



Szent István Egyetem

**A HARCSEA (*SILURUS GLANIS*) ÉS A SÜLLŐ (*SANDER
LUCIOPERCA*) SPERMA MÉLYHÚTHETŐSÉGÉNEK
VIZSGÁLATA GYAKORLATI SZEMPONTOK ALAPJÁN**

Doktori értekezés tézisei

Bokor Zoltán

GÖDÖLLŐ

2009

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

alprogram: Halbiológia és halgazdálkodás

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Urbányi Béla
Egyetemi docens
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

Társ-témavezető: Dr. Horváth Ákos
Tudományos főmunkatárs
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A társ-témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

1.1. A munka előzményei

A harcsa (*Silurus glanis*) - más néven leső vagy szürkeharcsa - indukált szaporítása régóta bevált technológia alapján történik. Problémák azonban még így is jelentkezhetnek: a hím ivartermék kinyerésének módja napjainkban a herék kioperálása. Ez a módszer az értékes hímek csak egyszeri felhasználását teszi lehetővé. Másodsorban az ivarok megkülönböztetése nagy szakértelmet igényel, és még így is fennáll annak a veszélye, hogy éretlen, kistestű ikrást áldoznak fel hím egyedek helyett. Az ismertetett problémákból kifolyólag a szaporítás sikeressége veszélybe kerülhet (URBÁNYI et al. 2007).

Süllő (*Sander lucioperca*) esetében az utóbbi években több gazdaságban és kutató intézményben egyidejűleg végeztek sikeres vizsgálatokat a süllő hormonálisan indukált keltetőházi szaporításának kidolgozására. A nőivarú egyedek fejésének szinkronizálása jelenleg még nem tökéletes, ezért a sikeres fejés folyamatos figyelmet, ellenőrzést igényel. Éppen ezért a hímek jelenlétének minimalizálása és a sperma minél egyszerűbb módon történő biztosítása koncentrálhatja a figyelmet az ikrások felé. A dolgozatban érintőlegesen tárgyalt kősüllő (*Sander volgensis*) spermamélyhűtési vizsgálatoknak a süllő-kősüllő hibridek létrehozásakor lehet jelentősége.

Mindezen nehézségek és kockázatok csökkentésére megoldást jelenthet a mélyhűtött hím ivartermék felhasználása a gyakorlati keltetőházi halszaporítás folyamatában. A halsperma-mélyhűtés története az 1950-es évek elejére nyúlik vissza, azóta több mint 200 halfaj spermáját hűtötték sikerrel a kutatók világszerte (RANA 1995). Ennek ellenére a mélyhűtött halsperma gyakorlatban történő felhasználása napjainkban még nem jelentős, szemben például a szarvasmarha ágazattal. A halsperma mélyhűtésre irányuló kutatások jelentős hányada megakad a folyamatok optimalizálásán, a kis mennyiségű hím ivartermék hűtésén, azaz a laborkísérletek szintjén, alapvető gyakorlati kimenet nélkül.

Sikeres, gyakorlatban is alkalmazható mélyhűtési módszer segítségével nemcsak a szaporítás kockázatainak csökkentésére nyílna mód, hanem többek között a haltenyésztésben eddig csak kezdeti szinten, a ponty esetében alkalmazott értékes

tenyészegyedek örökítőanyagának hosszú távú tárolására és a szarvasmarha tenyésztésben alkalmazott spermabank kialakítására is, fokozva ezzel a haltenyésztésben eddig még kevésbé alkalmazott állattenyésztési szelekciós eljárások szerepét és értékét.

Tanszékünk mélyhűtési kutatócsoportja 15 éves szakmai múlttal rendelkezik. Ez a dolgozat a hosszú évek mélyhűtési munkájának fontos állomása, mely a módszer gyakorlati felhasználást állítja a fókuszba.

1.2. Célkitűzés

A bevezetésben leírtak alapján kísérleteim megkezdése előtt a következő célokat tűztem ki:

- A harcsasperma nagy mennyiségű mélyhűtési módszerének kidolgozását követően, a mélyhűtött sperma keltetőházi körülmények közötti sikeres alkalmazását kísérlem meg, alkalmazkodva a gyakorlati harcsaszaporítás menetéhez.
- Kísérletet teszek harcsa esetében annak bizonyítására, hogy a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából származó lárvák életképessége és növekedése nem marad el a friss spermával termékenyített ikrából származó lárvák hasonló paramétereitől, alátámasztva ezzel a mélyhűtött sperma gyakorlati alkalmazhatóságát.
- Kísérletet teszek a süllő és a kősüllő spermájának sikeres mélyhűtésére, majd a módszert előkísérletek során tesztelem keltetőházi körülmények között süllő fajon.
- Megkísérlem a harcsa és a süllő spermájának vizsgálatát egy számítógépes spermavizsgáló rendszer (CASA) segítségével.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Kísérletek harcsa (*Silurus glanis*) fajon

2.1.1. A hím ivartermék gyűjtésének és mélyhűtésének módszere

A kísérletek során a felhasznált ivarterméket minden esetben a tejes harcsák előlését követően, a hasüregből eltávolított herékből közvetlenül (nem fejéssel) nyertem. A herét, a hasüregből történő kiemelését követően, száraz mullpólyán felvágtam és a spermát a pólyán keresztül Petri-csészébe préseltem.

A sperma kiprélése után meghatároztam az ivartermék motilitását fénymikroszkóp alatt, 200-szoros nagyításon.

Védőanyagként 10%-os végső koncentrációjú metanolt, illetve hígítóként 6%-os fruktózt használtam. A hűtőmedium pH-ját 7,73-ra állítottam be 1 M NaHCO₃ oldat segítségével. A spermát 1:1 arányban kevertem össze a hűtőmediummal. Az így kapott hígított spermából 4 ml-t pipettáztam egy 5 ml-es műszalmába.

A hűtés során nitrogént öntöttem egy polisztirol dobozba, felszínére 3 cm magas polisztirol keretet helyeztem, majd arra fektettem a feltöltött műszalmákat. Felhasználásig a mintákat kaniszteres kannában tároltam.

A műszalmákat 40°C-os vízfürdőben olvasztottam fel 40 másodpercig. A felolvasztást követően a műszalmák lezárt végét felvágtam és a szalmák tartalmát kémcsőbe vagy közvetlenül a termékenyítendő ikratételre öntöttem. A felolvasztott sperma motilitását a fent leírtak szerint vizsgáltam. Az itt közölt módszert a diplomamunkám (BOKOR 2005) és a Halgazdálkodási Tanszék mélyhűtési csoportjának korábbi, afrikai harcsán végzett sikeres vizsgálatai alapján (URBÁNYI et al. 1999; HORVÁTH és URBÁNYI 2000) állítottam össze.

