) és a süllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata gyakorlati szempontok alapján. Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, 102. o.
- Bokor, Z., Ittész, 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. *J. Appl. Ichthyol.*, 31, 164–168. DOI: [10.1111/jai.12730](https://doi.org/10.1111/jai.12730)
- Bokor, Z., Bernáth, G., Várkonyi, L., Molnár, J., Láng, Z. L., Tarnai-Király, Z., Solymosi, E., Urbányi, B. (2019): The applicability of large-scale sperm cryopreservation in wels catfish (*Silurus glanis*) optimized for hatchery practice. *Aquaculture*, 506, 337–340. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.03.064](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.064)
- Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J. (2007): Characterization of rainbow trout egg quality: A case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology*, 67, 786–794. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2006.10.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.008)
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S., Vuthiphandchai, V. (2016): Effect of antibiotic supplementation on the quality of cryopreserved fish sperm of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Sperm motility and viability, bacterial quality and fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 166, 36–46. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2016.01.002](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.002)
- Bozkurt, Y. (2006): Relationship between body condition and spermatological properties in goldfish (*Carassius auratus*) semen. *J. Anim. Vet. Adv.*, 5, 423–425.
- Braasch, I. (2020): Genome evolution: domestication of the allopolyploid goldfish. *Curr. Biol.*, 30(14), R812–R815. DOI: [10.1016/j.cub.2020.05.073](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.073)
- Brooks, S., Tyler, C., Sumpter, J. (1997): Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fish.*, 7, 387–416. DOI: [10.1023/A:1018400130692](https://doi.org/10.1023/A:1018400130692)
- Burton, A. (2020): Rediscovering goldfish. *Front. Ecol. Environ.*, 18(3), 168–168. DOI: [10.1002/fee.2187](https://doi.org/10.1002/fee.2187)
- Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (2008): Sperm quality assessment, In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (Eds.), *Methods in reproductive aquaculture*. Boca Raton, CRC Press, 115–170. DOI: [10.1201/9780849380549](https://doi.org/10.1201/9780849380549)
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M. (2010): Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.*, 26, 623–635. DOI: [10.1111/J.1439-0426.2010.01556.X](https://doi.org/10.1111/J.1439-0426.2010.01556.X)

- Cejko, B.I., Krejszeff, S., Źarski, D., Targońska, K., Kucharczyk, D., Glogowski, J. (2011): The effectiveness of selected hormonal preparations in stimulating the spermatation of the chub *Leuciscus cephalus* (L.). *Pol. J. Natur. Sc.*, 26(3), 235–245.
- Cejko, B.I., Targońska, K., Kowalski, R.K., Źarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D., Glogowski, J. (2012): The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *J. Appl. Ichthyol.*, 28(6), 873–877. DOI: [10.1111/jai.12054](https://doi.org/10.1111/jai.12054)
- Cejko, B.I., Krejszeff, S., Judycka, S., Sarosiek, B., Dietrich, M., Kucharczyk, D., Kowalski, R.K. (2014): Sperm quality and selected biochemical markers of seminal plasma at the beginning of the reproductive period of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquac. Int.*, 22, 111–122. DOI: [10.1007/s10499-013-9672-3](https://doi.org/10.1007/s10499-013-9672-3)
- Chalita, M., Kim, Y.O., Park, S., Oh, H.-S., Cho, J.H., Moon, J., Baek, N., Moon, C., Lee, K., Yang, J., Nam, G.G., Jung, Y., Na, S.-I., Bailey, M.J., Chun, J. (2024): EzBioCloud: A genome-driven database and platform for microbiome identification and discovery. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 74(6). DOI: [10.1099/ijsem.0.006421](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006421)
- Chantzaropoulos, A., Nathanailides, C., Kokokiris, L., Barbouti, A., Zhang, T. (2015): A brief exposure to low pH prior to refrigerated storage reduces the motility and viability of goldfish sperm (*Carassius auratus*, Linnaeus, 1758). *J. Appl. Ichthyol.*, 31(1), 89–93. DOI: [10.1111/jai.12735](https://doi.org/10.1111/jai.12735)
- Chapman, F., Fitz-Coy, S., Thunberg, E., Adams, C. (1997): United States of America trade in ornamental fish. *J. World Aquac. Soc.*, 28(1), 1–10. DOI: [10.1111/J.1749-7345.1997.TB00955.X](https://doi.org/10.1111/J.1749-7345.1997.TB00955.X)
- Chauhan, M., Kimothi, A., Sharma, A., Pandey, A. (2023): Cold adapted *Pseudomonas*: ecology to biotechnology. *Front. Microbiol.*, 14. DOI: [10.3389/fmicb.2023.1218708](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1218708)
- Chatzokou, D., Tsarna, E., Davouti, E., Siristatidis, CS., Christopoulou, S., Spanakis, N., Tsakris, A., Christopoulos, P. (2025): Semen microbiome, male infertility, and reproductive health. *Int. J. Mol. Sci.*, 26(4), 1446. DOI: [10.3390/ijms26041446](https://doi.org/10.3390/ijms26041446)
- Chen, S.C. (1928): Transparency and mottling, a case of Mendelian inheritance in the goldfish *Carassius auratus*. *Genetics*, 13, 434–452. DOI: [10.1093/genetics/13.5.434](https://doi.org/10.1093/genetics/13.5.434)
- Chen, Z., Omori, Y., Koren, S., Shirokiya, T., Kuroda, T., Miyamoto, A., Wada, H., Fujiyama, A., Toyoda, A., Zhang, S., Wolfsberg, T.G., Kawakami, K., Phillippy, A.M. Mullikin, J. C., Burgess, S.M. (2019): De novo assembly of the goldfish (*Carassius auratus*) genome and the evolution of genes after whole-genome duplication. *Sci. Adv.*, 5(6), eaav0547. DOI: [10.1126/sciadv.aav0547](https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0547)
- Chen, D., Zhang, Q., Tang, W., Huang, Z., Wang, G., Wang, Y., Shi, J., Xu, H., Lin, L., Li, Z., Chi, W., Huang, L., Xia, J., Zhang, X., Guo, L., Wang, T., Ma, P., Tang, J., Zhou, G., Liu, M., Liu, F., Hua, X., Wang, B., Shen, Q., Jiang, Q., Lin, J., Chen, X., Wang, H., Dou, M., Liu, L., Pan, H., Qi, Y., Wu, B., Fang, J., Zhou, Y., Cen, W., He, W., Zhang, Q., Xue, T., Lin, G., Zhang, W., Liu, Z., Qu, L., Wang, A., Ye, Q., Chen, J., Zhang, Y., Ming, R., Van Montagu, M., Tang, H., Van de Peer, Y., Chen, Y., Zhang, J. (2020): The evolutionary origin and domestication history of goldfish (*Carassius auratus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 117(47), 29775–29785. DOI: [10.1073/pnas.2005545117](https://doi.org/10.1073/pnas.2005545117)

