

HALÁSZAT – TUDOMÁNY

2. évfolyam | 2.szám | 2016

Hungarian Journal of
Aquaculture
and Fisheries

Alapítva: 2015



► Pataki márnák
a Kárpát-medencében
és környékén

3. oldal

► Vizsgálatok a balatoni süllő
parazitás fertőzöttségére
vonatkozóan

6. oldal

► A *Daphnia magna* szerepe a ponty
Dactylogyrus férges elleni védeke-
zésben

12. oldal

HALÁSZAT – TUDOMÁNY

2. évfolyam | 2.szám | 2016

Földművelésügyi Minisztérium tudományos folyóirata

A HALÁSZAT lap szerkesztőbizottsága

Főszerkesztő:
Dr. Váradi László

Főszerkesztő-helyettes
Dr. Bercsényi Miklós

Szerkesztő:
Bozánne Békefi Emese

A szerkesztőbizottság tagjai:

Dr. Bíró Péter
Dr. Hancz Csaba
Dr. Harka Ákos
Hoitsy György
Dr. Jeney Zsigmond
Dr. Mezőszentgyörgyi Dávid
Dr. Molnár Kálmán
Dr. Németh István
Dr. Orbán László
Dr. Szathmári László
Dr. Székely Csaba
Dr. Szűcs István
Udvari Zsolt
Dr. Urbányi Béla

A folyóirat megjelenését támogatja:
Magyar Akvakultúra Szövetség

Kiadja:
Herman Ottó Intézet
1223 Budapest, Park u. 2.
www.hoi.hu

Felelős kiadó:
Dr. MEZŐSZENTGYÖRGYI DÁVID

HALÁSZAT-TUDOMÁNY
Megjelenik félévenként

Szerkesztőség:
Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs
Központ
Halászlati Kutatóintézet
5540 Szarvas Anna-liget 8.
Telefon: 06 66 515 300
E-mail: info@haki.hu

További információ: 06-1/362-8137,
06-1/362-8114
E-mail: info@agrarpapok.hu

Címlapkép: Tejes és ikrás sebes pisztráng egyedek a lillafüredi pisztrángtelepen

Fotó: Hoitsy György

Tisztelt Olvasó!

A Halászat Tudomány e számában megjelenő négy tudományos közlemény az akvakultúra fejlesztés olyan klasszikus témáit érinti, mint a szaporodásbiológia, a takarmányozás, illetve a halegészségügy. Figyelemre méltó azonban, hogy az egyes specifikus kutatási programok olyan gyakorlati problémák megoldására irányulnak, mint a halliszt kiváltása a pontytápokból, a süllő és sügér intenzív termelése során a betegségek megelőzése, az állománylétszám és ivararány mielőbbi kialakítása pisztrángtermelési programokban, illetve pontysperma mélyhűtés módszertanának tovább fejlesztése a gyakorlati alkalmazhatóság figyelembe vételével. Öröndetes, hogy a kutatási programok végrehajtása haltermelési vállalkozások bevonásával történt. A NAIK HAKI vállalkozói partnere a szarvasi Aranykárász Bt. volt, a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszéke a Hoitsy és Rieger Kft.-vel együttműködve végezte a kutatómunkát. A négy közlemény keretében ismertetett kutatási programra a gyakorlat orientáltság mellett jellemző a nemzetközi együttműködés, illetve az akvakultúra nemzetközi eredményeinek és tapasztalatainak figyelembe vétele, hiszen a kutatás alapvető célja a hazai halgazdálkodás versenyképességének növelése. A szarvasi NAIK HAKI egy EU FP7 támogatással megvalósuló ARRANA nevű projekt keretében végzett kutatás eredményeiről számolt be. A gödöllői SZIE Halgazdálkodási Tanszékének kutatómunkájának magyar-lengyel együttműködési eleme is van. Az MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Állatorvos-tudományi Intézetének munkatársai európai és észak-amerikai eredményeket és tapasztalatokat ismertet.

Az év végén a szerkesztőbizottság nevében megköszönöm a Tisztelt Olvasóknak a Halászat Tudomány elektronikusan megjelentetett szaklap iránti érdeklődést, és boldog karácsonyt, békés és sikeres Új Évet kívánok!

Dr. Váradi László
főszerkesztő

A TARTALOMBÓL

Halliszt, valamint növényi alapú összetett takarmányok összehasonlítása ponty monokultúrában egy hároméves kísérleti időszak alatt
(J. Sándor Zsuzsanna, Adorján Ágnes, Percze Vanda, Révész Norbert, Ardó László, Dankó István, Rónyai András, Csengeri István) 3

Irodalmi áttekintés a süllő és sügér esetében előforduló vírusos és baktériumok okozta betegségekről
(Borzák Réka, Selleyi Boglárka) 9

Az ivararányok fenotípusos és molekuláris genetikai vizsgálata hazai sebespisztráng-állományokban
(Ősz Ágnes, Horváth Ákos, Hoitsy György, Keszte Szilvia, Sáfrány Anna Júlia, Balogh Erna, Guti Csaba, Nagy Bálint, Lefler Kinga Katalin, Urbányi Béla, Kovács Balázs) 13

A pontysperma mélyhűtés módszertani fejlesztése
Bernáth Gergely, Daniel Zarski, Kása Eszter, Staszny Ádám, Várkonyi Levente, Kollár Tímea, Hegyi Árpád, Bokor Zoltán, Urbányi Béla, Horváth Ákos 18

FROM THE CONTENTS

Comparison of plant based linseed oil supplemented diet with marine based diet used as supplementary feed in carp pond monoculture
(Zsuzsanna J. Sándor, Ágnes Adorján, Vanda Percze, Norbert Révész, László Ardó, István Dankó, András Rónyai, István Csengeri) 3

Review of significant bacterial and viral infections of perch and pike-perch
(Réka Borzák, Boglárka Selleyi) 9

Analysis of gender proportion in Hungarian brown trout populations based on phenotypic and molecular markers
(Ágnes Ősz, Ákos Horváth, György Hoitsy, Szilvia Keszte, Anna Júlia Sáfrány, Erna Balogh, Csaba Guti, Bálint Nagy, Kinga Katalin Lefler, Béla Urbányi, Balázs Kovács) 13

Improvement of common carp (Cyprinus carpio) sperm cryopreservation
Gergely Bernáth, Daniel Zarski, Eszter Kása, Ádám Staszny, Levente Várkonyi, Tímea Kollár, Árpád Hegyi, Zoltán Bokor, Béla Urbányi, Ákos Horváth. 18

Különböző fehérjeforrásokat tartalmazó tápok összehasonlítása ponty monokultúrában egy hároméves kísérleti időszak alatt

J. Sándor Zsuzsanna¹, Adorján Ágnes¹, Percze Vanda¹, Révész Norbert¹, Dankó István², Rónyai András¹, Csengeri István¹

¹Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Halászati Kutatóintézet, Szarvas

²Aranykárász Bt., Szarvas

ÖSSZEFOGLALÁS

Az EU FP7 támogatással megvalósuló ARRAINA projekt fő célkitűzése a növényi alapú összetett takarmányok hosszú távú hatásának vizsgálata tavi, monokultúras pontynevelésben a teljes hal életciklus során. Az anyák takarmányozására, majd szaporítás után az utódok nevelésében használtuk azt a tavi nevelés kiegészítő takarmányozására tervezett formulált tápot, amelynek összetevői a búza, kukorica, szója és lenolaj voltak. Kontrollként mérsékelt halliszt- és halolaj tartalmú tápot használtunk. A tenyésztési időszakok során vizsgáltuk a termelési mutatókat (növekedést, megmaradást, takarmányhasznosítást), a beltartalmi tulajdonságokat, valamint áruhal esetében a kihozatali mutatókat és az esszenciális zsírsavtartalmat. A hároméves kísérletsorozat lehetővé tette a teletetés hatásának vizsgálatát is az állomány kondíciójára és testösszetételére. Eredményeink azt mutatják, a növényi fehérje- és olaj alapú összetett haltakarmány etetése nem rontotta a növekedési mutatókat, és a takarmányhasznosítás sem maradt el a halliszt alapú takarmány alkalmazása során kapott értékektől. A halak egészségi állapotára nézve sem tapasztaltunk negatív hatást. Megállapítottuk, hogy a lenolajban nagy mennyiségben jelenlevő linolénsavat a ponty – már ivadék korától – képes mérsékelt módon magasabb homológgá átalakítani. Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy a teljes életciklus során ez a folyamat nem fokozódik, az EPA és DHA hosszú szénláncú többszörösen telített zsírsavak koncentrációja a halhúsban a súlygyarapodással párhuzamosan nem növekszik.

SUMMARY

COMPARISON OF PLANT BASED LINSEED OIL SUPPLEMENTED DIET WITH MARINE BASED DIET USED AS SUPPLEMENTARY FEED IN CARP POND MONOCULTURE

Zsuzsanna J. Sándor, Ágnes Adorján, Vanda Percze, Norbert Révész, István Dankó, András Rónyai, István Csengeri

The ARRAINA project supported by EU FP7 funding was dedicated to investigate the long term effect of plant

based supplementary feed in common carp monoculture during the whole life cycle. For this purpose, two semi-intensive supplementary feeds were formulated and used during three rearing season in ponds with intensive natural food production. During the trial production parameters, growth and composition of the fish have been determined. There were not significant differences in the production performance (survival, growth, feed conversion) parameters. When the fish reached the market size filleting yield and nutritional value of the filets were assessed. The data has not revealed any negative effect to the production parameters and health of the fish due to applied feed. Contrary to this there were significant differences in the total fat and LC-PUFA content of the filets between the treatments. The high source of linolenic acid (18:3n-3) in the linseed oil supplemented diet did not increase significantly the EPA and DHA level in the muscle. This reflects the limited capacity of the carp for bio-synthesis of the long chain essential fatty acids from their precursors.