2.1.2. A hűtési időre és a sperma-ikra arányra vonatkozó kísérletek

A 2005 évben a mélyhűtéshez a hím ivarterméket a Szarvas-Fish Kft. tukai telepéről, illetve a Szegedfish Kft. szegedi telepéről szereztem be, az ott folyó szaporítási munkákba bekapcsolódva. A hím egyedeket a gazdaság munkatársai 4 mg/ttm kg hipofízissel oltották egy adagban a sperma kinyerését megelőzően. A halak testhosszát, testtömegét, valamint a here tömegét lemértem. A here és a testtömeg

hányadosából meghatároztam a gonado-szomatikus indexet (GSI). A sperma kipréselése után meghatároztam az ivartermék motilitását az előbbieken leírt módon. Az előzőekben leírt mélyhűtési módszert alkalmaztam az ivartermék begyűjtését követően, annyi kiegészítéssel, hogy a Tukán gyűjtött minták esetében teszteltem, hogy a hűtési idő hogyan befolyásolta a felolvasztott minták motilitását és termékenyítő képességét. Ezért a minták hűtési ideje 3, 5, illetve 7 perc volt. A hűtési idő leteltével a szalmákat a cseppfolyós nitrogénbe helyeztem.

Az első termékenyítési kísérletekre a Fish-Coop Kft. szajoli telepén került sor. A halaktól egy rutin szaporítási eljárás során nyertem ki az ikrát. Az első kísérletsorozatban az ikrát 40, 80 és 120 g-os adagokra osztottam szét és azt termékenyítettem meg 1-1 műszalmányi mélyhűtött spermával. A termékenyített ikrát 7 l-es Zuger-üvegekben inkubáltam. Keléskor meghatároztam a kelési arányt.

A második kísérletsorozatot az Attalai Hal Kft. attalai tógazdaságában végeztem el, melynek során az ikrát két 150 g-os adagra osztottam szét, az egyik ikrátételt egy, a másikat két műszalmányi felolvasztott spermával termékenyítettem meg. Mindkét tétel esetében a hűtési idő 7 perc volt. Keléskor meghatároztam a kelő és a torz fejlődésű lárvák arányát.

A vizsgálatok folyamán meghatároztam a hűtési sebességet is. Egy műszalmát megtöltöttem a mélyhűtés során alkalmazott hűtőmediummal. A műszalmába egy Digi-Sense DualLogR digitális hőmérő (Eutech Instruments, Szingapúr) K típusú szenzorját helyeztem és a szalmát egy 3 cm magas polisztirol keretre helyeztem, amit a cseppfolyós nitrogén felszínére tettem. A hőmérő 1 másodperces intervallumokkal feljegyezte a hőmérsékleti értékeket. A hűtési értékeket 6 percen keresztül rögzítettem, mivel a hőmérő memóriájának tárolókapacitása ennyi adat rögzítését tette lehetővé.

2.1.3. Szaporítási szezonon kívülről származó sperma mélyhűtése és tesztelése keltetőházi (üzemi) körülmények között

A 2006. évi szezonban az Aqua-kultúra Kft. (jelenleg Böcsi Önkormányzat, Körömi Haltelep) körömi telepéről gyűjtöttem be harcsaspermát januárban és márciusban (szaporítási szezonon kívül), vízátfolyásos intenzív rendszerben tartott harcsáktól, melyeket medencében, változatlan, 20°C-os vízhőmérsékleten tartottam. A

mélyhűtés módszere megegyezett a korábbiakban leírtakkal, annyi különbséggel, hogy a polisztirol kereten 7 percig hűtöttem a spermát a folyékony nitrogénbe helyezést megelőzően. A sperma motilitását a friss és a mélyhűtött mintákban is vizsgáltam.

A termékenyítési kísérleteket a Fish-Coop Kft. szajoli telepén végeztem el. Ehhez a 2005. évadból Szegedről és a 2006. évi körömi hűtésből származó mintákat használtam fel. Az ikramennyiséget egy rutin szaporítási eljárás során nyertem ki az anyahalaktól. A kísérletsorozat során az ikrát 250 és 350 g-os adagokra osztottam szét és azt termékenyítettem meg egy műszalmányi mélyhűtött spermával. A megtermékenyített ikratételeket 7 l-es Zuger-üvegekben inkubáltam, majd a kelést követően meghatároztam a kelési arányt.

2.1.4. Alkalmazás keltetőházi (üzemi) körülmények között

Ezeknek a kísérleteknek az volt a célja, hogy a nagy mennyiségben mélyhűtött spermával (5 ml-es műszalma) üzemi mennyiségű ikratételeket (150-350 g) termékenyítsek országsszerte az adott gazdaság szaporítási munkálataihoz csatlakozva, vizsgálva a módszer megbízhatóságát és ismételhetőségét. Egy adag ikrát minden esetben egy műszalmával termékenyíttem. A munka folyamán öt különböző gazdaságban végeztem termékenyítést mélyhűtött spermával a rutin szaporító munka keretében:

- az Attalai Haltermelő és Értékesítő Kft. attalai tógazdaságában,
- a Bócsi Önkormányzat körömi haltelepén,
- a TEHAG Kft. százhalombattai gazdaságában,
- az Aranykárász Bt. ördögösi gazdaságában,
- a Szegedfish Kft. szegedi gazdaságában.

Az attalai kísérletben a szaporítási szezonon kívül gyűjtött és mélyhűtött spermát használtam fel 200 g-os ikratételek termékenyítéséhez 2007. május 15-én.

A körömi kísérletet 2007. május 17-én végeztem, mely során szintén szaporítási szezonon kívül gyűjtött és mélyhűtött spermát használtam a termékenyítés során. Mind a kezelt, mind a kontroll vizsgálatokban 200 g-os ikratételeket termékenyítettem.

Ezt követően a TEHAG Kft. százhalombattai telepén termékenyítettem 200 g-os ikratételeket 2007. május 22-én. Ebben az esetben a 2006. évben, ívási szezonban mélyhűtött szegedi spermát használtam fel a kísérletekben.

A negyedik kísérlet során 2007. május 21-én az Aranykárász Bt. ördögösi telepén szaporítási szezonon kívül mélyhűtött spermával termékenyítettem 200-350 g ikratételeket.

Az utolsó kísérlet a Szegedfish Kft. keltetőházában zajlott 2007. május 23-án. A munka során a Szegedről származó mélyhűtött spermával termékenyítettem 150 g-os ikratételeket.

Minden esetben az adott gazdaság üzemi szaporítási munkájába kapcsolódtam be, gyakorlatilag azzal a módszerrel, hogy bizonyos ikratételekhez biztosítottam a rendelkezésre álló mélyhűtött sperma tételeket. A szaporítás minden esetben az adott gazdaság szokásainak megfelelő módon zajlott. Egy adag ikrát egy műszalmányi felolvasztott spermával termékenyítettem meg. Az összes kísérletben meghatároztam a kelő lárvák százalékos arányát, továbbá az attalai kísérlet során vizsgáltam a termékenyülési arányt is 4-8 sejtés állapotban.

2.1.5. Lárva megmaradási kísérletek

A lárvamegmaradás tesztelése és vizsgálata érdekében 2007-ben a táplálkozó, míg 2008-ban a nem táplálkozó harcsalárvák megmaradását, növekedését vizsgáltam.