- Chen, H.C., Wang, C., Li, I.J., Abe, G., Ota, K.G. (2022): Pleiotropic functions of *chordin* gene causing drastic morphological changes in ornamental goldfish. *Sci. Rep.*, 12(1), 19961. DOI: [10.1038/s41598-022-24444-7](https://doi.org/10.1038/s41598-022-24444-7)
- Christensen, J.M., Tiersch, T.R. (1996): Refrigerated storage of channel catfish sperm. *J. World Aquac. Soc.*, 27(3), 340–346. DOI: [10.1111/j.1749-7345.1996.tb00617.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1996.tb00617.x)
- Cojkic, A., Hansson, I., Morrell, J. (2025): Bacterial survival below zero: Impact of storage time on bacterial viability in bull semen. *Cryobiology*, 119, 105233. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2025.105233](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2025.105233)
- Contreras, P., Dumorné, K., Ulloa-Rodríguez, P., Merino, O., Figueroa, E., Farías, J.G., Valdebenito, I., Risopatrón, J. (2019): Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. *Rev. Aquac.*, 12(3), 1373–1389. DOI: [10.1111/raq.12387](https://doi.org/10.1111/raq.12387)
- DeGraaf, J.D., Berlinsky, D.L. (2004): Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture*, 234, 527–540. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2003.11.037](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.037)
- Deng, Y., Wang, Y., Deng, Q., Sun, L., Wang, R., Ye, L., Tao, S., Liao, J., Gooneratne, R. (2021): Fungal diversity and mycotoxin contamination in dried fish products in Zhanjiang market, China. *Food Control*, 121, 107614. DOI: [10.1016/j.foodcont.2020.107614](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107614)
- Depincé, A., Gabory, A., Dziejulska, K., Le Bail, P. Y., Jammes, H., Labbé, C. (2020): DNA methylation stability in fish spermatozoa upon external constraint: Impact of fish hormonal stimulation and sperm cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 87(1), 124–134. DOI: [10.1002/mrd.23297](https://doi.org/10.1002/mrd.23297)
- Dey, V.K. (2016): The global trade in ornamental fish. *Infofish International*, 4(16), 52–55.
- Donizetti, A., Fiengo, M., Minucci, S., Aniello, F. (2009): Duplicated zebrafish relaxin-3 gene shows a different expression pattern from that of the co-orthologue gene. *Develop. Growth Differ.*, 51(8), 715–722. DOI: [10.1111/j.1440-169X.2009.01131.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01131.x)
- Duman, M., Mulet, M., Altun, S., Saticioglu, I. B., Ozdemir, B., Ajmi, N., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2021): The diversity of *Pseudomonas* species isolated from fish farms in Turkey. *Aquaculture*, 535, 736369. DOI: [10.1016/j.fish.2021.101709](https://doi.org/10.1016/j.fish.2021.101709)
- Dwiardani, K.H., Sari, L.A., Sari, P.D.W., Nindarwi, D.D., Arsad, S. (2020): The effect of feed larvae *Chironomus* sp. and high pellet protein to seedling goldfish (*Carassius auratus*). In IOP Conf. Ser.: *Earth Environ. Sci.*, 441, 012015. DOI: [10.1088/1755-1315/441/1/012015](https://doi.org/10.1088/1755-1315/441/1/012015)
- El-Rhman, A., Khattab, Y., Shalaby, A. (2009): *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 27 2, 175–80. DOI: [10.1016/j.fsi.2009.03.020](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020)
- Farahani, L., Tharakan, T., Yap, T., Ramsay, J.W., Jayasena, C.N., Minhas, S. (2021): The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 9(1), 115–144. DOI: [10.1111/andr.12886](https://doi.org/10.1111/andr.12886)
- Farouk, N.I., Sabry, S.M., Elhosainy, A.M., El-Meleigy, M.A. (2025): Adaptation strategies in haloalkaliphilic fungi: *Aspergillus salinarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, and *Penicillium camemberti*. *BMC Microbiol.*, 25(1), 160. DOI: [10.1186/s12866-025-03848-1](https://doi.org/10.1186/s12866-025-03848-1)

- Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J. (2010): Evaluation of fish sperm quality. *J. Appl. Ichthyol.*, 26(5), 636–643. DOI: [10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x)
- Ferrão, M., Rocha, M., Rocha, E. (2020): Histological characterization of the maturation stages of the ovarian follicles of the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). *Anatomia*, 49, 749–762. DOI: [10.1111/ahc.12570](https://doi.org/10.1111/ahc.12570)
- Filice, M., Cerra, M.C., Imbrogno, S. (2022): The goldfish *Carassius auratus*: an emerging animal model for comparative cardiac research. *J. Comp. Physiol. B.*, 192(1), 27–48. DOI: [10.1007/s00360-021-01402-9](https://doi.org/10.1007/s00360-021-01402-9)
- Foo, J.L., Ling, H., Lee, Y.S., Chang, M.W. (2017): Microbiome engineering: current applications and its future. *Biotechnol. J.*, 12(3), 1600099. DOI: [10.1002/biot.201600099](https://doi.org/10.1002/biot.201600099)
- Formacion, M.J., Venkatesh, B., Tan, C.H., Lam, T.J. (1995): Overripening of ovulated eggs in goldfish, *Carassius auratus*: II. Possible involvement of postovulatory follicles and steroids. *Fish Physiol. Biochem.*, 14(3), 237–246. DOI: [10.1007/BF00004314](https://doi.org/10.1007/BF00004314)
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J. (2008): Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2461–2470. DOI: [10.1128/AEM.02272-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07)
- Fu, L., Lou, Y., Guo, Y., Zhou, F., Ma, J., Wang, S., Gu, Y., Fu, B., Lu, W. (2024): Seminal plasma microbiomes, sperm parameters, and cryopreservation in a healthy fertile population. *Front. Microbiol.*, 15. DOI: [10.3389/fmicb.2024.1401326](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1401326)
- Gallego, V., Asturiano, J.F. (2018): Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reprod. Fertil. Dev.*, 30(6), 820–832. DOI: [10.1071/RD17460](https://doi.org/10.1071/RD17460)
- Geffen, A.J., Evans, J.P. (2000): Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182(1–2), 61–72. DOI: [10.1016/S0044-8486\(99\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00248-3)
- Glenn III, D.W., Lang, R.P., Tiersch, T.R. (2011): Evaluation of extenders for refrigerated storage of Koi Carp and Goldfish sperm. In: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, second ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 107–124.
- Gòdia, M., Ramayo-Caldas, Y., Zingaretti, L., Darwich, L., López, S., Rodríguez-Gil, J., Yeste, M., Sánchez, A., Clot, A. (2020): A pilot RNA-seq study in 40 pietrain ejaculates to characterize the porcine sperm microbiome. *Theriogenology*, 157, 525–533. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2020.08.001](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.001)
- Good-Avila, S., Yegorov, S., Harron, S., Bogerd, J., Glen, P., Ozon, J., Wilson, B. (2009): Relaxin gene family in teleosts: phylogeny, syntenic mapping, selective constraint, and expression analysis. *BMC Evol. Biol.*, 9, 293–293. DOI: [10.1186/1471-2148-9-293](https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-293)
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Abdulfatah, A., Fontaine, P., Rodina, M., Linhart, O. (2012a): Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 76, 56–62. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2011.09.021](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.021)
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Milla, S., Křišťan, J., Golshan, M., Fontaine, P., Linhart, O. (2012b): Anti-androgen vinclozolin impairs sperm quality and steroidogenesis in goldfish. *Aquat. Toxicol.*, 122, 181–187. DOI: [10.1016/j.aquatox.2012.06.009](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.009)