BEVEZETÉS

Az összetett takarmányok meghatározó alkotórésze a jellemzően tengeri fogásokból származó halliszt és halolaj, melyek korlátozott elérhetősége és drágulása miatt terjedőben van az alternatív fehérje- és olajforrások alkalmazása. A közelmúlt törekvései bebizonyították, hogy sikeresen lehet csökkenteni a halliszt és a halolaj arányát az egyes halfajok számára alkalmazandó tápokban és helyettesíteni más fehérjeforrásokkal. Az utóbbi években a NAIK Halászati Kutatóintézete (NAIK HAKI) is több nagy kutatási projekt keretében vizsgálta egyes olcsóbb potenciális haltakarmány alkotók alkalmazhatóságát kiemelten a ponty takarmányozása céljából. A növényi összetevők közül a szója, repce, csillagfűrt, kukorica, lenolaj vizsgálatával foglalkoztunk. A magas olajtartalmú növények és növényi olajok biztosítják a többszörösen telítetlen esszenciális zsírsavak (linol- és linolénsav) szükséges mennyiségét a haltakarmányokban, kivéve az EPA, DHA és ARA létfontosságú komponenseket, melyeket csak a halolajból vagy természetes táplálékból tudunk biztosítani. Vizsgálataink azt mutatták, hogy ezek a ta-

kormányok jelentős negatív hatást nem eredményeznek a ponty növekedésében vagy a betegségekkel szembeni ellenálló képességben (Ardó és mtsai, 2009).

Amíg az eddigi megállapítások a rövidtávú takarmányozási kísérletek eredményeiből származtak, nem voltak ismertek a teljes hal életcikluson keresztül történő alkalmazás hatásai, esetleges előnyei vagy hátrányai. Az EU FP7 támogatással megvalósuló ARRANA projekt lehetőséget biztosított ezen folyamatok tanulmányozására, melyeket tavi monokultúrában nevelt ponty esetében terveztünk vizsgálni. A projekt fő célkitűzése a növényi fehérje- és olajtartalmú tavi kiegészítő takarmány hosszú távú hatásának vizsgálata a növekedésre, takarmányhasznosításra, anyagcserefolyamatokra, immunrendszerre, húsminőségre, szaporodóképességre és az utódok életképességére, ezen kívül fontosnak tartjuk a tápkiegészítésnek a tavak eltartóképességére gyakorolt hatásának vizsgálatát is.

A tógazdasági haltenyésztés szabványosítására a halhúsminőség tekintetében eddig kevés figyelmet fordítottak, pedig az étkezési méretű halak húsának összetételét takarmányozással befolyásolhatjuk és javíthatjuk azokat a főbb jellemzőket, amelyek a humán táplálkozás szempontjából is fontosak. Méréseink szerint (Lengyel és mtsai, 2001) a hagyományos tógazdasági ponty zsírtartalma igen magasnak (9-14 % eredeti anyagra) tekinthető és a humán táplálkozás szempontjából létfontosságú hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavak aránya (EPA, DHA és ARA) viszonylagosan alacsony (1-2%). Jelenleg a tógazdasági haltermelés a víztér természetes produktumán és kiegészítő gabona alapú takarmányozáson alapul, de egyre nagyobb teret nyer a minőségi hal előállításának igénye és ezzel együtt az intenzíven nevelt halaknál a formulált, teljes tápértékű takarmányok alkalmazásának szükségessége.

Vizsgálataink célja két különböző összetételű kiegészítő takarmányozás összehasonlítása volt tavi technológiában, különösen a hallisztmentes növényi tápkiegészítés (alacsony Lc-PUFA tartalommal) hatásának vizsgálata a teljes életciklus termelési paramétereire, a halak egészségi állapotra és végezetül a piaci méretű ponty húsminőségére, kihozatali mutatóira.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A projekt első évében két különböző takarmányon (mérsékelt halliszt-halolaj tartalmú táp, növényi fehérje-növényi olaj tartalmú táp) készítettük fel az anyajelölteket, ezt követően a második évben szaporítottunk csoportonként 3-3 jelöltet, majd az utódok nevelésénél hasonló módon alakítottuk ki a csoportokat, mint az anyáknál. A takarmányozást és a népesítést úgy állítottuk be, hogy 2 éves technológiával piaci méretű halat, a harmadik év végén anyajelölteket állítsunk elő. A nevelést mindhárom évben ugyanazokban a tavakban (~0,17 ha) végeztük, ahol az első évben 20000 db/ha, második évben 4000 db/ha, harmadik évben 1000 db/ha népesítési sűrűséget

alkalmaztunk. A szezon során a megfelelő takarmányadag megállapítása céljából rendszeres próbahalaszatot végeztünk. A napi kijuttatott takarmányadag a metabolikus testtömeg ($\text{kg}^{0,8}$) 1,5-3,2%-a között változott. Az őszi lehalászás során a csoportokat külön telelőben tartottuk, majd a következő évben újranevesítettük a nevelő tavakat. A termelési szezon során a tavak planktonállományát is monitoroztuk, valamint mintát gyűjtöttünk a természetes táplálékforrás zsírsavtartalmának meghatározásához. A tavaszi, kora nyári időszakban háromhetente, a későbbi időszakban havi gyakorisággal vettünk planktonmintát 50 μm szembőségű planktonháló segítségével.

A termelési és takarmányhasznosítási mutatók meghatározása következőképpen történt:

fajlagos napi növekedési sebesség $\text{SGR} \% = 100 \cdot (\ln W_t - \ln W_0) / t$;

takarmányhasznosulás $(\text{FCR}) = F_i / (W_t - W_0)$;

fehérjehasznosulás $(\text{PER}) = \text{testtömeg növekedés} / \text{fehérje bevitel}$, ahol W_t és W_0 a hal záró és kezdeti tömegét g-ban, a t a kísérlet időtartamát napban, az F_i pedig az összes bevitt táp mennyiségét jelenti g-ban.

A kísérlet 862. napján (519 napig tartó etetési időszak után) a 3 nyaras pontyokból mintát gyűjtöttünk. A vizsgálatok kiterjedtek a testtömeg, biometriai mutatók, kihozatali mutatók felvételére, halfilék beltartalmi értékeinek (nyerszsír, nyersfehérje, nyersshamu, víztartalom), makro- és mikroelemek, esszenciális zsírsavak meghatározására. A testösszetétel vizsgálatokhoz standard analitikai módszerek használtunk (Sándor és mtsai, 2009).

TAKARMÁNYOK

Célunk a ponty tápanyagigényének figyelembevételével olyan, a tavi nevelésben alkalmazható összetett takarmányokat előállításra volt, amelyek közül az egyik mérsékelt halliszt és halolaj tartalmú (FM/FO) (14-16 % halliszt, 1,65-2,2% halolaj), a másik pedig csak növényi alkotókat tartalmazó (PM/VO) (növényi fehérje és szénhidrát, valamint 1,8-2,5 % lenolaj) volt. A tápreceptúra és a takarmányok összetétele az 1. táblázatban látható. A takarmányok fehérje- (28-34%) és energiatartalma (18-18, 2 MJ/kg), valamint n-3/n-6 aránya a két csoportnál azonos, linolsav/linolénsav aránya viszont különböző volt. Kiegészítésként a tavakat 4-6 alkalommal trágyáztuk évente (2,7 tonna/hektár/tenyésztő).

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A testösszetétel vizsgálatokat az első két évben 6 párhuzamos méréssel, a harmadik évben pedig 9 párhuzamban végeztük. Az egyes csoportok mérési eredményei közötti különbséget egytényezős varianciaanalízissel, $p < 0,05$ szignifikancia szinten értékeltük. A statisztikai értékeléshez SigmaStat 3.0 programot (SPSS, Inc.) használtuk, normalitási próbákhoz Anova-Duncan és Mann-Whitney teszteket alkalmaztunk.

1. táblázat

	2012/2016	2013	2014	2015
	anyanevelő	zsenge	ivadék	felőtt
Alkotók (%)	Pr28	Pr34	Pr33	Pr30
	%	%	%	%
FM/FO				
Halliszt (Pr-60)	16,00	16,00	16,00	14,00
Őszi búza	16,82	8,88	10,08	20,50
Full-fat szója	6,50	6,00	4,03	6,50
Kukorica	33,00	30,00	30,73	27,50
Extr.szója	13,48	25,47	25,36	17,50
Vérliszt	5,00	5,00	5,00	5,00
Takarmányélesztő	5,00	5,00	5,00	5,00
Vit-Min mx	2,00	2,00	2,00	2,00
Halolaj	2,20	1,65	1,80	2,00
Nyers fehérje %	28,79	33,97	32,70	30,18
Nyers zsír %	4,66	6,21	6,27	7,38
Energia KJ	19,58	18,01	17,84	17,96
PM/VO				
Halliszt (Pr-60)	0,00	0,00	0,00	0,00
Őszi búza	11,00	5,60	8,90	16,50
Kukorica	32,50	29,00	27,00	27,50
Full-fat szója	13,00	7,80	9,00	9,50
Extr.szója	26,00	40,75	38,30	29,50
Vérliszt	8,00	8,00	8,00	8,00
Takarmányélesztő	5,00	5,00	5,00	5,00
Vit-Min mx	2,00	2,00	2,00	2,00
Lenolaj	2,50	1,85	1,80	2,00
Nyers fehérje %	29,14	34,31	31,72	29,57
Nyers zsír %	5,87	5,86	5,92	7,43
Energia MJ	18,91	18,11	17,99	18,26

energia (MJ/kg) = (23,64*nyersfehérje+17,15*nitrogénmentes
kivonat+39,54*nyerszsír)

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az ivadéknevelés első időszakában a legjobb termelési adatokat a halolajos csoport esetében találtuk, de szignifikáns különbség nem volt a növényi olajos csoporthoz képest a növekedés, túlélés és takarmányhasznosítás esetében (2. táblázat). Az immunstátusz monitoringja során megállapítottuk, hogy a növényi olajos takarmány alkalmazása nem rontja a pontyivadékok ellenálló- és stressztűrő képességét a tavi nevelés során (adatok Fazekas és mtsai (2016) közleményében található). A teletetés során a lehalászáskor mért zsirtartalom 80%, illetve 90%-ra csökkent a halolajos, illetve a növényi olajos csoport esetében, a zsírsavak mennyisége mindkét csoportnál kevesebb, mint a felére esett vissza (3. táblázat). Ez azt bizonyítja, hogy a zsírraktárak (zsírdepó) igen jól tudtak mobilizálódni alacsony vízhőmérsékleten a tápon nevelt halaknál. Lényegi különbség a két csoport között nem volt.