Táplálkozó lárvaszakasz vizsgálata

A táplálkozó lárva üzemi vizsgálata során a lárvákat a TEHAG Kft. százhalombattai keltetőházában állítottam elő a helyi szaporítási eljárás keretein belül. A termékenyítés során 200 g ikrához 1 műszalma spermát adtam. A megtermékenyített ikrát 200 g-ként 7 literes Zuger-üvegbe helyeztem. A kontrollnak szánt egyedek szaporításához a gazdaság saját hímjeinek natív spermáját használtam. A termékenyítést követő második napon a kelő lárvákat megszámláltam, majd a kelést követően a még nem táplálkozó, függeszkedő lárvákat lárvatartó konténerekbe helyeztem. A kelést követő harmadik napon, amikor a lárva táplálkozásukat elkezdik, megszámláltam a kísérletre szánt egyedeket, és kihelyeztem őket vályúkba. Egy 100 l-es átfolyó rendszerű vályúba 1000 egyedeket helyeztem 3 ismétlésben. A kontroll

egyedek száma is 3×1000 volt. Az állományt a kísérlet során vágott tubifex-el táplálták 3 óránként. A gazdaság munkatársai a betegségek megelőzése érdekében 36%-os formalinkezelést alkalmaztak 10 ml/vályús koncentrációban 4 órás időközönként. Az egyes vályúkban a vízátfolyás sebessége 3 l/perc volt. A vályús nevelés a gyakorlatban szokásos 10 napig tartott.

A laboratóriumi kísérleteket a Halgazdálkodási Tanszéken végeztem. A kísérletben használt recirkulációs rendszer vályúi 40 cm hosszúak, 15 cm mélyek, és 10 cm szélesek voltak (a vízmélység a kivezető csomagtól miatt 10 cm volt). A rendszert egy besötétített szobában helyeztem el, a kisharcsák fényérzékenysége miatt. A kísérletben kezelésenként (kontroll és mélyhűtött spermából keltetett ivadékok) 5×100 egyeddel állítottam be. A halakat az első 4 napban 3 óránként etettem. A reggeli, illetve az esti időpontokban gyűjtött planktonnal, a többi etetési időpontban Perla Proactiv 4.0 haltápot adtam a kísérleti halaknak. A 4 nap elteltével naponta 4-szer, az előbb említett táppal (esetenként planktonnal, illetve Artemiával) etettem. A vályúkban a vízátfolyás sebessége 0,25 l/perc volt.

A testhosszon és a testtömegén kívül mértem kondíció faktort, fajlagos növekedési sebességet (S.G.R.) és megmaradási %-ot.

Nem táplálkozó lárvaszakasz vizsgálata

Ebben az életkorban nem végeztem üzemi vályús kísérletet, mivel a vályús rendszer nem volt alkalmas a kisméretű lárvák tartására, továbbá az ivadéknevelési gyakorlat ebben az életkorban nem használja a vályús nevelési eljárást.

A nem táplálkozó lárvaszakasz során vizsgált lárvák előállítását 2008 júniusában végeztem szintén a TEHAG Kft. keltetőjében. A szaporítás és a mélyhűtött sperma felhasználásának módja megegyezett a táplálkozó lárvaszakasz vizsgálatánál leírtakkal. A kelést követően a lárvákat Gödöllőre a Halgazdálkodási Tanszék laborjába szállítottam, ahol az előző évben felállított rendszer segítségével vizsgáltam a halak megmaradását. A kísérlet 4 napig tartott.

2.1.6. Alkalmazott statisztikai módszerek

A hűtési idő és az ikramennyiség kelési arányra kifejtett hatását a szajoli kísérlet során (2.1.2-es pont) kétszemponos varianciaanalízis segítségével vizsgáltam

($P < 0,05$). A 2.1.3-as fejezetben a két ütemben szezonon kívül gyűjtött here esetében a GSI értékek összehasonlítását kétmintás t-próba segítségével végeztem. A 2.1.4-es fejezetben szereplő termékenyítési kísérletekben a mélyhűtött és kontroll spermával kapott kelési eredményeket szintén kétmintás t-próbával elemeztem. Ezeket a statisztikai próbákat GraphPad Prism 4.0 for Windows program segítségével végeztem el. A lárvatartási vizsgálatok során a megmaradást χ^2 -próbával (Kruskal Wallis teszt), míg a testhossz, testtömeg, kondíció faktor, SGR értékeket kétmintás t-próba segítségével hasonlítottam össze (2.1.5-es fejezet) SPSS 13 for Windows szoftver használatával.

2.2. Kísérletek süllő és kősüllő fajokon

2.2.1. Süllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata

A halak származása

Két kísérleti helyszínen és két alkalommal végeztem kísérleteket süllőn: az első helyszín a Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdasági Kar, keszthely-tanyakeresztli Hallaborjában, míg a második helyszín az Attala Hal Kft. attalai keltetőjében volt. A kősüllő fajon végzett kísérletek az első helyszínen egy időben folytak a süllőével.

Az első kísérlet

A halak tartása és kezelése

Az első kísérletben szereplő süllőállomány az Aranypony Zrt-től származott (Sáregres-Rétimajor) (8 nőstény és 10 hím: 1424-1870 g). A hímeket szegfűszeg olaj segítségével altattuk, majd a spermát kézi fejjel egy automata pipetta segítségével gyűjtöttem össze, ügyelve arra, hogy vizelettel, illetve bélsárral ne szennyeződjön az ivartermék.

A sperma vizsgálata

A friss sperma motilitását vízzel aktiválva becsültem meg. A motilitást tárgylemezen vizsgáltam kb. 20-szoros hígításban, 200-szoros nagyítás mellett, Zeiss Laboval 4 mikroszkóp segítségével (Carl Zeiss, Jena, NDK). A sperma sűrűségét Bürker-kamrás módszerrel állapítottam meg 1000×-es hígításban. A kamra egyes négyzeteiben megszámláltam a hímivarsejtek számát, majd ezt átlagoltam. A ml-

enkénti sejtszámot (N) a következő képlet segítségével számoltam ki a Bürker-kamrában számolt sejtek átlagából (X):

$$N = X \times 25 \times 10 \times 1000 \times 1000$$

Magyarázat: a Bürker-kamra egy négyzetének területe $1/25 \text{ mm}^2$, magassága $1/10 \text{ mm}$, így kaptam meg az $1 \text{ }\mu\text{l}$ -ben lévő sejtszámot, ezt szorozva 1000-rel kaptam meg a ml-enkénti sejtszámot és az utolsó szám a hígítási arány.

A hűtőműkörmök összeállítása

A következő hígítókat készítettem:

- Glükóz hígító (350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8,0)
- KCl hígító (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0)
- Szacharóz hígító (300 mM szacharóz, 30 mM Tris, pH 8,0)

Védőanyagként metanolt, illetve dimetil-szulfoxidot (DMSO) használtam 10% végső koncentrációban. Minden a kísérletben szereplő vegyszert a Reanal Kft-től rendeltem (Budapest, Magyarország).