- Heo, S. (2013): Fish euthanasia (SOP No. 303.01). Comparative Medicine, National University of Singapore. Letöltve: 2026. március 9., <https://cm.nus.edu.sg/attachments/303.01-fish-euthanasia.pdf>
- Heydari, H., Koc, A., Simsek, D., Gozcelioglu, B., Altanlar, N., Konuklugil, B. (2019): Isolation, identification and bioactivity screening of Turkish marine-derived fungi. *Farmacia*, 67(5) DOI: [10.31925/farmacia.2019.5.5](https://doi.org/10.31925/farmacia.2019.5.5).
- Holcomb, M., Cloud, J.G., Ingermann, R.L. (2005): Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. *Aquac. Res.*, 36(15), 1555–1561. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2005.01379.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01379.x)
- Horváth, L. (2000): Tenyésztési alapok. In: Horváth, L. (szerk.), *Halbiológia és haltenyésztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 214–432. o.
- Horváth, L., Urbányi, B. (2000): Általános szaporodásbiológia. In: Horváth, L. (szerk.), *Halbiológia és haltenyésztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 168–184. o.
- Horváth, L., Tamás, G., Seagrave, C. (1992): Carp and pond fish culture including Chinese herbivorous species, pike, tench, zander, wels catfish and goldfish. Fishing News Books Ltd., Oxford, U.K. 155 pp. ISBN: 9780852381793.
- Horváth, L., Tamás, G. Coche, A.G., Kovács, E., Moth-Poulsen, T., Woynarovich, A. (2015): Training manual on the artificial propagation of carps. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Budapest. 31.
- Hoseinifar, S., Maradonna, F., Faheem, M., Harikrishnan, R., Devi, G., Ringø, E., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Carnevali, O. (2023): Sustainable ornamental fish aquaculture: The implication of microbial feed additives. *Animals*, 13(10), 1583. DOI: [10.3390/ani13101583](https://doi.org/10.3390/ani13101583)
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., Zhang, H. (2018): Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Front. Microbiol.*, 9, 2045. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02045](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02045)
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). (n.d.). *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) (TSN 163350). Letöltve: 2026. január 30., <https://www.itis.gov>
- Iskandar, A., Nurfauzi, E., Carman, O., Indriastuti, C., Siregar, B. (2024): Optimizing goldfish hatchery of the oranda variety *Carassius auratus* to improve cultivation performance at BSD fish farm. *Nekton*, 4(2), 81–93. DOI: [10.47767/nekton.v2i2.760](https://doi.org/10.47767/nekton.v2i2.760)
- Ivánovics, B. (2023): Az aflatoxin B1 embrionális fejlődésre és veleszületett immunrendszerre gyakorolt hatásainak vizsgálata zebradánió (Danio rerio). Doktori értekezés, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gödöllő, 96. o. DOI: [10.54598/003660](https://doi.org/10.54598/003660)
- Jenkins, J.A., Tiersch, T.R. (1997): A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *J. World Aquac. Soc.*, 28, 282–288. DOI: [10.1111/j.1749-7345.1997.tb00644.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1997.tb00644.x)
- Kagawa, H., Young, G., Nagahama, Y. (1983): Changes in plasma steroid hormone levels during gonadal maturation in female goldfish *Carassius auratus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49, 1783–1787. DOI: [10.2331/suisan.49.1783](https://doi.org/10.2331/suisan.49.1783)

- Kaiser, H., Endemann, F., Paulet, T.G. (2003): A comparison of artificial and natural foods and their combinations in the rearing of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Aquac. Res.*, 34(11), 943–950. DOI: [10.1046/j.1365-2109.2003.00948.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00948.x)
- Kajishima, T. (1977): Genetic and developmental analysis of some new color mutants in the goldfish, *Carassius auratus*. *Genetics*, 86, 161–174. DOI: [10.1093/genetics/86.1.161](https://doi.org/10.1093/genetics/86.1.161)
- Kashani, Z., Imanpoor, M., Shabani, A., Gorgin, S. (2012): Effects of dietary vitamin c and e and highly unsaturated fatty acid on biological characteristic of gonad, hatching rate and fertilization success in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(2), 131–135.
- Kelsh, R.N., Brand, M., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Lin, S., Haffter, P., Odenthal, J., Mullins, M.C., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Warga, R.M., Beuchle, D., Vogelsang, L., Nusslein-Volhard, C. (1996): Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development*, 123, 369–389. DOI: [10.1242/dev.123.1.369](https://doi.org/10.1242/dev.123.1.369)
- Kestemont, P. (1995): Influence of feed supply, temperature and body size on the growth of goldfish *Carassius auratus* larvae. *Aquaculture*, 136(3–4), 341–349. DOI: [10.1016/0044-8486\(95\)00060-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00060-7)
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. Schilling, T.F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, 203: 253–310. DOI: [10.1002/aja.1002030302](https://doi.org/10.1002/aja.1002030302)
- Kiss, I. (2000): A halak testfelépítése és biológiája. In: Horváth, L. (szerk.), *Halbiológia és haltenyésztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 17–68.o
- Koenigbauer, S., Höök, T. (2023): Increased offspring provisioning by large female fish and consequences for reproductive efficiency. *Ecology and Evolution*, 13. DOI: [10.1002/ece3.10555](https://doi.org/10.1002/ece3.10555)
- Kookaram, K., Mojazi Amiri, B., Dorkoosh, F.A. Nematollahi, M.A., Mortazavian, E., Abed Elmdoust, A. (2019): Effect of oral administration of GnRHa+nanoparticles of chitosan in oogenesis acceleration of goldfish *Carassius auratus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 47, 477–486, DOI: [10.1007/s10695-021-00926-9](https://doi.org/10.1007/s10695-021-00926-9)
- Komiyama T., Kobayashi H., Tateno Y., Inoko H., Gojobori T., Ikeo K. (2009): An evolutionary origin and selection process of goldfish. *Gene*, 430(1–2), 5–11. DOI: [10.1016/j.gene.2008.10.019](https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.10.019)
- Kon, T., Omori, Y., Fukuta, K., Wada, H., Watanabe, M., Chen, Z., Iwasaki, M., Mishina, T., Matsuzaki, S.S., Yoshihara, D., Arakawa, J., Kawakami, K., Toyoda, A., Burgess, S.M., Noguchi, H., Furukawa, T. (2020): The genetic basis of morphological diversity in domesticated goldfish. *Curr. Biol.*, 30(12), 2260–2274. DOI: [10.1016/j.cub.2020.04.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.034)
- Kottler, V.A., Fadeev, A., Weigel, D., Dreyer, C. (2013): Pigment pattern formation in the guppy, *Poecilia reticulata*, involves the Kita and Csf1ra receptor tyrosine kinases. *Genetics*, 194, 631–646. DOI: [10.1534/genetics.113.151738](https://doi.org/10.1534/genetics.113.151738)
- Kowalski, R.K., Cejko, B.I. (2019): Sperm quality in fish: determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94–108. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2019.06.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009)