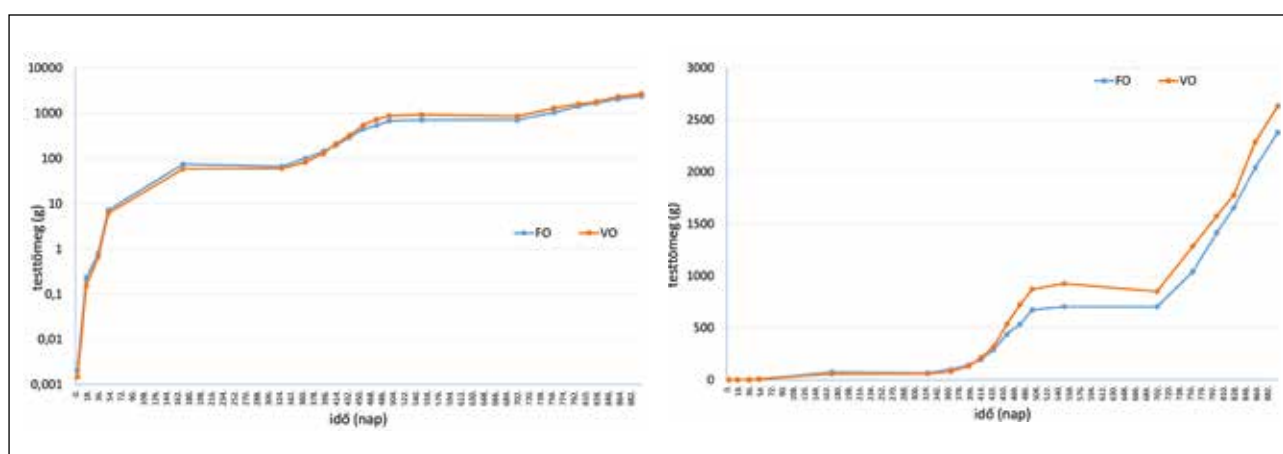
A második év során a termelési mutatók különböző módon változtak a növényi és halolajos csoport között a tenyésztés alatt bekövetkező ismeretlen eredetű haleltűnés/elhullás miatt. Ennek eredményeként a záró testtömeg, a kondíciófaktor, a takarmányhasznosítás és fajlagos növekedés a növényi olajos csoportnál magasabb volt, mint a halliszt csoportnál. Ugyanakkor az FM/FO csoport fehérjehasznosítása mégis jobbnak bizonyult és a nettó hozam a jobb megmaradás miatt is ebben a csoportban volt magasabb. A testtömeg változást a tenyésztés teljes szakaszában az 1. ábrán mutatjuk be. A kétnyaras halak testösszetételének vizsgálata során már szignifikáns különbség mutatkozik a teljes test zsirtartalmában, a máj és filék zsírsavprofiljában is (2-3. ábra). A halliszt csoportnál EPA+DHA deponálás látható a halalapú takarmányozás következtében, a növényi olajos csoportnál is számottevő az EPA és DHA tartalom a filében és a májban, mely LC-PUFA szintézisre utal. A máj zsírsavösszetételének változása a nyári és az őszi minták esetében mutatja a deszaturációs és elongációs folyamatok felgyorsulását az alacsonyabb

2. táblázat: Termelési mutatók

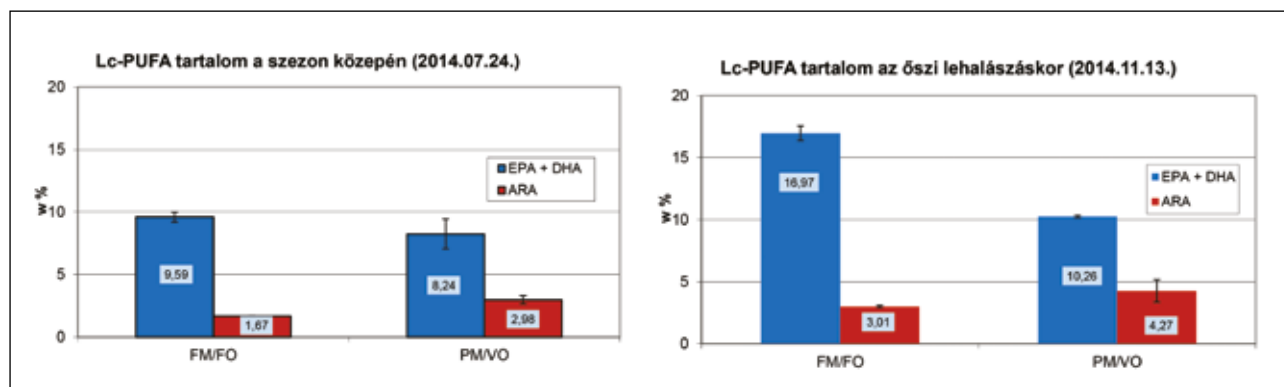
Időszak		2013		2014		2015	
Csoportok		FM/FO	PM/VO	FM/FO	PM/VO	FM/FO	PM/VO
Teljes testhossz	(cm)	16.6 ± 2.1 ^a	15.1 ± 1.0 ^b	34.1 ± 5.9	32.4 ± 4.8	50.07 ± 2.01	50.76 ± 2.10
Testtömeg	(g)	77.9 ± 27.6	62.2 ± 12.0	703 ± 82	924 ± 199	2377 ± 303	2632 ± 346
Megmaradás	(%)	78.6 ± 3.0	75.0 ± 2.0	72.7 ± 11.2 ^a	49.2 ± 6.5 ^b	88.2 ± 2.5 ^a	91.8 ± 0.9 ^b
SGR	(%/nap)	3.37 ± 0.05	3.33 ± 0.12	1.05 ± 0.08	1.22 ± 0.10	0.65 ± 0.02 ^a	0.60 ± 0.02 ^b
FCR	(g/g)	1.63 ± 0.11	1.91 ± 0.08	1.99 ± 0.04 ^a	2.30 ± 0.10 ^b	2.54 ± 0.09	2.58 ± 0.02
Kondíció faktor	(g.cm ⁻³)	1.7 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.2 ^a	2.0 ± 0.1 ^b	1.90 ± 0.11	2.06 ± 0.14
PER	(g/g)	1.70 ± 0.12 ^a	1.53 ± 0.06 ^b	1.22 ± 0.11 ^a	0.87 ± 0.03 ^b	1.31 ± 0.05	1.31 ± 0.01
Nettó hozam	(kg/ha)	1.14 ± 0.03 ^a	0.86 ± 0.19 ^b	2035 ± 129 ^a	1615 ± 108 ^b	1622 ± 104	1820 ± 84

3. táblázat: A teletetés előtt és után mért növekedési és testösszetétel adatok

Őszi lehalászás 2013. 10.30															
n=50						n=15									
csoportok	tömeg (g)		LS (mm)			zsír % sz.a.			20:5n-3 w%		22:6n-3 w%				
FM/FO	77.9	±	27,6	13.50	±	1,8	25.43	±	0,46	1.24	±	0,27	3.07	±	0,37
PM/FO	62.2	±	12,0	12.19	±	0,9	22.83	±	2,95	0.75	±	0,13	1.72	±	0,05
Teletetés után 2014.04.04															
n=50-100						n=15									
csoportok	tömeg (g)		LS (mm)			zsír % sz.a.			20:5n-3 w%		22:6n-3 w%				
FM/FO	72.6	±	15.9	13.06	±	1.2	19.63	±	0.15	0.68	±	0.15	1.93	±	0.40
PM/FO	58.7	±	11.5	12.30	±	1.0	20.89	±	0.29	0.37	±	0.08	0.95	±	0.23



1. ábra. Testtömeg változása a hároméves tenyésztési időszak alatt

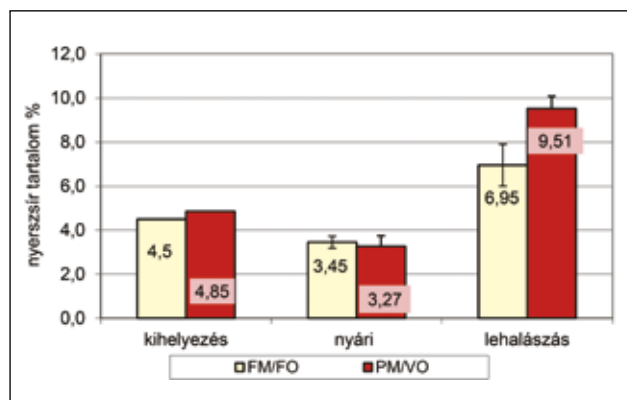


2. ábra. A májban raktározott Lc-PUFA mennyisége (w%) a nyári és őszi mintákban

hőmérsékletek megjelenésével (2. ábra). Az egyes szövetek zsírsavösszetétele korrelációt mutatott a zsírsavanyagcserét és a peroxidációs folyamatokat jellemző gének aktivitásával (az adatok későbbi publikációban jelennek meg).

A takarmányozási kísérlet harmadik évében 2 kg átlagsúlyú halaknál értékeltük a húsminőséget, kihozatali mutatókat, valamint a lehalászáskor meghatározott termelési paramétereket (2. táblázat). A kísérletet ebben az évben 3 ismétlésben folytattuk. A lehalászáskor mért adatok alapján továbbra is a növényi olajos csoport ért el nagyobb testtömeggyarapodást, de a többi mutatóban

nem látható szignifikáns különbség. A megmaradás az előző évvel szemben kedvezően alakult, 88-91% közötti tartományban. A húsminőségi vizsgálatokhoz feldolgozott halak kihozatali mutatóinál különbséget láthatunk a fejdex és májindex esetében (3. táblázat.) A növényi olajos csoportnál az értékek valamivel magasabbak, mint a halolajos csoport esetében. A filézési hozamban nem mutattunk ki különbséget. A gonádttermelés meglepő módon alakult, amikor a lenolajos csoportnál tulajdonképpen nem találtunk női ivarterméket. A hím egyedek ugyanakkor jelentős mennyiségű tejet termeltek.