A sperma mélyhűtése

A hűtőműkörmrel (200 μl védőanyag, 1600 μl hígító) 1:9 arányban (HORVÁTH et al. 2003; URBÁNYI et al. 2006) kevert spermát (200 μl) az előre egyedileg megjelölt, 0,5 ml-es műszalmákba, 3 perces egyensúlyozási idő után szívtam fel. A hűtést egy folyékony nitrogénnel megtöltött polisztirol dobozban végeztem. A nitrogén felszínére egy 3 cm magas polisztirol keretet helyeztem, majd erre fektettem a műszalmákat, ahol a hőmérséklet -165°C körül alakult. A hűtés ideje 3 perc volt. A hűtés után a szalmákat folyékony nitrogénbe helyeztem és felhasználásig ott tároltam. A felolvasztás 40°C -os vízfürdőben történt 13 másodpercig (HORVÁTH et al. 2003; HORVÁTH et al. 2005). A felolvasztás után a sperma motilitását a friss spermánál leírt módon vizsgáltam.

Termékenyítés mélyhűtött spermával

Az ikrát 5 cm átmérőjű Petri-csészékbe osztottam ki 200-350 ikraszemes adagokban. A termékenyítést fél műszalma (250 μl) felolvasztott spermával végeztem, rögtön miután a vízfürdőből kivettem a műszalmát. Az ikratételekre ráöntöttem a

spermát, majd az ivarterméket 1 ml vízzel aktiváltam. Ezután az ikrát hagytam a Petri-csésze aljára letapadni, ügyelve arra, hogy az ikraszemek egy rétegben helyezkedjenek el. A termékenyülési arányt neurula stádiumban számoltam.

A második kísérlet

A második kísérletet a keltetőházi süllőszaporítással párhuzamosan végeztem. A kísérletben 4 hím spermáját és 1 nőstény ikráját használtam. Ebben az esetben csak a glükóz hígítót használtam 10%-os végső koncentrációjú metanol és DMSO védőanyagokkal. A spermát 1:1 és 1:9 arányban hígítottam. A mélyhűtés és felolvasztás menete megegyezik az első kísérletben alkalmazott eljárással.

Az ikrát 10 g-os (kb. 10 000 ikraszem a számolásom szerint) adagokra osztottam műanyag edényekbe. Minden adagot egy felolvasztott műszalmányi minta (0,5 ml) segítségével termékenyítettem, majd az egyes tételeket 7 l-es Zuger-üvegekbe helyeztem a kelésig. Ezt követően megszámláltam a kikelt lárvákat és meghatároztam a kelési százalékot.

2.2.2. Kősüllő (*Sander volgensis*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata

A kősüllő fajon végzett kísérletek az első süllős kísérlettel párhuzamosan, azonos helyszínen folytak.

Az anyákat a Balatoni Halászati Zrt. halászati tevékenysége közben gyűjtöttük a Balatonból. A vizsgálatban 5 kősüllő spermáját használtam. A spermagyűjtés és a motilitás vizsgálat megegyezik a süllőnél leírtakkal. A motilitás vizsgálatot követően a 2-3. és a 4-5. egyedek spermáját 2 adagban összekevertem. Ebben az esetben szintén csak a glükóz hígító összeállítást használtam a mélyhűtés során. Védőanyagként 10%-os végső koncentrációjú metanolt alkalmaztam. A spermát 1:1 arányban hígítottam a hűtőmediummal és nitrogén gőzben végeztem a hűtést. A mélyhűtés és felolvasztás folyamata azonos a süllőnél alkalmazott módszerrel.

Az ikrát 5 cm átmérőjű Petri-csészébe helyeztem megközelítőleg 150-400 db-os adagokban. Ezeket az adagokat fél műszalma (0,25 ml) tartalmával termékenyítettem. Az ivartermékeket vízzel aktiváltam és hagytam, hogy az ikra a Petri-csészék aljára tapadjon, ahol megtörtént az inkubáció. Ezt követően kelési százalékot számoltam.

2.2.3. Mélyhűtött süllősperma alkalmazása keltetőházi (üzemi) körülmények között (előkísérlet)

A kísérletet 2007 áprilisában végeztem az Attala Hal Kft. keltetőházában. A munka során felhasznált ivartermék szintén ugyanettől a cégtől származott. A hím és nőstény egyedeket a gazdaságban használt módszerrel kezelték a helyi keltetőházi szaporítással párhuzamosan. Az előző kísérletek során nehéz volt elkerülni a sperma vizelettel történő keveredését, így ebben az esetben a fejest egy szilikon katéter (belső átmérő: 1 mm, külső átmérő: 1,5 mm) segítségével végeztem, melyet felhelyeztem az ondóvezetékbe. A motilitás vizsgálatot az előzőekben leírtak alapján végeztem. A sperma koncentrációt 1000-szeres hígítás mellett vizsgáltam Bürker-kamrában.

Három hímtől származó spermát használtam a kísérletben. A spermát 1:1 arányban hígítottam a következő összetételű hűtőmediummal: 350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8,0 (ccHCl-el beállítva), 10%-os végső koncentrációjú metanol. A hígított ivarterméket 0,5 ml-es szalmákba töltöttem. A mélyhűtés és a felolvasztás folyamata megegyezett az előző fejezetben ismertetett módszerrel. A spermát 1 hétig tároltam folyékony nitrogénnel töltött kaniszeres kannában. A felolvasztást követően szintén megvizsgáltam a minták motilitását.

A lefejt ikrát 3 ismétlésben 10 és 30 g-ra, míg 1 ismétlésben 50 g-os adagokra osztottam. Egy adag ikrát 1 műszalma tartalmával termékenyítettem. Kontrollként frissen fejt spermát használtam. Az egyes tételeket külön 7 l-es Zuger-üvegekbe öntöttem inkubáció céljából. A kelést követően a kelési arányt leszámláltam.

2.2.4. Alkalmazott statisztikai módszerek

A vizsgálatok eredményeit Graphpad Prism 4.0 for Windows programmal értékeltem ki. A védőanyagok és a hígítók motilitásra és a termékenyülésre kifejtett hatását, illetve a hígítási arány és a védőanyagok kelési arányra kifejtett hatását kétszemponos varianciaanalízis segítségével vizsgáltam (ANOVA) (2.2.1-es fejezet). A kősüllőn végzett vizsgálat esetében a mélyhűtött és kontroll sperma kelésre kifejtett hatását egyszemponos varianciaanalízissel vizsgáltam, amihez Tukey-próbát használtam utótesztként.

A második kísérlet során (2.2.3-as fejezet) kapott eredményeket, azaz a motilitás (felolvasztott és friss sperma) és a kelési eredményeket (10 és 30 g-os ikratétel esetében) 2 mintás t-próba ($P \leq 0,05$) segítségével értékeltem.