- Kuang, Y., Zheng, X., Li, C., Li, X., Cao, D., Tong, G., Lv, W., Xu, W., Zhou, Y., Zhang, X., Sun, Z., Mahboob, S., Al-Ghanim, K., Li, J., Sun, X. (2016): The genetic map of goldfish (*Carassius auratus*) provided insights to the divergent genome evolutions in the *Cyprinidae* family. *Sci. Rep.*, 6(1), 34849. DOI: [10.1038/srep34849](https://doi.org/10.1038/srep34849)
- Kutluyer, F., Ögretmen, F., Inanan, B.E. (2015): Effects of semen extender supplemented with L-methionine and packaging methods (straws and pellets) on post-thaw goldfish (*Carassius auratus*) sperm quality and DNA damage. *CryoLetters*, 35(5), 336–343.
- Kutluyer, F., Ögretmen, F., Inanan, B.E. (2016): Cryopreservation of goldfish (*Carassius auratus*) spermatozoa: Effects of extender supplemented with taurine on sperm motility and DNA damage. *CryoLetters*, 37(1), 41–46. PMID: 26964024.
- Kyle, A.L., Stacey, N.E., Peter, R.E., Billard, R. (1985): Elevations in gonadotrophin concentrations and milt volumes as a result of spawning behavior in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57(1), 10–22. DOI: [10.1016/0016-6480\(85\)90195-9](https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90195-9)
- Lahnsteiner, F., Urbányi, B., Horváth, Á., Weismann, T. (2001): Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. *Aquaculture*, 195, 331–352. DOI: [10.1016/S0044-8486\(00\)00550-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00550-0)
- Larcombe, E., Alexander, M., Snellgrove, D., Henriquez, F., Sloman, K. (2024): Current disease treatments for the ornamental pet fish trade and their associated problems. *Rev. Aquac.*, 17(1), e12948. DOI: [10.1111/raq.12948](https://doi.org/10.1111/raq.12948)
- Lestari, D., Siregar, T.M.S., Ginting, A.P.B., Christian, J., Nurfarah, N. (2023): Sinamot tradition in traditional Toba Batak weddings. *Interdisciplinary Journal of Advanced Research and Innovation*, 1(3), 187–191.
- Li, C., Lee, S., Kim, S., Kim, A., Lee, K., Lu, M., Kim, H., Kwak, I., Lee, Y., Kim, D., Lee, J., Kang, S., Huh, M., Chung, K., Park, J. (2009): Environmental estrogenic effects and gonadal development in wild goldfish (*Carassius auratus*). *Environ. Monit. Assess.*, 150, 397–404 DOI: [10.1007/s10661-008-0238-1](https://doi.org/10.1007/s10661-008-0238-1)
- Li, I.J., Lee, S.H., Abe, G., Ota, K.G. (2019): Embryonic and postembryonic development of the ornamental twin-tail goldfish. *Dev. Dyn.*, 248(4), 251–283. DOI: [10.1002/dvdy.15](https://doi.org/10.1002/dvdy.15)
- Li, T., Raza, S., Yang, B., Sun, Y., Wang, G., Sun, W., Qian, A., Wang, C., Kang, Y., Shan, X. (2020): *Aeromonas veronii* infection in commercial freshwater fish: a potential threat to public health. *Animals*, 10(4), 608. DOI: [10.3390/ani10040608](https://doi.org/10.3390/ani10040608)
- Li, H., Wang, X., Zhang, R., Liu, L., Zhu, H. (2024a): Generation of golden goldfish *Carassius auratus* via tyrosinase gene targeting by CRISPR/Cas9. *Aquaculture*, 583, 740594. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2024.740594](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740594)
- Li, R., Sun, Y., Zhang, X., Li, W. (2024b): Study on the short-term preservation of gametes, cross-stimulation of oocytes by distant sperm, and the impact of cold-stimulated fertilized eggs on eyes in the celestial goldfish. *Appl. Sci.*, 14(9), 3881. DOI: [10.3390/app14093881](https://doi.org/10.3390/app14093881)
- Lim, J., Hong, S. (2020): Characterization of *Aeromonas salmonicida* and *A. sobria* isolated from cultured salmonid fish in Korea and development of a vaccine against furunculosis. *J. Fish Dis.*, 43(5), 609–620. DOI: [10.1111/jfd.13158](https://doi.org/10.1111/jfd.13158)

- Liyanage, S.S.N., Bandara, K.A., Martin, K.A., Wood, K.R., Abernathy, J.W., Beck, B.H., Bruce, T.J., Roy, L.A., Dunham, R.A., Wang, X., Butts, I.A.E. (2026): Effect of short-term storage on sperm quality and microbiome dynamics in blue catfish, *Ictalurus furcatus*. *Aquaculture*, 610, 742883. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2025.742883](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742883)
- Lupo, A., Haenni, M., Madec, J. (2018): Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol. Spectr.*, 6(3), 10–1128. DOI: [10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017).
- Maceda-Veiga, A., Domínguez-Domínguez, O., Escribano-Alacid, J., Lyons, J. (2016): The aquarium hobby: can sinners become saints in freshwater fish conservation? *Fish Fish.*, 17(3), 860–874. DOI: [10.1111/faf.12097](https://doi.org/10.1111/faf.12097)
- Mahlouji, M., Alavi, S., Ghasemi, J., Jalili, A., Mozanzadeh, M., Zhang, S., Shazada, N., Butts, I., Hoseinifar, S., Linhart, O. (2025): Crude oil-induced reproductive disorders in male goldfish: testicular histopathology, sex steroid hormones, and sperm swimming kinematics. *J. Appl. Toxicol.* 45(5), 767–782. DOI: [10.1002/jat.4745](https://doi.org/10.1002/jat.4745)
- Mamun, M.M.U., Hossain, M.N., Akhter, F., Nahid, S.A.A., Zahangir, M.M., Islam, M.M. (2025): Artificial propropagation of Oranda Fancy Goldfish (*Carassius auratus auratus*) by Using Novel Synthetic Ovulin Hormone. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 26(2), TRJFAS28042. DOI: [10.4194/TRJFAS28042](https://doi.org/10.4194/TRJFAS28042)
- Mangiamele, L.A., Thompson, R.R. (2012): Testosterone rapidly increases ejaculate volume and sperm density in competitively breeding goldfish through an estrogenic membrane receptor mechanism. *Horm. Behav.*, 62(2), 107–112. DOI: [10.1016/j.yhbeh.2012.05.005](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.05.005)
- Mañanos, E., Duncan, N., Mylonas, C.C. (2009): Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish, in: Cabrita, E., Robles, V., Herraiez, P. (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture*. CRC Press, Boca Raton, 3–80. DOI: [10.1201/9780849380549](https://doi.org/10.1201/9780849380549)
- Marco-Jiménez, F., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S. (2024): Why choose the rabbit to work in reproductive technology? *Reprod. Domest. Anim.*, 59, e14640. DOI: [10.1111/rda.14640](https://doi.org/10.1111/rda.14640)
- Maruyama, K., Miura, T., Uchiyama, M., Shioda, S., Matsuda, K. (2006): Relationship between anorexigenic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and that of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides*, 27(7), 1820–1826. DOI: [10.1016/j.peptides.2006.01.013](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.01.013)
- Matthews, M., Varga, Z.M. (2012): Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J.*, 53(2), 192–204. DOI: [10.1093/ilar.53.2.192](https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.192)
- McAnally, B.E., Smith, M.S., Wiegert, J.G., Palanisamy, V., Chitlapilly Dass, S., Poole, R.K. (2023): Characterization of boar semen microbiome and association with sperm quality parameters. *J. Anim. Sci.*, 101, skad243. DOI: [10.1093/jas/skad243](https://doi.org/10.1093/jas/skad243)
- Mehdinejad, N., Imanpour, M.R., Jafari, V. (2019): Combined or individual effects of dietary probiotic, *Pediococcus acidilactici* and nucleotide on reproductive performance in goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics & Antimicro. Prot.*, 11, 233–238. DOI: [10.1007/s12602-017-9377-4](https://doi.org/10.1007/s12602-017-9377-4)