3. ábra. A hal zsírtartalmának változása (% e.a.) a tenyésztés második évében (2014)

4. táblázat. A pontyfilék kihozatali mutatói és beltartalmi értékei (2015)

Kihozatali mutatók	FM/FO	PM/VO
Test tömeg (g)	2102±238	2139±240
Testhossz (mm)	495±17	480±32
Fej index (%)	17,9±0,9 ^a	19,7±1,1 ^b
Filézési hozam (%)	40,6±2,4	41,2±3,4
Máj index (%)	2,1±0,3	2,6±0,5
Gonadoszomatikus index (%) ikrás	7,5±3,0 ^a	0
Zsír (%)	3,4±0,0 ^a	4,2±0,0 ^b
Fehérje (%)	16,34±0,52	16,67±0,09
Ásványi anyag (%)	1,05±0,02	1,04±0,03
Ca (mg kg ⁻¹)	644,2	571,2
Mg (mg kg ⁻¹)	544,7	524,0
P (mg kg ⁻¹)	1896,7	1833,3
K (mg kg ⁻¹)	2950,0	2996,7
Fe (mg kg ⁻¹)	12,2	10,4
Cu (mg kg ⁻¹)	0,745	0,659
Zn (mg kg ⁻¹)	13,0	7,8
Zsírsvav tartalom mg FA/g		
Total SFA	19,0±0,7 ^a	16,0±1,4 ^b
Total MUFA	35,4±1,3 ^a	30,5±3,4 ^b
Arachidonsav 20:4n-6	0,6±0,03 ^a	0,7±0,04 ^b
Eikozapentaénsav 20:5n-3	1,0±0,05 ^a	0,6±0,1 ^b
Dokozahexaénsav 22:6n-3	2,6±0,09 ^a	1,0±0,05 ^b

A zsírtartalom kedvezőbben alakult a hallisztes csoportnál (3,4% e.a.), mint a lenolajosnál (4,2% e.a.). Ezek az értékek így is jóval alacsonyabbak a tradicionális, gabona kiegészítésű tavi etetéssel előállított pontyfilé zsírtartalmánál (9-12%) (Csengeri, 2008). A hosszú szénláncú többszörösen telítetlen esszenciális zsírsavak mennyisége természetesen a halolajos csoportban magasabb (a tengeri forrás miatt) (4. táblázat). A lenolaj magas linolénsav tartalma csak korlátozott mértékben járult hozzá a hosszú szénláncú PUFA tartalomhoz, ennél a csoportnál ez az ér-

ték szignifikánsan alacsonyabb volt, mint amit a hallisztes csoportnál mértünk. A filék makro- és mikroelem tartalma a takarmány alapanyagok elemtartalmának függvénye, így a hallisztes csoportnál a kedvezőbb, de szignifikáns különbség egyedül csak a cinktartalomban jelentkezik (3. táblázat). A filék Ca:P aránya 1:3 körüli (FM/FO: 1:2,9; PM/VO: 1:3,2), amely kedvező tápanyagtartalmú élelmiszert jelent a humán fogyasztás számára. A toxikus fémek a kimutatási határ alatt fordultak elő mindkét csoportnál.

A hároméves kísérlet során megállapítottuk, hogy a növényi fehérje- és lenolaj alapú összetett haltakarmány kiegészítő etetése ponty monokultúrában kedvező, mivel hasonló termelési mutatókat eredményez, mint a halliszt alapú takarmányok. A filék összes zsírtartalma valamivel magasabb, de mégis jóval alacsonyabb, mint a gabonás kiegészítő takarmányozással előállított pontyfilé esetében. Eredményeink azt mutatják, hogy a lenolajban nagy mennyiségben jelenlevő linolénsavat a ponty – már ivadék korától – képes mérsékelt módon magasabb homológgá átalakítani. Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy a teljes életciklus során ez a folyamat nem erősödik, az EPA és DHA hosszú szénláncú többszörösen telített zsírsavak koncentrációja a halhúsban a súlynövekedéssel párhuzamosan nem növekszik. Ennek tükrében valószínűnek tűnik, hogy a magas tápanyagértékű és a humán táplálkozásban kiemelt fontosságú esszenciális zsírsavakban gazdag pontyhús előállításához halliszt/halolaj tartalmú befejező takarmányozásra van szükség a piaci méret elérését megelőzően.

A vizsgálatok az ARRINA (FP7-288895 és Bonus-Hu_12-1-2013-006) és az AQUAREDPO (FP7-316266) projektek anyagi támogatásával valósultak meg.

Irodalomjegyzék

Ardó L., Relic R, Csengeri, I., Zs. Jeney, and G. Jeney: (2009): Effect of fish feeds with different fatty acid contents on stress response of common carp (preliminary results). Proceedings of 4th International Conference "Fishery", pp. 191-196, Belgrád, Szerbia.

Csengeri I. (2008): Halak, rákok és más vízi szervezetek. In: Hajós Gyöngyi (szerk.): Élelmiszer-kémia. Akadémiai Kiadó, Budapest, 2008., pp. 364-378.

Lengyel P., Sándor Zs., Györe K., Szabó P., Pekár F., E. Zubcova., M. N. Alexis, Csengeri I. (2001): A ponty és néhány más hazai pontyféle testösszetételének alakulása a takarmányozással összefüggésben. Halászatfejlesztés vol. 25., pp. 153-161.

Fazekas Gy, Ardó L., Adorján Á., Sh. Kumar, Gócza E., J Sándor Zs., Jeney G. (2016): Halolajjal és növényi olajjal kiegészített haltápok hatása a halastóban nevelt pontyivadék (Cyprinus carpio) növekedésére és természetes immunválaszára. Fialat Kutatók Konferenciája, 2016. március 3-4., Gödöllő. Konferencia kiadvány p:12-15.

Sándor Zs, Gy. Papp Zs., Kiss-Horváth Á., Fazekas J., B. Csávás K., Csengeri I. (2009): Adatok haltakarmányozási alapanyagok tápanyag tartalmáról. Halászatfejlesztés, vol. 32., pp. 123-134.

Tisztelt Olvasók!

A HALÁSZAT 109. évfolyam 2. számának (2016 nyár) Tudomány rovatában leközölt tudományos cikk **Eredmények fejezetében** az 1. számú táblázat nem került leközlésre, amit most pótlólagosan megtekinthetnek.

cím: *Vizsgálatok a balatoni süllő (Sander lucioperca (L.)) parazitás fertőzöttségére vonatkozóan a halfaj tenyésztési lehetőségeit mérlegetve ; szerzők: Molnár Kálmán, Varga Ádám, Székely Csaba; oldalszám: 24–28. A tudományos cikk teljes terjedelemben a HALÁSZAT-TUDOMÁNY elektronikus lapban megjelent, azt az alábbi linken megtekinthetik: http://www.agrarlapok.hu/sites/default/files/halaszat_digitalis_2016_1_final.pdf*

<i>1. táblázat</i>	évszám	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2003	2006	2013	2014	2016
	vizsgált süllők száma	50	44	38	30	4	3	6	24	2	2	1	4	27
A kimutatott parazitafajok neve	előfordulás helye													
Trypanosoma sp	vér			x										
Goussia desseri Molnár, 1996	bélfal		x	x	x			x			x			
Apiosoma sp	uszonyok								x					
Chilodonella piscicola (Zakharas, 1804)	kopoltyú							x	x					
Trichođina sp.	kopoltyú	x	x	x				x	x					
Ichthyophthirius multifiliis Fouquet, 1876	kopoltyú								x					
Capriniana sp.	kopoltyú	x	x	x	x									
Myxobolus sandrae Reuss, 1906	izomzat		x					x	x					x
Henneguya creplini Gurley, 1894	kopoltyúredők	x	x	x	x	x	x	x		x		x	x	x
Sphaerospora danubialis Molnár, 1991	vese													
Dermocystidium sp.	uszonyok	x	x	x	x								x	
Ancyrocephalus paradoxus Creplin, 1839	kopoltyú	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
Proteocephalus percae (Müller, 1780)	bél	x												
Proteocephalus percae skólexek	végbél	x												
Trienophorus nodulosus (Pallas, 1781) (I)	máj	x	x	x				x	x					
Bucephalus polymorphus Baer, 1827	bél	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nicolla skrjabini (Iwanitzky, 1928)	bél	x	x	x	x			x	x				x	x
Diplostomum spathaceum (Rudolphi, 1919) (I)	szemlence			x					x	x				
Tylodelphys clavata (Nordmann, 1832) (I)	üvegtest								x	x			x	x
Tetracotyle sp. (I)	hasüreg, szív	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x	x
Echinochasmus sp. (I)	kopoltyú							x						
Apophallus donicus (Skrjabin et Lindtrop, 1919)	uszonyok	x		x	x				x					
Camallanus truncatus Rudolphi, 1814	bél	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
Lucionema balatonense Moravec et al., 1998	hasüreg, úszóhólyag		x	x										
Anguillicoloides crassus (Kuwahara et al., 1974) (I)	bélfal	x	x	x	x	x		x			x	x	x	x
Ergasilus sieboldi Nordmann, 1832	kopoltyú, operculum	x	x	x	x	x	x	x						x
Achtheres percarum Nordmann, 1832	kopoltyú	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x
Anodontia sp. (I)	kopoltyú, uszonyok	x		x										

Irodalmi áttekintés a süllő és sügér esetében előforduló vírusos és baktériumok okozta betegségekről

Borzák Réka, Sellyei Boglárka

MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Állatorvos-tudományi Intézet

A fogassüllő (*Sander lucioperca L.*) intenzív tenyésztésére több próbálkozás történt már Magyarországon, melyekről számos közlemény, szakmai előadás (Horváth és mtsai, 2005, Tamás és mtsai, 2006, Bódis és mtsai, 2005; Szabó és mtsai, 2007), valamint PhD disszertáció (Molnár, 2002, Bódis, 2008, Szabó, 2009, Németh, 2013) is született. Az eredményes tenyésztés korlátozó tényezői lehetnek a nevelés során fellépő betegségek, melyek felismerése, megelőzése és az ellenük való védekezés kidolgozása elengedhetetlen fontosságú. Témacsoportunk munkatársai a Halászat 109/2 számában megjelent cikkben (Molnár és mtsai, 2016) már beszámoltak a balatoni fogassüllőt károsító parazitás fertőzöttségekről, kiemelve az intenzív rendszerekben is potenciális veszélyt jelentő patogén kórokozókat. Hazánkban egy korábbi előadásanyagban Csaba és mtsai. (2008) ismertették a ragadozóhalakat, köztük a süllőt is érintő, abban az időben ismert betegségeket.