2.3. A CASA rendszer tesztelése

A CASA rendszer egy trinokuláris optikai fáziskontraszt mikroszkópból (Nikon Eclipse E600; Nikon; Tokió, Japán) állt, melyhez egy Basler 312fc/c digitális kamera (Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Németország) kapcsolódott. A kamerát IEEE 1394 interfész és egy kábel segítségével számítógéphez kapcsoltam. A képeket az Integrated System for Semen Analysis (ISAS) szoftver segítségével rögzítettem és analizáltam (Proiser; Valencia, Spanyolország). A felvételekhez 10×-es negatív fáziskontraszt objektívet használtam (köztes nagyítás nélkül). A spermát a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett Makler-féle sejtszámláló kamrában aktiváltam. A motilitást, illetve a mozgás sebességének 3 paraméterét (VCL, VSL, VAP) az aktivációt követő 15, 30, 60 másodpercben mértem. Ezeket az időpontokat korábban határoztam meg annak érdekében, hogy fenntartsam a mintavételek közötti ismétlés lehetőségét (a minta aktiválása után a Makler kamrákat egy speciális takarólemezzel kell lefedni majd az objektív alá helyezni, és többnyire szükség van a fókusz és az elhelyezkedés korrigálására is). A képsorozatot elmentettem és később analizáltam. A CASA szoftver beállításait a halak ondósejtjeinek vizsgálatához igazítottam a következők szerint: 30 begyűjtött kép/s, 1 másodperces vizsgálati idő ($VCL \geq 10 \mu\text{m/s}$ esetén tekintik a spermiumot mozgónak), 10-80 μm^2 -ben határoztam meg a fej területét.

3. AZ EREDMÉNYEK

3.1. A harcsa fajban végzett kísérletek eredményei

3.1.1. A hűtési időre és a sperma-ikra arányra vonatkozó kísérletek eredményei

A tukai telepről származó hímivarú halak GSI-értéke $2,00 \pm 0,04\%$ volt. A mélyhűtött sperma kiindulási motilitása 90% volt, míg a felolvasztás utáni motilitás értéke 0% volt a 3 perces hűtés, 40% az 5 perces hűtés és 60% a 7 perces hűtés esetén. A szegedi halak spermájának felolvasztás utáni motilitása egyöntetűen 80% volt.

A Szajolban folytatott termékenyítési kísérletek során a legmagasabb kelési arányt ($51 \pm 1\%$) 7 perces hűtési időnél és 40 g ikra termékenyítésekor kaptam, azonban meg kell jegyezni, hogy az 5 perces és 7 perces hűtési idő esetében mindhárom termékenyített ikratétel esetében igen kiegyenlített kelési eredményeket kaptam ($40 \pm 0\%$ és $51 \pm 1\%$ között). A statisztikai értékelést követően megállapítottam, hogy csak a hűtési időnek volt szignifikáns hatása ($P < 0,0001$) a kapott eredményekre, tekintettel arra, hogy a 3 perces hűtési idő mellett gyengébb kelési százalékot kaptam.

Az Attalán folytatott vizsgálatok során az egy műszalma mélyhűtött spermával termékenyített ikratétel kelési eredménye 94%, a két műszalmával termékenyítetté 77% lett, míg a két kezelés kontroll csoportjában 89%, illetve 81% kelést regisztráltam. Érdeemes megjegyezni, hogy az egy műszalmányi felolvasztott spermával termékenyített csoportban a torz fejlődésű lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest mindössze 2,4% volt (1,8% a kontrollban), míg a két műszalmányi spermával termékenyített csoportban 11,2% (kontroll: 7,3%).

Az 5 ml-es műszalmákkal kapott hűtési sebesség $-23^\circ\text{C}/\text{perc}$ körül alakult. Megfigyeltem, hogy a műszalma hőmérséklete 3 perces hűtés után még csak -45°C , míg 5 perces hűtésnél -104°C volt.

3.1.2. A szaporítási szezonon kívül gyűjtött harcsasperma mélyhűthetőségének és felhasználásának eredményei

A körömi vizsgálatok során a kioperált herék súlya átlagosan 20,4 g, a halak átlagsúlya pedig 2,52 kg volt, így a GSI-értékük egy eset kivételével nem érte el az 1%-ot, ami igen alacsony érték, ez azonban nem befolyásolta hátrányosan a sperma

minőségét. A januári és márciusi GSI értékek között statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam ($P=0,4589$). Az egyes spermaminták kiindulási motilitása 50 és 90% között mozgott. A hűtésre kiválogatott minták közül kettőt kizártam a további vizsgálatokból, mert a sperma motilitása gyengébb (50–60%) volt, a sejtek valószínűleg a kipréseles során sérültek meg. A minták közül 5 nappal a hűtés után felolvasztottam egyet-egyét és a motilitásuk 50% körül alakult.

A termékenyítési kísérletekhez a 2005. évből Szegedről és a 2006. év körömi hűtésből származó mintákat használtam fel. A kelési eredmények egységesen 70–80% körül alakultak egy kivétellel, amikor 20%-os kelést tapasztaltam. A gazdaság vezetőjének szóbeli közlése szerint a 20%-os mintához tartozó kontroll termékenyülés is hasonlóan gyenge volt, így ez az eredmény az ikra rossz minőségének tudható be. Meg kell jegyezni, hogy a Körömről származó (tehát szaporítási szezonon kívül gyűjtött) spermával kapott kelési eredmények semmiben sem maradtak el a szegedi mintákkal kapott keléstől.

3.1.3. A mélyhűtött harcasperma alkalmazásának eredményei keltetőházi/üzemi körülmények között

A különböző keltetési kísérletek eredményei az alkalmazott szaporítási eljárástól és az ikra minőségétől függték. Az attalai kísérletben a mélyhűtött spermával végzett termékenyítés során a termékenyülés $97\pm 1\%$ volt, míg a kontroll termékenyülés $93\pm 1\%$. A két eredmény között statisztikailag szignifikáns különbséget mutattam ki ($P=0,0084$). A lárvák kelési aránya ugyanebben a kísérletben $95\pm 2\%$ volt a mélyhűtött spermával termékenyített ikraadagok esetében, míg a kontroll csoportban $94\pm 6\%$. A kelési eredmények között már nem találtam statisztikailag igazolható különbséget.

A körömi kísérletben a mélyhűtött spermából származó lárvák kelése $84\pm 5\%$ volt, míg a kontroll csoporté $69\pm 16\%$. Az eredmények között statisztikailag igazolható különbséget nem mutattam ki. A százhalombattai kísérletekben a mélyhűtött spermával végzett termékenyítésből származó lárvák kelési aránya $50\pm 3\%$ volt, míg ugyanebben a kísérletben a kontroll kelés $50\pm 6\%$ volt. Az eredmények között itt sem találtam statisztikailag szignifikáns különbséget. Az Aranykárász Bt. ördögösi keltetőjében végzett kísérletben a mélyhűtött spermából származó lárvák kelése $57\pm 22\%$ körül

alakult, míg a kontroll csoporté $22\pm 18\%$ volt. Ebben az esetben statisztikailag szignifikáns különbséget ($P=0,05$) találtam a mélyhűtött csoport javára. A szegedi kísérletben a lárvák kelési aránya a mélyhűtött spermából származó csoportban $75\pm 3\%$ volt, míg a kontrollban $83\pm 1\%$ és ebben az esetben a kontroll csoport javára kaptam statisztikailag szignifikáns különbséget ($P=0,0249$).