- Mellisa, S., Rahimi, S.A.E., Umiati, U. (2018): The effect of different live feeds on the growth and survival of comet goldfish *Carassius auratus auratus* larvae. In IOP Conf. Ser.: *Earth Environ. Sci.*, 216, 012025. DOI: [10.1088/1755-1315/216/1/012025](https://doi.org/10.1088/1755-1315/216/1/012025)
- Milligan, E., Calarco, J., Davis, B., Keenum, I., Liguori, K., Pruden, A., Harwood, V. (2023): A systematic review of culture-based methods for monitoring antibiotic-resistant *Acinetobacter*, *Aeromonas*, and *Pseudomonas* as environmentally relevant pathogens in wastewater and surface water. *Curr. Environ. Health Rep.*, 10(2), 154–171. DOI: [10.1007/s40572-023-00393-9](https://doi.org/10.1007/s40572-023-00393-9)
- Mocé, M.L., Esteve, I.C., Gomez, E.A., Pérez-Fuentes, S., Mocé, E. (2023): Microbial composition of goat buck's ejaculates is modified by the process of preparing and storing refrigerated semen doses. *Theriogenology* 209, 202–212. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2023.06.013](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.013)
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K. (1983): Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.*, 107(1), 95–103. DOI: [10.1242/jeb.107.1.95](https://doi.org/10.1242/jeb.107.1.95)
- Motta, J.H.S., Glória, L.S., Radael, M.C., Mattos, D.C., Cardoso, L.D., Vidal-Júnior, M.V. (2023): Effect of temperature on embryonic development and first exogenous feeding of goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). *Braz. J. Biol.*, 83, e270943. DOI: [10.1590/1519-6984.270943](https://doi.org/10.1590/1519-6984.270943)
- Munkittrick, K.R., Leatherland, J.F. (1984): Seasonal changes in the pituitary-gonad axis of feral goldfish, *Carassius auratus* L., from Ontario, Canada. *J. Fish Biol.*, 24(1), 75–90. DOI: [10.1111/j.1095-8649.1984.tb04778.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04778.x)
- 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. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2016.04.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021)
- Najim, S.M., Al-Mudhaffar, R.A., Jassim, F.K. (2012): Some reproductive characters of the fantail goldfish *Carassius auratus auratus* females from rearing ponds in Basrah, Southern Iraq. *Iraqi J. Aquacult.*, 9(1), 83–94. DOI: [10.21276/IJAQ.2012.9.1.6](https://doi.org/10.21276/IJAQ.2012.9.1.6)
- Nathanailides, C., Chanzaropoulos, T., Barbouti, A., Perdikaris, C., Zhang, T. (2011): DNA fragmentation, linear velocity and fertilizing ability of reactivated cryopreserved goldfish sperm using different cryoprotectants. *Biotechnology*, 10(6), 514–520. DOI: [10.3923/biotech.2011.514.520](https://doi.org/10.3923/biotech.2011.514.520)
- Nicoletti, R., Trincone, A. (2016): Bioactive compounds produced by strains of *Penicillium* and *Talaromyces* of marine origin. *Mar. Drugs*, 14(2), 37. DOI: [10.3390/md14020037](https://doi.org/10.3390/md14020037)
- Nowosad, J., Targońska, K., Chwaluczyk, R., Kaszubowski, R., Kucharczyk, D. (2014): Effect of temperature on the effectiveness of artificial reproduction of dace [*Cyprinidae* (*Leuciscus leuciscus* (L.))] under laboratory and field conditions. *J. Therm. Biol.* 45, 62–68. DOI: [10.1016/j.jtherbio.2014.07.011](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.07.011)
- Nurlaili, N., Eriani, K., Salma, I., Maulida, S., Rahayu, S., Handayani, L., Kocabaş, F., Siti-Azizah, M., Wilkes, M., Muchlisin, Z. (2023): Effect of cryoprotectant and pre-freezing on the sperm motility, viability and fertility of goldfish *Carassius auratus* (Pisces: *Cyprinidae*) post short-term cryopreservation. *CryoLetters*, 44(3), 169–177. DOI: [10.54680/fr23310110412](https://doi.org/10.54680/fr23310110412)

- Okomoda, V.T., Koh, I.C.C., Shahreza, S.M. (2018): A simple technique for accurate estimation of fertilization rate with specific application to *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquac. Res.*, 49(2), 1116–1121. DOI: [10.1111/are.13528](https://doi.org/10.1111/are.13528)
- Oliveira, M., Vasconcelos, V. (2020): Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. *Toxins*, 12(3), 160. DOI: [10.3390/toxins12030160](https://doi.org/10.3390/toxins12030160)
- Omori, Y., Kon, T. (2019): Goldfish: an old and new model system to study vertebrate development, evolution and human disease. *J. Biochem.*, 165(3), 209–218. DOI: [10.1093/jb/mvy076](https://doi.org/10.1093/jb/mvy076)
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J. V. (2014): Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PloS One*, 9(6), e97629. DOI: [10.1371/journal.pone.0097629](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629)
- Oplinger, R.W., Wagner, E.J. (2015): Use of penicillin and streptomycin to reduce spread of bacterial coldwater disease I: Antibiotics in sperm extenders. *J. Aquat. Anim. Health*, 27, 25–31. DOI: [10.1080/08997659.2014.966211](https://doi.org/10.1080/08997659.2014.966211)
- Ortega-Salas, A.A., Reyes-Bustamante, H. (2006): Initial sexual maturity and fecundity of the goldfish *Carassius auratus* (Perciformes: Cyprinidae) under semi-controlled conditions. *Rev. Biol. Trop.*, 54(4), 1113–1116.
- Ota, K.G. (2021a): Chapter 1: Introduction. In: Eds. Ota, K.G. *Goldfish Development and Evolution*. Springer, Singapore. 1–15 DOI: [10.1007/978-981-16-0850-6_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0850-6_1)
- Ota, K.G. (2021b): Chapter 8: Experimental Notes. In: Eds. Ota, K.G. *Goldfish Development and Evolution*. Springer, Singapore. 249–279 DOI: [10.1007/978-981-16-0850-6_8](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0850-6_8)
- Ota, K.G. (2021c): Chapter 4: Development of the Wild-Type Goldfish. In: Eds. Ota, K.G. *Goldfish Development and Evolution*. Springer, Singapore. 75–135 DOI: [10.1007/978-981-16-0850-6_4](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0850-6_4)
- Ota, K.G. (2021d): Chapter 5: Development of Mutant Goldfish Strains. In Eds. Ota, K.G. *Goldfish Development and Evolution*. Springer Singapore. 137–190 DOI: [10.1007/978-981-16-0850-6_5](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0850-6_5)
- Ota, K.G. (2021e): Chapter 3: Varieties of Goldfish Morphology. In Eds. Ota, K.G. *Goldfish Development and Evolution*. Springer Singapore. 45–73 DOI: [10.1007/978-981-16-0850-6_3](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0850-6_3)
- Ota, K.G. (2021f): Chapter 2: Goldfish as an Experimental Model. In Eds. Ota, K.G. *Goldfish Development and Evolution*. Springer Singapore. 17–44 DOI: [10.1007/978-981-16-0850-6_2](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0850-6_2)
- Ota, K.G., Abe, G. (2016): Goldfish morphology as a model for evolutionary developmental biology. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, 5(3), 272–295. DOI: [10.1002/wdev.224](https://doi.org/10.1002/wdev.224)
- Palaiokostas, C., Gohar, D., Kurta, K., Jeuthe, H., Bahram, M. (2023): Microbiome structure of milt and ovarian fluid in farmed Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*, 574, 739648. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2023.739648](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739648)
- Palomino, J., Olea, A., Ramírez, S., Dettleff, P., Moreno, R. (2025): Seasonal expression of reproductive axis-related neuroendocrine genes and their relation with ovarian maturation in