A vírusok és baktériumok okozta, süllőt érintő betegségekről ugyanakkor hazánkban csekély tapasztalattal rendelkezünk, bár jelentőségük korán sem elhanyagolható. Így, jelen tanulmányunkban az európai és észak-amerikai (intenzív süllő és sügér) telepeken jelentkező megbetegedésekben kimutatott kórokozókról szerzett információkat gyűjtöttük össze és ismertettük.

REVIEW OF SIGNIFICANT BACTERIAL AND VIRAL INFECTIONS OF PERCH AND PIKE-PERCH

Réka Borzák, Boglárka Sellyei

Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences – Institute for Veterinary Medical Research

Several attempts have been made already for intensive pike-perch culture in Hungary, numerous publications, oral presentations (Horváth et al. 2005, Tamás et al. 2006, Bódis et al. 2005, Szabó et al. 2007) and PhD dissertations (Molnár 2002, Bódis 2008, Szabó 2009, Németh 2013) were made in this topic. Diseases are also limiting factors of successful breeding, therefore developing new methods for prevention, diagnosis and protection is essential. The parasitic infections of pike-perch in Lake Balaton have been already described by our colleagues (Molnár et al. 2016), highlighting the potential pathogens in intensive systems. Previously, known

diseases of predator fish (including pikeperch) in Hungary were presented by Csaba et al. (2008).

In Hungary, there is not much experience about the viral and bacterial infections of pikeperch yet, although their significance is not negligible. In this study, diseases with viral and bacterial background from European and North-American fish farms with intensive perch and pikeperch breeding were collected.

VIRUSFERTŐZÉSEK

A süllő vírusok okozta megbetegedéseire számos példa található a külföldi szakirodalomban, főként olyan országokból, ahol már korábban tenyésztésbe vonták ezt a halfajt. Más halfajokhoz hasonlóan, a süllő is lárva és ivadék korban a legfogékonyabb a vírusfertőzésekre. Nem véletlen ezért, hogy a szakirodalomban fellelhető adatok is főképp ezekre a korcsoportokra vonatkoznak.

1990-ben egy franciaországi keltetőben komoly elhullást okozott egy addig ismeretlen rhabdovírus a süllőlárvák között (Nougayrède és mtsai., 1992). Az izolált vírus a sügerek rhabdovírusával mutatott hasonlóságot.

Egy észak-olasz halfarmonon, egy feltehetőleg a sügér-hibridekkel behurcolt nodavírus fertőzés tizedelte meg az ivadékot. Kezdetben csak a hibrid sügerek pusztultak, majd a betegség a halgazdaság különböző részein tartott süllőkre, pisztrángsügerekre is áterjedt. A hőmérséklet jelentősen befolyásolta az elhullást, tetőpontját 28-30 °C-on érte el, és teljesen megszűnt, amikor a vízhőmérsékletet 23 °C alá csökkentették. Az olasz kutatóknak a jellegzetes tüneteket (letargia, abnormális, spirális úszás) mutató egyedekből sikerült a vírus kimutatni. Az elhullott 15-20 napos pisztrángsügerekből (*Micropterus salmonides*) és 60 napos süllőkből a kórokozót izolálták és a mediterrán régióban széles körben elterjedt nodavírus típussal (RGGNV) azonosították (Bovo és mtsai., 2011).

Az említett két esetben a tenyésztés során tapasztalt mortalitást egyértelműen kapcsolatba tudták hozni a különböző vírusfertőzésekkel. Akadnak viszont olyan eseteket is, amikor egészségesnek látszó süllőivadékból sikerült vírust izolálni.

A fogassüllő Finnországban őshonos faj, de az állomány növelésének céljából az utóbbi időben tenyésztésbe vonták. Az ivadék kihelyezését megelőző ellenőrzés során egy eddig ismeretlen iridovírust, süllő-iridovírus (PIIV-Pike-perch

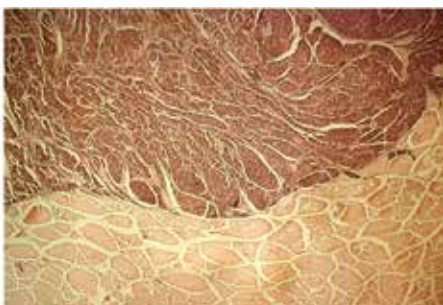
Iridovirus), sikerült kimutatni és izolálni a finn kutatóknak (Tapiovaara és mtsai., 1998). Dán és finn kutatók vizsgálták a fogassüllő fogékonyságát a más fajokból már ismert, az iridovírusok közé tartozó ranavírusokra. A tanulmány igazolta, hogy a fogassüllő kísérletesen megfertőzhető: az EHNV (Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus)-sal, amely vírus komoly problémát okoz az Ausztráliába betelepített csapósügérekben és pisztrángokban, valamint megfertőzhető az elsődlegesen harcsafélékben előforduló European sheatfish (ESV) és European catfish (ECV) vírusokkal is, melyek hazánkban is előfordulnak.



1. ábra. WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus) okozta tumorok az északi süllőn (*Sander vitreus*), (Rovnak és mtsai. 2010)

-2), és a WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus), előfordulása a leggyakoribb. WEHV fertőzés során 2-50 mm átmérőjű, széles, lapos, áttetsző plakkok jelennek meg a megvastagodott hámszövetben. A WDSV a bőr mezenchimális sejtjeinek túlbujzását okozhatja véletlenszerű eloszlással a hal teljes testfelületén. Az elváltozások kb 0,2 - 1 cm átmérőjűek, és

kiemelkednek a pikkelyek síkjából (1. ábra). A tumorok gyakran össze is olvadnak; míg a belső szerveken nem volt tapasztalható patológiás elváltozás. A vírus horizontális átvitele nagyon hatékony, a kísérletesen fertőzött halakban 14 hét elteltével az egyedek 87%-án jelentkeznek tumorok. A vírusokra, kísérletes fertőzés során, más halfajok, pl.



2. ábra. Lymphosarcoma, tiszai süllő (Békési és mtsai. 1986)

A fenti kutatók különböző vízhőmérsékletek mellett is vizsgálták a halak vírusfertőzésekre való fogékonyságát, intenzív és extenzív tartású halakban egyaránt. A legmagasabb elhullás a hőstressznek kitett, intenzív rendszerben tartott süllő ivadék körében tapasztalták, ahol a 28 °C –on történő nevelés, után 12 °C, illetve 22 °C-os vízhőmérsékleten fertőzték meg a halakat. A mortalitás mértéke azonos volt mindkét hőfokon, de a 22 °C-on tartott ivadéknál 5-6 nappal hamarabb jelentkezett, mint 12 °C-on. Itt a pár napos eltolódás a lelassult anyagcserének, és a vírus lassabb szaporodásának tudható be. Az extenzív rendszerben, 16 °C-on nevelt halaknál elenyésző volt az elhullás mértéke később 12 °C és 22 °C-on is (Jensen és mtsai., 2011).

Az európai süllő egyik legközelebbi rokona az északi süllő (*Sander vitreus* Mitchell, 1814), mely egy Észak-Amerikában őshonos édesvízi hal. Ezt a fajt már a múlt században tenyésztésbe vonták. Az északi süllőben főként bőr elváltozásokat, sejtburjánzást okozó vírusok fordulnak elő, mint a lymphocystis disease-t okozó iridovírus, (Weissenberg, 1965), különböző retrovírusok, és herpeszvírus (Kelly és mtsai., 1983). Ezen kórokozók leginkább az ivarérett halakat támadják meg; a tünetek jelentkezése nagyfokú szezonális mutatót mutat.

Az északi süllőt károsító vírusok közül a retrovírusok, a WEHV-1 és -2 (Walleye Epidermal Hyperplasia Virus-1,

a kanadai süllő, a *Sander canadensis* és a *Perca flavescens* (sárga sügér) is fogékonyak bizonyultak.

A fenti vírus-fertőzöttségek érdekessége, hogy feltűnő szezonális mutatókat mutatnak. A leggyakoribban késő ősztől a tavaszi ivási időszakig fordulnak elő. Ívás után a fertőzöttség, minden külső kezelés nélkül fokozottan alábbhagy, és az azt követő évben már jelentősen csökken a megjelenő tumorok száma azokon süllőkön, melyek korábban érintettek voltak. Megfigyelték, hogy élete során a legtöbb süllő átesik ezen a



3. ábra. Lép-daganat, balatoni fogassüllő (Csaba és mtsai. 2001)

fertőzésen ivaréretté válása után (Bowser és mtsai., 1988).

Hazánkban eddig nem írtak le süllőt érintő virális megbetegedéshez köthető nagyarányú elhullást. Ugyanakkor, 1986-ban egy Tiszából fogott 2 kg-os süllőn megfigyeltek diónyi, tumorszerű képletet, de a szövettani vizsgálat során nem találták jelét gyulladásnak, vagy betokozódásnak a tumor körül. A képletet a limfoid szövet rosszindulatú túlbujzásának, lymphosarcoma-nak azonosították (2. ábra, Békési és Kovács-Gayer, 1986). Továbbá, 1995-ben, két balatoni fogassüllő boncolása során a lép daganatos el-fajulását tapasztalták. A többi szervben (kopolytú, máj, vese,



4. ábra. *Chryseobacterium* fertőzésre utaló faroknyéli elszíneződés balatoni fogassüllőn (*Sander lucioperca*)

bél) áttétek nem alakultak ki (3. ábra, Csaba és mtsai., 2001, 2008), az elváltozás kiváltó oka nem tisztázott.