3.1.4. Lárva megmaradási kísérletek eredményei

A táplálkozó lárvaszakasz során statisztikailag szignifikáns különbséget kaptam labor körülmények között a lárvák 10 napos testhossza tekintetében ($P=0,034$), vagyis a mélyhűtött spermából származó lárvák hosszabbak voltak. A nem táplálkozó lárvaszakasz során szignifikáns különbséget találtam a végső testhossz ($P<0,001$) és a végső testtömeg ($P=0,018$) esetében a mélyhűtésből származó csoport javára. Egyik vizsgálatban sem lehetett különbséget kimutatni a mélyhűtött és a friss spermából származó lárvák megmaradási eredményei között.

3.2. A süllő és a kősüllő fajban végzett kísérletek eredményei

3.2.1. A süllő sperma-mélyhűthetőség vizsgálatának eredményei

Első kísérlet

Minden igyekezet ellenére sem tudtam elkerülni, hogy fejés közben a sperma ne keveredjen vizelettel, így a frissen fejt süllő sperma motilitása $50\pm 17\%$ volt. A mélyhűtött minták közül a legmagasabb felolvasztás utáni motilitás $28\pm 21\%$ volt, glükóz hígító és DMSO védőanyag használata mellett, azonban statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam az egyes kezelések között.

A Bürker-kamrás számolással a süllő sperma sűrűsége a következőképpen alakult (spermium/ml): 1. egyed: $0,9375\times 10^{10}$, 2. egyed: $1,01\times 10^{10}$, 3. egyed: $0,7037\times 10^{10}$, 4. egyed: $0,66875\times 10^{10}$, átlag és szórás: $0,83\pm 0,17\times 10^{10}$.

A termékenyítési kísérletekben a legmagasabb termékenyülést ($43\pm 12\%$) szintén glükóz hígító és DMSO védőanyag kombinációjával értem el. Az adatok statisztikai elemzése során megállapítottam, hogy a hígító nem, de az alkalmazott védőanyag szignifikáns ($P=0,0338$) hatással volt a termékenyülési százalékra.

Második kísérlet

A kísérletek során az egyes hímivarú süllő egyedektől lefejt sperma mennyisége igen csekély volt (kevesebb, mint 1 ml). A vizsgálatok során a friss süllősperma motilitása $45\pm 30\%$ volt. Az előző kísérlethez hasonlóan itt sem tudtam elkerülni a sperma vizelettel történő szennyeződését. A felolvasztott süllősperma motilitása igen alacsonynak mondható ($0\text{--}2\%$) a DMSO védőanyag jelenlétében hűtött mintákban, míg a metanol védőanyaggal hűtött süllősperma motilitása a hígítási aránytól függetlenül 40% volt. A legmagasabb kelési arányt ($41\pm 22\%$) metanol védőanyag használata és $1:1$ hígítási arány mellett kaptam, azonban az eredmények statisztikai elemzése nem mutatott ki szignifikáns különbséget a kelési eredmények között.

3.2.2. A kősüllő sperma-mélyhűthetőségi vizsgálatának eredményei

A friss kősüllő sperma motilitása $60\pm 20\%$ ($n=5$), míg a hűtött és felolvasztott sperma motilitása $30\pm 10\%$ ($n=3$) volt. Ebben az esetben sem tudtam elkerülni a sperma vizelettel történő keveredését. Nem találtam szignifikáns különbséget a mélyhűtött, majd felolvasztott és a friss sperma kelési eredményeiben, kivéve az 1. számú hím esetében ($P=0,031$). A legmagasabb kelési arányt ($60\pm 2\%$) a 4-5 hímek kevert spermája eredményezte. A kontroll érték $60\pm 6\%$ volt.

3.2.3. A mélyhűtött süllősperma keltetőházi felhasználásának előkísérleti eredményei

A katéteres spermavétel eredményeként a frissen fejt süllősperma motilitása $63\pm 10\%$ lett. A spermakoncentráció a kísérletben $1,8571\pm 0,1538 \times 10^{10}$, míg az 1 g-ban található ikraszemek száma 1367 ± 54 volt, így az egy ikraszemre jutó spermiumok száma a 10 g-os ikratétel esetében $3,396 \times 10^5$, a 30 g-os ikratételek esetében $1,132 \times 10^5$, míg az 50 g-os ikratétel esetében $6,792 \times 10^4$ körül alakult. A felolvasztás utáni motilitás esetében $53\pm 5\%$ volt, így a frissen fejt és a felolvasztott minták motilitás értékei között szignifikáns különbség nem volt ($P=0,1135$).

Amikor 10 g ikrát termékenyítettem 1 műszalmányi mélyhűtött spermával a kikelt lárvák aránya $47\pm 4\%$ volt, míg 30 g ikra termékenyítésekor $55\pm 3\%$. A két eredmény között ugyan nem találtam statisztikailag szignifikáns eltérést, azonban a t-próba eredménye ($P=0,05701$) nagyon közel áll a szignifikancia-szinthez. Meglepő

módon, amikor 50 g ikrát termékenyítettem egy műszalmányi felolvasztott spermával 87%-os kelést tapasztaltam, igaz ebben az esetben ismétlés nem volt.

3.3. A CASA rendszerrel mért eredmények

3.3.1. A CASA rendszerrel elemzett harcsasperma eredményei

Az egyes mintákban 947 és 2388 db spermium közötti darabszámot vizsgált a rendszer a harcsasperma elemzés során, ami átlagban 1462 db spermiumnak felel meg. Az aktivációt követő 15. másodperben minden esetben 59% feletti motilitás értékeket kaptam, míg az idő előrehaladtával a motilitás és sebesség értékek folyamatosan csökkentek minden minta esetében.

3.3.2. A CASA rendszerrel elemzett süllősperma eredményei

Süllő esetében a vizsgált spermiumok darabszáma 1230 és 2791 között alakult, míg az átlagosan vizsgált darabszám 1747 volt. Ebben az esetben is elmondható, hogy egységesen a 15. másodperben kaptam a legmagasabb motilitás és sebesség értékeket, és a csökkenő tendencia az idő múlásával ismét felfedezhető.

3.4. Új tudományos eredmények

- Kidolgoztam egy a gyakorlatban is alkalmazható harcsasperma-mélyhűtési módszert. A nagy mennyiségben (5 ml) hűtött, majd felolvasztott spermával biztonságosan termékenyíthető 150-300 g ikrá. A termékenyülési és kelési eredmények megegyeznek a gyakorlatban használatos rutin módszer eredményeivel.
- Szürkeharcsa esetében először vizsgáltam a mélyhűtött és a friss spermával termékenyített ikrából származó ivadékok megmaradásának és növekedésének paramétereit. Ez alapján kijelenthető, hogy az általam kidolgozott mélyhűtési módszerrel előállított ivadékok megmaradása minden esetben eléri, esetenként még meg is haladja a kontroll egyedek növekedését, mely tovább erősíti a kidolgozott módszer gyakorlati felhasználhatóságát.
- A világon először mélyhűtöttem süllő spermát sikeresen, amelyet keltetőházi körülmények között is teszteltem.
- A világon először mélyhűtöttem kősüllő spermát sikeresen.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. A harcsa fajon végzett kísérletekből levonható következtetések

4.1.1. A hűtési időre és a sperma-ikra arányra vonatkozó kísérletekből levonható következtetések

Az 5 ml-es műszalmában mért hűtési paraméterek alapján elmondható, hogy 3 perces hűtést követően nem elég alacsony a hőmérséklet (-45°C) a sejtek sérülésmentes fagyasztáshoz, ezért szükséges hosszabb hűtési időt alkalmazni. Az általam használt 7 perces hűtési idő azonban már megfelelő az 5 ml-es műszalmák használatához.