- captive yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Biol. Res.*, 58. DOI: [10.1186/s40659-025-00622-5](https://doi.org/10.1186/s40659-025-00622-5).
- Panzica-Kelly, J.M., Zhang, C.X., Augustine-Rauch, K. (2012): Zebrafish embryo developmental toxicology assay. *Dev. Tox. Methods & Protocols*, 25–50. DOI: [10.1007/978-1-61779-867-2_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2_4)
- Peh, J.H., Azra, M.N. (2025): A global review of ornamental fish and shellfish research. *Aquaculture*, 596, 741719. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2024.741719](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741719)
- Peng, Z., Gao, C., Qiao, H., Zhang, H., Huang, H., Sheng, Y., Zhang, X., Li, B., Chao, B., Kang, J., Bian, C. (2025): Exploring *Aeromonas veronii* in migratory mute swans (*Cygnus olor*): A debut report and genetic characterization. *Vet. Sci.*, 12(2), 164. DOI: [10.3390/vetsci12020164](https://doi.org/10.3390/vetsci12020164)
- Penning, M., Reid, G. McG., Koldewey, H., Dick, G., Andrews, B., Arai, K., Garratt, P., Gendron, S., Lange, J., Tanner, K., Tonge, S., Van den Sande, P., Warmolts, D., Gibson, C. (2009): Turning the tide: A global aquarium strategy for conservation and sustainability. World Association of Zoos and Aquariums, Bern, Switzerland. 79. pp.
- Piński, A., Zur, J., Hasterok, R., Hupert-Kocurek, K. (2020): Comparative genomics of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Stenotrophomonas rhizophila* revealed characteristic features of both species. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(14), 4922. DOI: [10.3390/ijms21144922](https://doi.org/10.3390/ijms21144922)
- Pradhan, S., Maity, J. (2025): Incorporating sweet lime peel (*Citrus limetta*) powder in gold fish (*Carassius auratus*) diets for improvising colour stability in home aquarium. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, 46(9), 105–16. DOI: [10.56557/upjz/2025/v46i94929](https://doi.org/10.56557/upjz/2025/v46i94929)
- Qi, M., Clark, J., Moody, E.R., Pisani, D., Donoghue, P.C. (2024): Molecular dating of the teleost whole genome duplication (3R) is compatible with the expectations of delayed rediploidization. *Genome Biol. Evol.*, 16(7), evae128. DOI: [10.1093/gbe/evae128](https://doi.org/10.1093/gbe/evae128)
- R Core Team (2024): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Radó, J. (2019): Ubikviter baktériumok környezetbiztonsági vizsgálata. Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, 195. o. DOI: [10.14751/SZIE.2019.039](https://doi.org/10.14751/SZIE.2019.039)
- Raghavan, R., Dahanukar, N., Tlustý, M. F., Rhyne, A. L., Kumar, K. K., Molur, S., Rosser, A. M. (2013): Uncovering an obscure trade: threatened freshwater fishes and the aquarium pet markets. *Biol. Conserv.*, 164, 158–169. DOI: [10.1016/j.biocon.2013.04.019](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.04.019)
- Raj, N.S., Swaminathan, T.R., Dharmaratnam, A., Raja, S.A., Ramraj, D., Lal, K.K. (2019): *Aeromonas veronii* caused bilateral exophthalmia and mass mortality in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in India. *Aquaculture*, 512, 734278. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734278](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734278)
- Reading, B., Andersen, L., Ryu, Y., 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. DOI: [10.3390/fishes3040045](https://doi.org/10.3390/fishes3040045)
- 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. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2003.12.006](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006)

- Rylková, K., Kalous, L., Šlechtová, V., Bohlen, J. (2010): Many branches, one root: First evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 302, 36–41. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.02.003](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.003)
- Sallenave-Namont, C., Pouchus, Y. F., Robiou du Pont, T., Lassus, P., Verbist, J.F. (2000): Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia*, 149(1), 21–25. DOI: [10.1023/a:1007259810190](https://doi.org/10.1023/a:1007259810190)
- Schulz, R., De França, L., Lareyre, J., Gac, L., Chiarini-Garcia, H., Nóbrega, R., Miura, T. (2010): Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165(3), 390–411. DOI: [10.1016/j.ygcen.2009.02.013](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013).
- Shameena, S., Kumar, K., Kumar, S., Kumar, S., Rathore, G. (2020): Virulence characteristics of *Aeromonas veronii* biovars isolated from infected freshwater goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 518, 734819. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734819](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734819)
- Saad, A., Billard, R. (1987): Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 65, 67–77. DOI: [10.1016/0044-8486\(87\)90271-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90271-7)
- Saad, A., Billard, R., Theron, M. C., Hollebecq, M.G. (1988): Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71(1–2), 133–150. DOI: [10.1016/0044-8486\(88\)90280-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90280-3)
- Schoenfuss, H.L., Levitt, J.T., Van Der Kraak, G., Sorensen, P.W. (2002): Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive behavior and sperm production in goldfish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(10), 2185–2190. DOI: [10.1002/etc.5620211023](https://doi.org/10.1002/etc.5620211023)
- Sertiawan, N., Dora, N. (2024): Analisis kearifan lokal melalui ikan mas di dalam perayaan budaya dan ritual keagamaan etnis Batak. *JISPENDIORA Jurnal Ilmu Sosial Pendidikan Dan Humaniora*, 3(1), 93–109. DOI: [10.56910/jispendiora.v3i1.1236](https://doi.org/10.56910/jispendiora.v3i1.1236)
- Seyedi, J., Kalbassi, M.R., Esmaeilbeigi, M., Tayemeh, M.B., Moghadam, J.A. (2021): Toxicity and deleterious impacts of selenium nanoparticles at supranutritional and imbalance levels on male goldfish (*Carassius auratus*) sperm. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 66, 126758. DOI: [10.1016/j.jtemb.2021.126758](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126758)
- Smartt, J. (2001): Goldfish varieties and genetics: handbook for breeders. Fishing News Books, Oxford. 224. p. ISBN: 978-0-470-99978-3
- Spanò, L., Tyler, C.R., Van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thomé, J.P., Kestemont, P. (2004): Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.*, 66(4), 369–379. DOI: [10.1016/j.aquatox.2003.10.009](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.009)
- Stacey, N., Fraser, E.J., Sorensen, P., Van Der Kraak, G. (2001): Milt production in goldfish: regulation by multiple social stimuli. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 130(4), 467–476. DOI: [10.1016/s1532-0456\(01\)00273-3](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00273-3)
- Stoss, J., Refstie, T. (1983): Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30(1–4), 229–236. DOI: [10.1016/0044-8486\(83\)90165-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90165-5)