BAKTÉRIUMOK OKOZTA MEGBETEGEDÉSEK

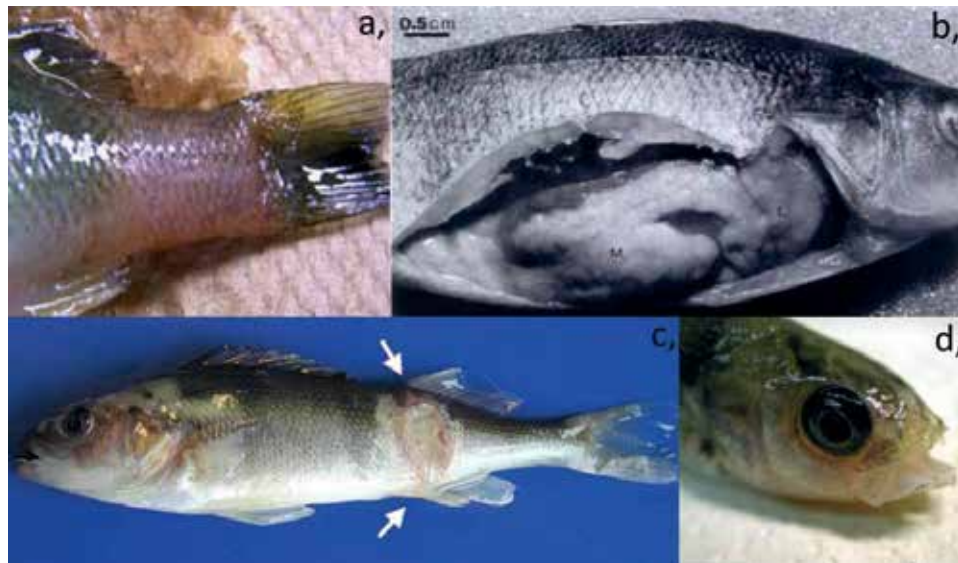
A fogassüllő lehetséges bakteriális megbetegedéseivel kapcsolatos adatok tekintetében a szakirodalom meglehetősen hiányos. Ugyanakkor elhamarkodott volna olyan következtetést levonni, mely szerint a probléma nem is létezik. Az óceán két partján tenyésztésbe vont rokon fajokban, mint az európai csapósügér (*Perca fluviatilis*, Linnaeus, 1758) és az észak-amerikai sügér (*Perca flavescens* (Mitchill, 1814)), egyaránt előfordulnak jelentős halpusztulást előidéző bakteriális megbetegedések.

Észak-Amerikában a tél végi, kora tavaszi időszakban a sárgán pigmentált telepeket képző, Gram-negatív, nem mozgó pálcika alakú, *Chryseobacterium indologenes* baktérium által előidézett, a hátúszón és a faroknyélen jelentkező (4. ábra), bőrsérülésekkel járó tömeges megbetegedéseket és elhullásokat írtak le tenyésztett sügér állományban (Pridgeon és mtsai., 2013). Korábban, az év ugyanezen szakaszában, a kanadai állományban granulomás bőrelváltozás, máj- és hashártyagyulladás formájában megmutatkozó *Mycobacterium chelonae* fertőzés okozott jelenős problémát (Daoust és mtsai., 1989).

Európában a nyárvégi, őszi időszakban a különböző *Aeromonas* fajok által előidézett, bőrfekélyekkel,

farokrothadással és / vagy szeptikémiával járó nagymérvű elhullásokról számoltak be csapósügér állományokkal kapcsolatosan. Európai országokban (Franciaország, Svájc, Litvánia) más-más baktériumfajt azonosítottak elsődleges kórokozóként. E szerint az *A. hydrophila*, az *A. sobria* és az *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* egyaránt képes jelentős gazdasági kárt okozó megbetegedéseket előidézni (Michel, 1981; Whali és mtsai., 2005; Skrodenyté-Arbačiauskienė és mtsai., 2010). Finnországban a kora tavaszi időszakban bekövetkező, a *Flavobacterium psychrophilum* („Coldwater Disease”) fertőzés hatására jelentkező, az állkapocsontok, esetenként a szem és a vese károsodásával járó tömeges elhullást jegyezték fel (Lönnström és mtsai., 2008) (5. ábra).

Ezt a cikket, a süllő (és a sügér) intenzív tenyésztésbe vonásának előtérbe kerülése miatt, a hazai halászati szakma képviselőinek írtuk, figyelem felkeltés céljából. A fertőzések megelőzése érdekében a megfelelő tartási körülmények biztosítását, illetve újonnan érkező állomány esetében a karanténost javasoljuk. A fent említett betegségek megjelenése a hazai viszonyok között egyelőre nem megjósolható, de lehetséges patogének ismeretében könnyebb lehet azok felismerése, diagnosztizálása a jövőben. Sajnos, mint minden új halfaj tenyésztésbe állítása esetén, a termelés volumenének fokozódása során fog csak megmutatkozni egy-egy kórokozó jelentősége.



5. ábra. *Chryseobacterium indologenes* (a) és *Mycobacterium chelonae* (b) fertőzés sárga sügéren (*Perca flavescens*) (Pridgeon és mtsai. 2013, Daoust és mtsai. 1989); *Aeromonas sobria* (c) és *Flavobacterium psychrophilum* (d) fertőzés csapósügérben (*Perca fluviatilis*) (Wahli és mtsai. 2005; Lönnström és mtsai., 2008)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

A cikk az alábbi pályázatok támogatásával jött létre: OTKA K100132, GINOP-2.3.2-15-2016-00004.

SZAKIRODALOM

- Békési L, Kovács-Gayer E. (1986) Lymphosarcoma in pike-perch (*Stizostedion lucioperca* L.): a case report. *Acta Vet Hung.* 34(1-2):101-102.
- Bódis M. (2008) Az intenzív süllőtermelés technológiai elemeinek vizsgálata. Doktori (PhD) Értekezés Pannon Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely, 117 pp.
- Bódis M, Ittész I, Németh Sz, Bercsényi M. (2008) Új magyar módszer a mesterséges süllőszaporításban - az ikrás halak ivarnyílásának szaporítás előtti elzárása. *Halászat* 101(1): 6-7.
- Bovo G, Gustinelli A, Quaglio F, Gobbo F, Panzarin V, Fusaro A, Mutinelli F, Caffara M, Fioravanti ML. (2011) Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. *Dis Aquat Organ.* 96(1):45-54.
- Bowser PR, Wolfe MJ, Forney JL, Wooster GA. (1988) Seasonal prevalence of skin tumors from walleye (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York. *J Wildl Dis.* 24(2):292-298.
- Csaba G, Láng M, Majoros G. (2001) Daganatok előfordulása hazai halainkban. XXV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Absztrakt kötet 12-13., Szarvas, 2001. május 16-17.
- Csaba G, Láng M, Gonda E. (2008) A ragadozóhalak betegségei természetes viszonyok és intenzív körülmények között. XXXII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Absztrakt kötet 58-59., Szarvas, 2008. május 14-15.
- Daoust PY, Larson BE, Johnson GR. (1989) Mycobacteriosis in yellow perch (*Perca flavescens*) from two lakes in Alberta. *J Wildl Dis.* 25(1):31-37.
- Jensen BB, Holopainen R, Tapiovaara H, Ariel E. (2011) Susceptibility of pike-perch *Sander lucioperca* to a panel of ranavirus isolates. *Aquaculture* 313(1-4):24-30.
- Horváth L, Csorbai B, Szabó K, Tamás G. (2005) Újabb tapasztalatok az indukált süllőszaporítás terén. *Halászatfejlesztés* 1: 41-53.
- Kelly RK, Nielsen O, Mitchell SC. (1983) Characterization of Herpesvirus vitreum isolated hyperplastic epidermal tissue of walleye, *Stizostedion vitreum vitreum* (Mitchill). *J Fish Dis.* 6(3):249-260.
- Lönström LG, Hoffrén ML, Wiklund T. (2008) Flavobacterium psychrophilum associated with mortality of farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *J Fish Dis.* 31(10):793-797.
- Michel C. (1981) A bacterial disease of perch (*Perca fluviatilis* L.) in an alpine lake: isolation and preliminary study of the causative organism. *J Wildl Dis.* 17(4):505-510.
- Molnár T. (2002) A süllő (*Stizostedion lucioperca* L.) mesterséges környezetben történő tartásának és takarmányozásának, népesítésének és takarmányozási problémáinak vizsgálata. Doktori (PhD) Értekezés Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár, 129 pp.
- Németh Á. (2013) Új technológia a fogassüllő (*Sander lucioperca* L.) mesterséges szaporítására és nevelésére, a déldunántúli halastavak gazdaságosabb üzemelése érdekében. Doktori (PhD) Értekezés Nyugat-Magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- És Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, 194 pp.
- Nougayrède PH, de Kinkelin P, Chilmontczyk S, Vuillaume A. (1992) Isolation of a rhabdovirus from the pike-perch *Stizostedion lucioperca* (L. 1758). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12(1):5-7.
- Pridgeon JW, Klesius PH, Garcia JC. (2013) Identification and virulence of *Chryseobacterium indologenes* isolated from diseased yellow perch (*Perca flavescens*). *J Appl Microbiol.* 114(3):636-643.
- Skrodenytė-Arbačiauskienė V, Kazlauskienė N, Vosylienė MZ, Virbickas T. (2010) Identification of *Aeromonas salmonicida* in European perch from North Lithuanian rivers during mass mortalities in 2008. *Cent. Eur. J. Biol.* 5(6):831-838.
- Szabó G. (2009) A süllő (*Sander lucioperca* L.) és a kősüllő (*Sander volgensis* Gmelin) húsminőségének és növekedésének vizsgálata eltérő zsírsavösszetételű tápok etetése mellett. Doktori (PhD) Értekezés Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár, 126 pp.
- Szabó G, Molnár T, Stettner G, Hancz Cs. (2007) Intenzív süllő (*Sander lucioperca* L.) és kősüllő (*Stizostedion volgensis*) nevelési kísérletek a Kaposvári Egyetemen. Eredményeink összefoglalása. XXXI. Halászati Tudományos Tanácskozás, HAKI Szarvas, 2007. május 16-17. Konferencia kiadvány:30.p.
- Tamás G, Csorbai B, Kovács É, Németh I, Horváth L. (2006) A süllő (*Sander lucioperca*) szaporítási technológiájának továbbfejlesztése. *Halászat* 99(4):157-169. (2006)
- Tapiovaara H, Olesen NJ, Lindén J, Rimaila-Pärnänen E, von Bonsdorff CH. (1998) Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Dis Aquat Organ.* 32(3):185-193.
- Wahli T, Burr SE, Pugovkin D, Mueller O, Frey J. (2005) *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *J Fish Dis.* 28(3):141-150.
- Weissenberg R. (1965) Fifty years of research on the Lymphocystis virus disease of fishes (1914-1964). *Annals of the New York Academy of Sciences* 126:362-374.