Üzemi mennyiségű ikratételek biztonságosan termékenyíthetők 1 db 5 ml-es műszalma segítségével. Kísérleteim során kiderült, hogy az egy műszalmában található 2 ml sperma elegendő spermiumot tartalmazott 120 g ikra termékenyítésére is, így munkám során tovább növelhettem az egy műszalmával termékenyíthető ikra mennyiségét.

A felolvasztást követően nem tapasztaltam a sperma minőségében jelentős romlást a kísérletek során. Ennek egyik oka, hogy meghatároztam azt a hűtési időt, mely a legjobb termékenyülési arányt eredményezte. Vagyis a mélyhűtött sperma nem rontja a kelési arányt a hagyományos, gyakorlatban használatos módszerhez képest.

4.1.2. A szaporítási szezonon kívül gyűjtött harcsasperma vizsgálatából és felhasználásából levonható következtetések

A vizsgálataim során tett megfigyelések alapján kijelenthető, hogy a szaporítási szezonon kívül gyűjtött harcsasperma ugyanúgy alkalmas a mélyhűtésre, valamint az üzemi szaporítás során történő felhasználásra, mint a szaporítási szezonban gyűjtött hím ivartermék.

4.1.3. A mélyhűtött harcsasperma üzemi felhasználásából levonható következtetések

Nagy mennyiségű sperma sikeres hűtését és felolvasztását követően a következő fontos lépés az üzemi technológia kialakításánál, hogy a felolvasztott spermával nagy mennyiségű ikrát tudjunk biztonságosan termékenyíteni. Kísérleteimben 150-350 g közötti ikratételeket termékenyítettem 1 műszalma tartalmával. Irodalmi adatok szerint

100-200 g ikra keltethető biztonsággal egy 7 l-es Zuger-üvegben (SZABÓ 2000). Minden esetben (1 kivételével) a kontrollal megegyező kelési eredményeket kaptam, mely bizonyítja, hogy nem értem el azt a sperma-ikra arányt, ami már kimutatható csökkenést okoz a termékenyülésben.

A vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a kifejlesztett módszer nagy biztonsággal alkalmazható a keltetőházi harcsaszaporítás során.

4.1.4. A lárvanevelési kísérletekből levonható következtetések

A mélyhűtési módszer kifejlesztését követően egy, a gyakorlati szakemberek felől érkező felvetést kellett körüljárni, konkrétan azt, hogy a mélyhűtésből származó lárvák megmaradása és növekedése eléri-e a friss spermából származó lárvák eredményeit. Vizsgálataimat kiterjesztettem mind a táplálkozó, mind a nem táplálkozó lárvaszakaszokra, ahol mindkét esetben azt kaptam, hogy megmaradás tekintetében nincs különbség a kontroll és a mélyhűtésből származó lárvák között. Sőt nem táplálkozó lárvaszakasz esetében a mélyhűtésből származó lárvák növekedése, illetve táplálkozó lárva szakaszban a mélyhűtésből származó lárvák testhossza meghaladta a kontroll lárvák paramétereit.

A vizsgálatokat követően elmondható, hogy a mélyhűtésből származó lárva megmaradása semmivel sem rosszabb, növekedése pedig esetenként jobb értékeket mutatott a friss spermából származó lárva eredményeinél.

4.2. A süllő és a kősüllő fajon végzett kísérletekből levonható következtetések

4.2.1. A süllő és a kősüllő spermamélyhűtéséből levonható következtetések

Süllő esetében a mélyhűtési technika kialakítása során a DMSO védőanyag jobb termékenyülést eredményezett a metanolnál, azonban a keltetőházi kísérletben ezzel ellentétes eredményt kaptam. A szakirodalom mindkét védőanyag sikeres használatára tesz utalást különböző halfajok esetében. Számomra a keltetőházi felhasználás a cél, így összességében az eredményekből arra következtettem, hogy a metanol-glükóz kombináció, 1:1 arányban hígítva a spermával alkalmasnak tűnik a süllősperma mélyhűtésére.

Kőszülő esetében azt találtam, hogy a glükóz hígító és a metanol védőanyag, 1:1 arányban hígítva a spermával szintén alkalmas lehet a halfaj spermamélyhűtésére.

A kezdeti kísérletek során a felolvasztást követő motilitás eredmények és a kelési eredmények igen nagy mértékű szórást mutattak, mely problémát a sperma vizelettel történő keveredésének tulajdonítottam. Ennek kiküszöbölésére a fejést katéter segítségével végeztem. Ebben az esetben a spermát a hal heréjéből közvetlenül egy vékony gumicsövön keresztül fejhetjük, meggátolva a sperma vizelettel vagy bélsárral történő keveredését. A katéter használatával egy évvel később már sokkal jobb eredményeket értem el.

4.2.2. A mélyhűtött süllősperma keltetőházi alkalmazásának előkísérleteiből levonható következtetések

A keltetőházi kísérletek során azt tapasztaltam, hogy az 1 db 0,5 ml-es műszalmával termékenyített ikraadagok növelésével javult a kelési százalék. Megfigyeléseim szerint a különböző ikraadagok eltérő módon viselkedtek a Zuger-üvegben. A 10 g-os ikratételek enyhén összeragadtak egy csomóba, míg a 30 g-os adagok több kisebb csomóba rendeződtek, végül az 50 g-os adagban az ikraszemek szabadon görgögték egymáson. Annak ellenére, hogy 50 g-os tételből nem volt ismétlés, az eredmény azt sugallja, hogy a nagyobb adagok alkalmazása jobb kelési eredményeket eredményez.

A 10 g-os ikratételekben az összeragadt ikracsomó közepében lévő ikraszemek feltételezhetően érzékenyebbnek bizonyultak az esetlegesen előforduló oxigénhiányra, mint a nagyobb mennyiségű tételekben a lazább ikratömegek.

Ezek az eredmények azonban utalhatnak arra is, hogy a metanol a kisebb ikratételeknél relatíve nagyobb koncentrációban volt jelen, így toxikus hatása erőteljesebben hatott, mint a nagyobb ikratételek esetében. Az alacsonyabb sperma-ikra arány a nagyobb ikratételeknél láthatóan nem befolyásolta az eredményeket, ami arra utal, hogy a sperma mennyisége feleslegben volt a kisebb ikratételeknél.