- Suhajda, Á., Al-Nussairawi, M., Amara, I., Sörös, C., Tömösközi-Farkas, R., Kriszt, B., Farkas, M., Cserhádi, M. (2025): Co-occurrence of beauvericin and fumonisin producing ability of *Fusarium* strains isolated from crop plants in Hungary. *Curr. Microbiol.*, 82, 302. DOI: [10.1007/s00284-025-04243-9](https://doi.org/10.1007/s00284-025-04243-9)
- Sutisna, E., Tri, M., Sunarno, D., Samsudin, R., Pratama, I., Kholidin, E.S. (2023): Evaluation on fecundity of jelawat (*Leptobarbus hoevenii*, Bleeker 1851) cultured in floating net cages in swampy pond, Jambi. *BIO Web of Conferences*, DOI: [10.1051/bioconf/20237401010](https://doi.org/10.1051/bioconf/20237401010).
- Taghizadeh, V., Imanpoor, M., Sadeghi, A. (2013): Effect of extenders and different concentrations of methanol on motility parameters of goldfish (*Carassius auratus gibelio*) spermatozoa after short-term storage. *World J. Fish & Marine Sci.*, 5(5), 492–496. DOI: [10.5829/idosi.wjfm.2013.05.05.73199](https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2013.05.05.73199)
- Taheri-Khas, Z., Gharzi, A., Vaissi, S., Heshmatzad, P., Kalhori, Z. (2024): Hormone-driven temperature optimization for elevated reproduction in goldfish (*Carassius auratus*) under laboratory conditions. *Animals*, 14(18), 2701. DOI: [10.3390/ani14182701](https://doi.org/10.3390/ani14182701)
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021): MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 38(7), 3022–3027. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)
- Targońska, K., Kucharczyk, D. (2011): The application of hCG, CPH and Ovopel in successful artificial reproduction of goldfish (*Carassius auratus auratus*) under controlled conditions. *Reprod. Dom. Anim.*, 46(4), 651–655. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2010.01723.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01723.x)
- Tarkhani, R., Imanpoor, M.R., Taghizadeh, V. (2012): Effect of dietary 17 β -estradiol on serum sex hormones' levels and gamete quality in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Comp. Clin. Path. Res.*, 86–95.
- Terada-Nascimento, J., Dantas-Filho, J., Temponi-Santos, B., Perez-Pedroti, V., De Lima Pinheiro, M., García-Núñez, R., Muniz, I., De Mira, Á., Guedes, E., De Vargas Schons, S. (2023): Monitoring of mycotoxigenic fungi in fish farm water and fumonisins in feeds for farmed *Colossoma macropomum*. *Toxics*, 11(9), 762. DOI: [10.3390/toxics11090762](https://doi.org/10.3390/toxics11090762)
- Tischner, Zs.B. (2022): Globális megatrendek hatásai mikroszkopikus gombák előfordulására a Pannon Biogeográfiai Régióban. Doktori értekezés, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gödöllő, 142. o. DOI: [10.54598/001890](https://doi.org/10.54598/001890)
- Tizkar, B., Kazemi, R., Alipour, A., Seidavi, A., Naseralavi, G., Ponce-Palafox, J.T. (2015): Effects of dietary supplementation with astaxanthin and β -carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*). *Theriogenology*, 84(7), 1111–1117. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2015.06.011](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.011)
- Tizkar, B., Soudagar, M., Bahmani, M., Hosseini, S.A., Chamani, M. (2013): The effects of dietary supplementation of astaxanthin and β -caroten on the reproductive performance and egg quality of female goldfish (*Carassius auratus*). *Casp. J. Environ. Sci.*, 11(2), 217–231.
- Tizkar, B., Soudagar, M., Bahmani, M., Hosseini, S., Chamani, M., Seidavi, A., Sühnel, S., Ponce-Palafox, J. (2016): Effects of dietary astaxanthin and β -carotene on gonadosomatic and hepatosomatic indices, gonad and liver composition in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) broodstocks. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44, 363–370. DOI: [10.3856/vol44-issue2-fulltext-17](https://doi.org/10.3856/vol44-issue2-fulltext-17)

- Tsai, H.Y., Chang, M., Liu, S.C., Abe, G., Ota, K.G. (2013): Embryonic development of goldfish (*Carassius auratus*): a model for the study of evolutionary change in developmental mechanisms by artificial selection. *Dev. Dyn.*, 242(11), 1262–1283. DOI: [10.1002/dvdy.24022](https://doi.org/10.1002/dvdy.24022)
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1996): Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish. Biol. Fisheries*, 6, 287–318. DOI: [10.1007/BF00122584](https://doi.org/10.1007/BF00122584)
- Urbányi, B., Szabó, T., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Vranovics, K., Horváth, Á. (2006): Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. *J. Appl. Ichthyol.*, 22(3), 201–204. DOI: [10.1111/j.1439-0426.2006.00726.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00726.x)
- Urushibata, H., Takahashi, E., Shimizu, Y., Miyazaki, T., Fujimoto, T., Arai, K., Yamaha, E. (2019): Morphological differences in embryos of goldfish (*Carassius auratus auratus*) under different incubation temperatures. *Int. J. Dev. Biol.*, 63 11–12, 597–604. DOI: [10.1387/ijdb.190144hu](https://doi.org/10.1387/ijdb.190144hu).
- Valdebenito, I.I., Gallegos, P.C., Effer, B.R. (2015): Gamete quality in fish: Evaluation parameters and determining factors. *Zygote*, 23, 177–197. DOI: [10.1017/S0967199413000506](https://doi.org/10.1017/S0967199413000506)
- Van de Peer, Y., Maere, S., Meyer, A. (2009): The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.*, 10(10), 725–732. DOI: [10.1038/nrg2600](https://doi.org/10.1038/nrg2600)
- Van Look, K.J.W., Kime, D.E. (2003): Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *J. Fish Biol.*, 63(4), 1020–1033. DOI: [10.1046/j.1095-8649.2003.00226.x](https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00226.x)
- Várkonyi, L. (2021): A balatoni sudár ponty (*Cyprinus carpio morpha accuminatus*) és a hévízi törpenövésű magyar vadponty (*Cyprinus carpio morpha hungaricus*) spermamélyhűtésének és intenzív rendszerben történő szaporításának vizsgálata, valamint *in vitro* spermabankjának megalapozása. Doktori értekezés, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gödöllő, 139 o. DOI: [10.54598/000860](https://doi.org/10.54598/000860)
- Vincent, A., Charette, S. (2022): To be or not to be mesophilic, that is the question for *Aeromonas salmonicida*. *Microorganisms*, 10. DOI: [10.3390/microorganisms10020240](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020240)
- Viveiros, A.T., Isaú, Z.A., Figueiredo, H.C., Leite, M.A., Maria, A.N. (2010): Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. *J. World Aquacult. Soc.*, 41, 57–65. DOI: [10.1111/j.1749-7345.2009.00333.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00333.x)
- Walser, C., Phelps, R. (1993): Factors influencing the enumeration of channel catfish eggs. *Prog. Fish-Cult.*, 55(3), 195–198. DOI: [10.1577/1548-8640\(1993\)055<0195:fiteoc>2.3.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1993)055<0195:fiteoc>2.3.co;2)
- Wang, S., Luo, J., Murphy, R., Wu, S., Zhu, C., Gao, Y., Zhang, Y. (2013): Origin of chinese goldfish and sequential loss of genetic diversity accompanies new breeds. *PLoS One*, 8(3), e59571. DOI: [10.1371/journal.pone.0059571](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059571)
- Wang, Y., Tan, H., Zhang, M., Zhao, R., Wang, S., Qin, Q., Wang, J., Zhang, C., Tao, M., Ma, M., Chen, B. Liu, S. (2020): The hybrid genome of a new goldfish-like fish lineage provides insights into the origin of the goldfish. *Front. Genet.*, 11(122). DOI: [10.3389/fgene.2020.00122](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00122)
- Waycott, L.J. (2020): Reflective creatures: goldfish, affluence, and affect in gilded age New York. *Winterthur Portfolio*, 54(23), 149–183. DOI: [10.1086/712108](https://doi.org/10.1086/712108)