Az ivararányok fenotípusos és molekuláris genetikai vizsgálata hazai sebespisztráng-állományokban

Ósz Ágnes¹, Horváth Ákos¹, Hoitsy György², Keszte Szilvia¹, Sáfrány Anna Júlia¹, Balogh Erna¹, Gutti Csaba¹, Nagy Bálint¹, Lefler Kinga Katalin¹, Urbányi Béla¹, Kovács Balázs¹

¹ Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.

² Hoitsy és Rieger Kft., Lillafüredi Pisztrángtelep, 3517 Lillafüred, Erzsébet sétány 55.

ÖSSZEFOGLALÁS

Minden tenyésztett halfaj esetében, így a lazacféléknél is igen fontos gazdasági szempont a megfelelő állománylétszám és ivararány kialakítása a lehető leghamarabb. Mivel a lazacfélék többsége 2-4 év alatt éri el az ivarérettséget, így a költségeket csökkentheti, ha már az ivarérettség előtt, például az anyák válogatásánál meghatározható az egyedek ivara. A lazacalakúak rendjén belül több fajban, de kis létszámban kimutattak egy, a rendben konzervatív módon megjelenő és a hím ivarhoz köthető marker gént. Elsőként a szivárványos pisztrángban írták le ezt az Y kromoszómán található ivari dimorfizmus gént (sexually dimorphic on the Y chromosome, sdY), ami felelős a hím ivar kialakulásáért. Ez alapján célul tűztük ki az sdY gén és a hím ivar kapcsoltságának vizsgálatát a hazai sebespisztráng állományok esetében, ezért a marker működésének ellenőrzésére kifejlett ivarszervekkel rendelkező egyedeket vizsgáltunk, majd ezután a marker vizsgálatát a lillafüredi és szilvásváradi tenyészállományokon, illetve hat hazai természetes populációban végeztük el. Az ivarszervek és a gén együttes vizsgálata bizonyította az sdY gén ivari markerként való alkalmazhatóságát az általunk vizsgált sebes pisztráng állományokban is. Az tenyészállományok vizsgálata során kiderült, hogy az ivási időn kívül végzett morfológiai ivar meghatározásnál megbízhatóbb az sdY marker alkalmazása. Ezen felül megállapítottuk, hogy a tenyészállományokban a tejesek és ikrások aránya közel 50-50 százalék, ami a tenyésztők hozzáértésére utal. A természetes populációkban többségében a tejesek túlsúlyát kaptuk, ami eredhet az alacsony mintaszámokból, de esetleg utalhat a közelmúltban végzett telepítésekre is, illetve valamilyen környezeti hatásra. Eredményeink alapján elmondható, hogy az sdY gén használatát érdemes a továbbiakban is kutatni, esetleg gyorsabb és hatékonyabb kimutatási eljárás kifejlesztteni.

ANALYSIS OF GENDER PROPORTION IN HUNGARIAN BROWN TROUT POPULATIONS BASED ON PHENOTYPIC AND MOLECULAR MARKERS

SUMMARY

Adequate stock size and sex ratio are important features for all cultured fish species including salmonids. Salmonids mature at the age of 2-4 years, thus costs can be reduced if the sex of each individual in the broodstock can be identified earlier. A male-specific gene was discovered on the Y chromosome in rainbow trout which induces the development of the male sex (named as sexually dimorphic on the Y chromosome, sdY). This marker was later found as a male-specific marker on the Y chromosome in other Salmonid species, including the brown trout, however, it was proven only in small populations. Thus, we decided to check the applicability of this sdY marker in two Hungarian brown trout broodstocks with large sample sizes and analyse the gender proportion in six wild populations. Firstly, sexually mature individuals were analysed by both gonad morphology and the sdY marker in order to verify the applicability of this marker. Later, broodstock analyses revealed that the sdY marker is more reliable than a morphology analyses out of the spawning season. In broodstocks, a sex ratio of close to 50-50% was found by the sdY marker. However, in wild populations a higher proportion of male individuals was found, which can either be an artefact of smaller sample sizes or a results of recent stocking actions. The application of the sdY marker is highly recommended to assess sex ratio in Salmonid populations. Further analyses and research of the sdY marker can lead to the development of a quick sex test based on this marker.

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A lazacfélék nagy gazdasági értékkel rendelkező halfajok, termelésük mértéke folyamatosan növe-

szik, mely mára éves szinten a három millió tonnát is elérte (FAO, 2012, 2014). Anyaállományok kialakításakor minden tenyésztőnek fontos szempont a megfelelő ivararány kialakítása, azonban a lazacfélék esetében, a morfológiai bélyegek alapján az ivarok elkülönítésére csak ivarérett korban (ami akár 2-3 év is lehet), és az ívási időszakban van lehetőség, de sok esetben száz százalékos megbízhatósággal még ebben az esetben is csak az ivartermék lefejtésével állapítható meg az egyed neme. Ezalatt a tenyésztő számára a szükségesnél nagyobb állomány fenntartása nagy anyagi befektetéssel járhat.

A váltivarú halak többségénél az elsődleges ivari jellegeken túl, állandó vagy időszakos másodlagos ivari jelleg is megjelenhetnek, például megfigyelhetőek küllemi változatok, színezetbeli különbségek és eltérő testformák. A szívárványos guppik esetében például állandó jellegről beszélhetünk, mivel a hímek kisebb testűek és élénkebb színezetűek, míg a nőstények egyszerűbb színezettel és nagyobb testtel



1. ábra: A tejes (felül) és ikrás (alul) sebes pisztráng egyedek közti morfológiai különbség ívási időben (forrás: Hoitsy, 2002)

rendelkeznek. A lazacfélék esetében azonban időleges ivari jellemzők jelennek meg ívási időszakban, amikor a hímek esetében kifejlődik az ívókampó és színezetük is megváltozik (1.ábra) (Hoitsy, 2002).

Váltivarú halfajok esetében a természetben az ivararány általában közel van az 1:1-hez, de a végleges arányt genetikai és környezeti hatások is befolyásolják (Devlin and Nagahama, 2002). A genetikai ivar-

determináció egyik kevésbé ismert formája a poligénes ivarmeghatározás, mely során az adott ivar több gén együttműködése révén alakul ki (például a laboratóriumi zebradánió esetében) (Liew et al., 2012). Másik formája az egygénis ivardetermináció, mely az ivari kromoszómához köthető. Halaknál valamennyi, az állatvilág más rendszertani egységeiben előforduló ivari kromoszóma rendszer megtalálható, azonban leggyakoribb az emlősökre is jellemző XX (nőstény) és XY (hím) ivari öröklődésment, amikor az utód ivarát a spermium határozza meg, azonban csak a fajok megközelítőleg 10%-a rendelkezik morfológiailag elkülöníthető ivari kromoszómával. A többi faj esetén csak kísérletesen igazolható az ivari kromoszómák létezése, mint például a lazacfélék esetében (Devlin and Nagahama, 2002; Li et al., 2011). Ennek egyik módja az ivari kromoszómán található, az ivarral együtt öröklődő genetikai markerek (ivari markerek) alkalmazása, vagy az ivart meghatározó gén azonosítása. Halak esetén ezek a gének és markerek akár fajonként is különbözőek lehetnek, míg például az emlősök esetében, így az embereknél is az sRY gén felelős a hím ivar kialakulásáért (Berta et al., 1990). 2011-ben a lazacfélék közül elsőként a szívárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss*) azonosították az ivardeterminációért felelős gént, mely az emlősökhöz hasonlóan az Y kromoszómán található és működése felelős a hím ivar kialakulásáért. Ez alapján elnevezték Y kromoszómán található ivari dimorfizmus génnek (sexually dimorphic on the Y chromosome, sdY) (Yano et al., 2012). Fontos megemlíteni, hogy korábban semmilyen más fajban nem írták le ezt a gént, mint az ivar kialakulásban szerepet játszó faktort. Később a gén jelenlétét és ivar meghatározó jellegét más lazacfélékben, köztük a sebes pisztrángban is vizsgálták, kisebb egyedszámú kísérletek keretében. Minden vizsgált fajban a hím ivar kialakulását meghatározó génnek bizonyult, amiből arra következtettek, hogy ez az ivari determinációs gén valószínűleg konzervatív a lazacfélék családjában (Yano et al., 2013). Nagyobb állományok vizsgálatát azonban ez idáig nem végezték el.

A sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) Európa egyik őshonos pisztráng faja, amelyet a 19. század végéig nagy mennyiségben tenyésztettek étkezési halként, azonban mára a tenyésztése átalakult és főleg fajfenntartási és állomány-utánpótlási célokat szolgál horgászhasznosítású vizekben. Magyarországon Lillafüreden és Szilvásváradon tartják fenn tenyészállományait. Célul tűztük ki az sdY gén és a hím ivar kapcsoltságának vizsgálatát a hazai sebes pisztráng állományok esetében, ezért a marker működésének ellenőrzésére kifejlett ivarszervekkel rendelkező egyedeket vizsgáltunk, majd ezután a marker vizsgálatát a lillafüredi és szilvásváradai tenyészállományokon, illetve hat hazai

természetes populációban (a Bán, Jósva, Kemence, Apátkúti, Kölöntés és Bittva patakokból) végeztük el.