4.3. A CASA rendszer teszteléséből levonható következtetések

Az általam kifejlesztett harcasperma mélyhűtési módszer során magas motilitás értékeket kaptam a felolvasztást követően, emellett a termékenyítési és kelési

eredmények is magasak voltak. A számítógépes módszerrel (CASA) vizsgált minták szintén magas motilitás eredményei a mélyhűtési módszer sikerességét támasztják alá.

A harcra és a süllő spermájának motilitás vizsgálata sikeresen elvégezhető a CASA rendszer segítségével, mely a jövőben megkönnyítheti a mélyhűtésre alkalmas minták vizsgálatát és kiválasztását.

4.4. Javaslatok

4.4.1. Javaslatok a harcasperma-mélyhűtés témakörében

- Javaslom a lárva megmaradási kísérletek folytatását hosszabb életkor eléréséig, de már tavi körülmények között.
- Javaslom megvizsgálni különböző eljárások segítségével, hogy a mélyhűtésből származó lárvák az egyes esetekben miért eredményeznek jobb növekedést.
- Javaslom a CASA technológia motilitás eredményeinek összevetését termékenyítési próbákkal, továbbá javaslom a CASA technológiát beépíteni a mélyhűtési eljárásba.
- Javaslom hosszútávon egy populációgenetikai vizsgálatokkal alátámasztott, a megfelelő genetikai variabilitás megőrzését célzó mélyhűtött génbank létrehozását.

A mélyhűtött harcasperma technológiája készen áll a gyakorlati bevezetésre. Ennek üzleti alapon történő felhasználásához a következő javaslatokat tenném:

- Javaslom az erőteljesebb marketing eszközök felhasználását, illetve gyakorlati bemutatók rendezését a keltetőházi szakemberek számára.
- Javaslom hosszútávon egy kereskedelmi alapon működő spermabank létrehozását a Halgazdálkodási Tanszéken.

4.4.2. Javaslatok a süllőspérma-mélyhűtés témakörében

- Süllő fajon javaslom a 4, illetve 5 ml-es műszalmák laboratóriumi és keltetőházi tesztelését.
- Javaslom a sperma-ikra arány további vizsgálatát.
- Kősüllő fajon javaslom a süllőn elvégzett kísérletek kivitelezését.
- Javaslom a két faj spermájának CASA technológiával történő vizsgálatát a jövőben elvégzendő termékenyítési kísérleteket megelőzően.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

5.1. Tudományos közlemények folyóiratban

BOKOR, Z., HORVÁTH, Á., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B. (2008): Cryopreservation of Pike Perch sperm in hatchery conditions. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 60 (3), 168-171. p.

BOKOR, Z., MÜLLER, T., BERCSÉNYI, M., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2007): Cryopreservation of sperm of two European percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga perch (*S. volgensis*). *Acta Biologica Hungarica* 58 (2), 199-207. p.

5.2. Idegen nyelvű könyvrészlet

URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á., BOKOR, Z. (2008): Artificial fertilization in aquaculture species: from normal practice to chromosome manipulation. In: Cabrita E., Robles V., Herráez P. (eds) *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*, CRC Press, New York, 183-216. p.

5.3. Magyar nyelvű könyvrészlet

BOKOR, Z. (2007): A harcsa fejezet egyes alfejezetei, In.: Horváth, L., Csorbai, B., Urbányi, B., (Szerk.): *A tájidegen gyomhalak visszaszorítása őshonos ragadozó halfajokkal*, Prime Rate Kft., Budapest

5.4. Konferencia kiadványban megjelent publikációk

BOKOR, Z., URBÁNYI, B., HORVÁTH, L., HORVÁTH, Á. (2008): Studies on the cryopreservation of pike-perch (*Sander lucioperca*) sperm. Short Communications, Resource Management, *Aquaculture Europe 2008*, Krakko, 100-101.

BOKOR, Z., MOSONYI, G., ITTZÉS, I., MÜLLER, T., HORVÁTH, L., HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B. (2008): Experiments on the viability of European catfish (*Silurus glanis* L.) larvae originated from native and cryopreserved sperm in laboratory and hatchery conditions, 32nd Annual Larval Fish Conference, Kiel, 122 p.

BOKOR, Z., HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B. (2006): A harcsa hímivartermék minőségének vizsgálata, különös tekintettel a mélyhűthetőség és gyakorlati alkalmazás eredményességére, XXX.. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, Szarvas, 2006. május 24-25. Összefoglaló, 48 o.

BOKOR, Z., URBÁNYI, B., RADICS, F., FICSURA, A., CSERNÁK, R., OPITZER, Z., HORVÁTH, Á. (2006): Cryopreservation of sperm of some european predator fish species, *World Aquaculture 2006*, Book of Abstracts 96 p.

HORVÁTH, Á., **BOKOR Z.,** RADICS, F., CSOMA, G., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B. (2006): Cryopreservation of wels catfish *Silurus glanis* sperm in 4 ml straws, *Aquaculture Mercia 2006*, Book of Abstracts 138. p.



Születési hely, idő: Dunaujváros, 1982. 05. 31. E-mail: Bokor.Zoltan@mkk.szie.hu

Tanulmányok

- 2005-2008 PhD:** **Szent István Egyetem, Gödöllő**
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
- 2000-2005 Diploma:** **Szent István Egyetem, Gödöllő**
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Agrármérnök, Hal- és Vadgazdálkodási Szakirány,
Mezőgazdasági szaktanácsadó Szakirány
- 1992-2000 Érettségi:** **Széchenyi István Gimnázium, Dunaujváros** biológia-
kémia fakultáció
-

Tudományos munka, Eredmények

- 2005 **OTDK, Szarvas, Alkalmazott állattenyésztés szekció, Különdíj**
- 2004 **SZIE, ETDK, Tanszéki különdíj**
- 2004 **SZIE, Köztársasági Ösztöndíj**
- 2003 **SZIE, Köztársasági Ösztöndíj**
- 2003 **SZIE, ETDK I. helyezés**
- 2002 **SZIE, Köztársasági Ösztöndíj**
-

Nyelvismeret

- | | |
|-----------------------|-------|
| Német | alap |
| Angol | közép |
| Angol/ICC/ nemzetközi | közép |
-

Számítógépes ismeretek

Windows XP, Office alkalmazások, Adobe Photoshop, honlapkészítési ismeretek,

Egyéb

- 1999 „B” kategóriás jogosítvány
- 2003 Horgászvízkezelő-tógazda vizsga, Állami vadászvizsga, Lövizsga Bizonyítvány
- 2001-2004 Gödöllői Vidékfejlesztési Szakkollégium tagság
- 2002-2004 Egyetemi Kollégiumi Tanács tagság
- 2003-2004 Halgazdálkodási Tanszéken demonstrátori beosztás
- 2004-2005 Halgazdálkodási Tanszéken demonstrátori beosztás
- 2006-2007 Projektmenedzsment, Vezetői felkészülés, Pályázatírás tanfolyamok
- 2006-2008 MK Kari PR csapat tagja
- 2007-2008 Szenátusi tagság, Egyetemi Tanács, SZIE
- 2006- Kollégiumi nevelőtanár