- Wiegand, M.D., Buchanan, L.G., Loewen, J.M., Hewitt, C.M. (1988): Effects of rearing temperature on development and survival of embryonic and larval goldfish. *Aquaculture*, 71(3), 209–222. DOI: [10.1016/0044-8486\(88\)90260-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90260-8)
- Wiegand, M.D., Hataley, J.M., Kitchen, C.L., Buchanan, L.G. (1989): Induction of developmental abnormalities in larval goldfish, *Carassius auratus* L., under cool incubation conditions. *J. Fish Biol.*, 35(1), 85–95. DOI: [10.1111/j.1095-8649.1989.tb03395.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03395.x)
- Williot, P., Kopeika, E.F., Goncharov, B.F. (2000): Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture*, 189(1–2), 53–61. DOI: [10.1016/S0044-8486\(00\)00358-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00358-6)
- Woynárovich, E., Woynárovich, A. (1980): Modified technology for elimination of stickiness of common carp (*Cyprinus carpio*) eggs. *Aquaculture Hungarica*, 2, 19–21.
- Wu, T., Wu, Y., Li, Y., Du, Y., Feng, S., Wang, D., Zhou, L. (2024): Genome-wide analysis of two different regions of brain reveals the molecular changes of fertility related genes in *rln3a*-/- mutants in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 354, 114543 DOI: [10.1016/j.ygcen.2024.114543](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2024.114543)
- Xu, Q., Ye, M., Su, Y., Feng, L., Zhou, L., Xu, J., Wang, D. (2024): Hypogonadotropic hypogonadism in male tilapia lacking a functional *rln3b* gene. *Int. J. Biol. Macromol.*, 270(1), 132165. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2024.132165](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132165)
- Yan, N., Huo, J., Chung-Davidson, Y. W., Cui, W., Huang, W., He, W., Zhang, Q., Li, W., Zhou, Y., Ren, J. (2022): Differences in postembryonic dorsal fin development resulted in phenotypic divergence in two goldfish strains, Red Cap Oranda and Ranchu. *Aquac. Fish.*, 7(4), 396–404. DOI: [10.1016/j.aaf.2020.07.009](https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.07.009)
- Yang, L., Li, Y., Wu, Y., Sun, S., Song, Q., Wei, J., Sun, L., Li, M., Wang, D., Zhou, L. (2020): *Rln3a* is a prerequisite for spermatogenesis and fertility in male fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 197. DOI: [10.1016/j.jsbmb.2019.105517](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105517)
- Yegorov, S., Good-Avila, S.V., Parry, L., Wilson, B.C. (2009): Relaxin family genes in humans and teleosts: bioinformatic analyses and expression of three RLN genes in teleosts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1160(1), 42–44. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2009.03842.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03842.x)
- Yu, P., Wang, Y., Li, Z., Jin, H., Li, L.L., Han, X., Wang, Z.W., Yang, X.L., Li, X.Y., Zhang, X.J., Zhou, L., Gui, J.F. (2022): Causal gene identification and desirable trait recreation in goldfish. *Sci. China Life Sci.* 65, 2341–2353. DOI: [10.1007/s11427-022-2194-7](https://doi.org/10.1007/s11427-022-2194-7)
- Zadmajid, V., Imanpoor, M.R., Shabani, A., Baharlouei, A. (2013): Evaluation of sperm characteristics and plasma testosterone in the goldfish (*Carassius auratus*) during four consecutive seasons. *Comp. Clin. Path.* 22, 703–711. DOI: [10.1007/s00580-012-1470-1](https://doi.org/10.1007/s00580-012-1470-1)
- Zhang, J., Qiao, D., Wang, H., Zhao, X., Jiang, X., Zhu, L., Zhang, J., Li, L., Kong, X., Pei, C. (2025): Mixed infection in common carp (*Cyprinus carpio*) Caused by *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, and *Citrobacter freundii*. *Animals*, 15. DOI: [10.3390/ani15060805](https://doi.org/10.3390/ani15060805)
- Zuhlke, A. (2024): Frames of glass: goldfish and gender in paint, performance, and print, 1870–1914. *Victorian review* 49(2), 221–240. DOI: [10.1353/vcr.2024.a936088](https://doi.org/10.1353/vcr.2024.a936088)

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném őszinte hálámat kifejezni **Dr. Bernáth Gergely** és **Dr. Bokor Zoltán** témavezetőimnek a fáradhatatlan szakmai és baráti támogatásukért, mentorálásukért, valamint a több éven át tartó, doktori munkán is túlmutató, közös munkáért.

Kiemelt köszönettel tartozom **Prof. Dr. Urbányi Bélának**, jelenlegi vezetőmnek és a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet egykori vezetőjének a doktori munkám hátterének megteremtéséért, de még inkább a belém vetett bizalmaért és szüntelen támogatásáért.

Köszönet illeti **Dr. Ittész Istvánt** a szakma gyakorlati oldalának bemutatásáért és a kísérleti állomány biztosításáért, valamint **Dr. Kaszab Editet** a mikrobiológia területén nyújtott szakmai segítségéért és támogató hozzáállásáért.

Szeretném megköszönni a sok éves közös munkát, támogatást és szakmai segítségnyújtást **Dr. Kobolák Juliannának** a Halgazdálkodási tanszék vezetőjének, valamint a tanszék jelenlegi és egykori munkatársainak, kiemelve **Farkas Anasztáziát**, **Prof. Dr. Horváth Ákost**, **Dr. Csorbai Balázst**, **Dr. Lefler Kinga Katalint**, **Dr. Balogh Rékát**, **Kitanovic Nevenát**, **Várkonyi Dávidot**, **Bartucz Tamást**, **Ádám Róbertet**, **Láng Levente Zetét**, **Csókás Endrét**, **Izsák Tibort**, **Dr. Molnár Józsefet** és **Dr. Várkonyi Leventét**.

Köszönettel tartozom **Péter Dániel**, **Suhajda Ákos**, **Göbölös Balázs**, **Dr. Kánainé Sipos Dóra**, **Dr. Staszny Ádám**, **Dr. Ferincz Árpád**, **Prof. Dr. Müller Tamás**, **Dr. Csenki-Bakos Zsolt**, **Dr. Kovács Balázs**, **Dr. Farkas Milán**, **Dr. Szabó István**, **Dr. Tischner Zsófia**, **Dr. Harkai Péter**, **Benséné Feket Ildikó** jelenlegi és egykori Intézeti kollégáknak a laborban és az elemzések során nyújtott szakmai segítségükért.

Kiemelt köszönet illeti **Dr. Ivánovics Bencét** a szakmai, de még inkább a baráti támogatásáért a doktori cselekmény egésze alatt.

Köszönet illeti továbbá **Pelech Magdi** angoltanáromat a doktori munka során nyújtott nyelvi segítségéért és lelki támogatásáért.

Végül szeretném megköszönni családom és barátaim támogatását.