ANYAG ÉS MÓDSZER

MINTAVÉTELI HELYSZÍNEK, DNS IZOLÁLÁS ÉS GENETIKAI VIZSGÁLAT

Vizsgálatinkat 60 db, tenyésztett, piaci méretű, kifejlett ivarszervekkel rendelkező sebes pisztráng egyeddel kezdtük meg, melyeken az ivarszervek vizsgálata céljából boncolást végeztünk. A halakat dekapitáltuk, majd az ivarszerveiket kivettük és vizuálisan megvizsgáltuk. Teljes szövettani vizsgálatra nem volt szükség, mivel olyan nagyságú halakat használtunk, melyek ivarszerveiről szemrevételezéssel is teljes biztonsággal megállapítható volt az egyed ivara. Ezen kívül az ivari marker vizsgálata céljából minden egyed esetében egy körülbelül 1 cm²-es mintát is vettünk a farok alatti úszóból, amit abszolút alkoholban, -20°C-on tároltunk.

2012 és 2014 közt a két sebes pisztráng tenyészállományból összesen 317 darab mintát gyűjtöttünk az ivari marker használhatóságának vizsgálata céljából. Ezen kívül hat hazai természetes vízfolyásból összesen 155 darab egyed mintát vettünk meg, az

passzív rádiójeles chippel (PIT tag) is elláttunk a későbbi visszaazonosíthatóság érdekében.

A DNS izolálást E.Z.N.A. Tissue DNS izoláló készlettel (Omega Biotek) végeztük el a gyártó előírása alapján, majd az izolálás minőségét nanofotométerrel ellenőriztük. Az sdY ivari marker vizsgálatát Yano et al. (2013) leírása alapján végeztük el a sebes pisztránghoz javasolt módon. A PCR mixben 3,3 μM volt mindkét primerből (Salmo trutta primerek: sdY E1S1: ATGGCTGACAGAGAGGCCAGAATCCAA és sdY E2AS4: CTTAAAACCACTCCACCTCCAT), ezen kívül 100 ng DNS, 5 mM dNTP mix, 37,5 mM MgCl₂, 2,5 μL 10x (NH₄)₂SO₄ puffer és 1 U Taq polimeráz volt 25 μL végtérfogatban. A alkalmazott hőprofil 3 min 94 °C denaturálással kezdődik, amit 30 sec 94°C, 30 sec 60°C és 30 s 72°C követ 40 cikluson keresztül ismételve, végül 5 min 72°C zárja a reakciót. Az PCR eredményeket 2 %-os agaróz gélen ellenőriztük. Először a boncolt halakon, majd a többi mintán végeztük el a vizsgálatot.

EREDMÉNYEK

BONCOLT HALAK VIZSGÁLATA

A még nem teljesen ivarérett, piaci méretű halak esetében a boncolás alapján teljes mértékben megha-

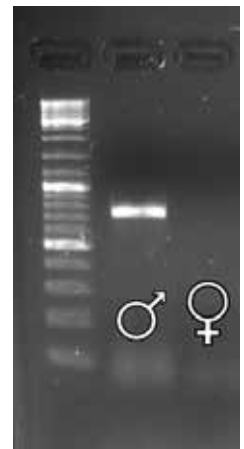
1. táblázat: Vizsgált sebes pisztráng állományok adatai és az ikrások és tejesek aránya az sdY ivari marker vizsgálata alapján, N: mintaszám

Jelölés	Populáció	Típus	Mintázás	N	Ikrások (%)	Tejesek (%)
LFB	Lillafüred	boncolt hal	2013	60	77	23
LFT	Lillafüred	tenyészállomány	2012-2013	242	51	49
SZVT	Szilvásvárad	tenyészállomány	2014	75	49	51
BA	Bán	természetes	2012	25	26	74
JO	Jósva	természetes	2012	33	36	64
KE	Kemence	természetes	2012	24	50	50
AK	Apátkúti	természetes	2013	50	44	56
KO	Kölöntés	természetes	2013	14	36	64
BI	Bittva	természetes	2014	9	22	78

állományok ivararányának megállapítása céljából. A mintavételi adatok az 1. táblázatban láthatóak. A mintákat minden helyszínen ívási időszak után vettük, de amennyire lehetséges volt, próbáltuk az egyedek ivarát morfológiai jegyek alapján is meghatározni. A tenyészállományokban az különböző gyakorlati szakemberek voltak segítségünkre ebben a folyamatban, ahol az ívókampó megléte, a színezet, a testforma és a méret alapján próbáltuk megállapítani a halak ivarát. A mintavételhez minden esetben 2-fenoxi-etanolos bódítást alkalmaztunk, minden egyedről fényképet készítettünk, majd az ivari marker vizsgálatához az előzővel megegyező módon vettünk mintát ezen halakból is. A tenyészállományok esetében minden egyed

tározható volt mindegyik egyed ivara. Ezután a marker megbízhatóságának ellenőrzésére mindegyik egyed elvégeztük a korábban leírt PCR reakciót. A hím ivarhoz kapcsolt marker 750 bp mérettartományban jelent meg a tejesek esetében, míg az ikrásoknál nem kaptunk fragmentet (2. ábra).

2. ábra: Az sdY PCR eredménye tejesek és ikrások sebes pisztráng esetében 100 bázispáros molekulásúly markerhez viszonyítva



TUDOMÁNY

2. táblázat: Piaci méretű, ivarérett, boncolt sebes pisztráng egyedek ivarának megoszlása a belső ivarszervek vizsgálata és az sdY ivari marker alapján

Belső ivarszerv vizsgálata		sdY PCR alapján	
ikrás	46 db	ikrás	46 db
tejes	14 db	tejes	14 db
100 százalékos egyezés a két vizsgálat alapján			

A vizsgálatok száz százalékos egyezést mutattak a szöveti vizsgálatok eredményével (2. táblázat), ami bizonyítja a gén ivari markerként való alkalmazhatóságát.

Ezek alapján folytattuk a PCR vizsgálatokat a tenyészállományok egyedeivel, majd összehasonlítottuk a morfológiai bélyegek alapján megállapított ivarmegoszlást az ivari markerrel végzett PCR eredményeivel.

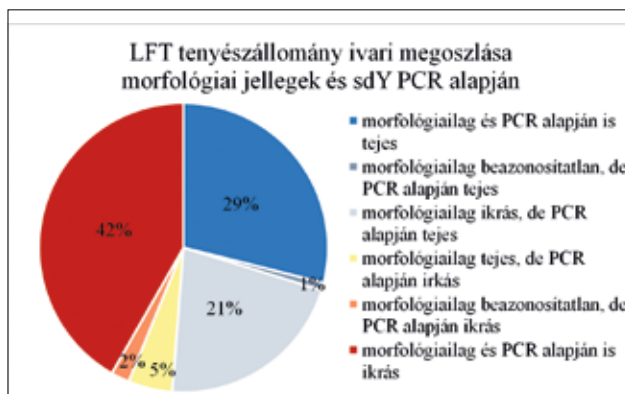
SEBES PISZTRÁNG TENYÉSZÁLLOMÁNYOK VIZSGÁLATA

A nagyobb tenyészállományból (LFT) származó 242 mintából morfológiai bélyegek alapján 82 halat tejesként és 153-at ikrásként azonosítottunk, és csak 7 egyedről nem tudtuk eldönteni az ivarát. Az sdY PCR-t elvégezve a 235 morfológiailag azonosított egyed közül 171 darab esetében kaptuk ugyanazt az ivari eredményt, ami az összes egyedre vetítve 73%-os egyezést jelent. 12 morfológiailag tejesnek és 52 morfológiailag ikrásnak vélt egyed esetében kaptunk eltérő eredményt az ivari marker vizsgálata során, tehát ebben az esetben a tejes egyedeket sikerült jobban beazonosítani a fenotípusos bélyegek alapján. A 7 előre nem meghatározható ivarú minta közül 2 bizonyult tejesnek és 5 ikrásnak a PCR reakció eredményei alapján. Az sdY ivari marker

3. táblázat: Az LFT sebespisztráng-állomány morfológiai és ivari markeres vizsgálata során kapott ivararányok és az analízisek egyezősége

Morfológiai bélyegek alapján		sdY PCR alapján	
ikrás	153 db	ikrás	118 db
tejes	82 db	tejes	124 db
nem beazonosítható	7 db		
Egyezés ikrásoknál: 66 %			
Egyezés tejeseknél: 86 %			
73 százalékos egyezés a két vizsgálat alapján			

vizsgálata alapján az LFT állományban az 124 tejes és 118 ikrás egyed található, így 51:49 százalékos ivararány figyelhető meg (1. és 3. táblázat, 3. ábra).



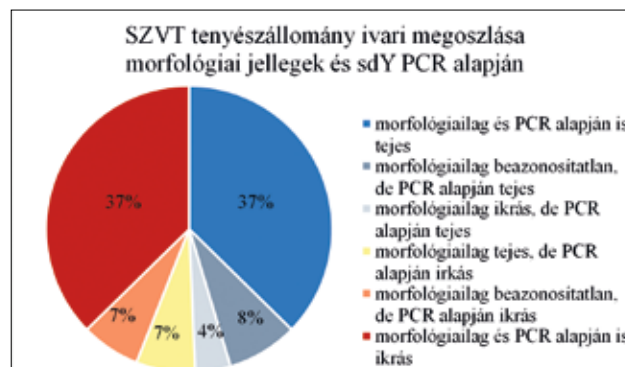
3. ábra: Az LFT sebespisztráng-állomány morfológiai és ivari markeres vizsgálata során kapott ivararányok

A kisebb tenyészállomány (SZVT) 75 mintájából, 64 hal ivarát sikerült meghatározni morfológiai bélyegek alapján, melyek közül 31 ikrás és 31 tejes egyed azonosítottunk, és 11 egyed nem sikerült beazonosítanunk. 56 hal esetében kaptuk ugyanazt az ivari eredményt az

4. táblázat: Az SZVT sebespisztráng-állomány morfológiai és ivari markeres vizsgálata során kapott ivararányok és az analízisek egyezősége

Morfológiai bélyegek alapján		sdY PCR alapján	
ikrás	31 db	ikrás	38 db
tejes	33 db	tejes	37 db
nem beazonosítható	11 db		
Egyezés ikrásoknál: 90 %			
Egyezés tejeseknél: 85 %			
87 százalékos egyezés a két vizsgálat alapján			

sdY PCR reakcióval és a morfológiai meghatározással, ez megközelítőleg 87%-os egyezést jelent. Ebben az esetben a fenotípusosan ikrások esetében 3, míg a fenotípusosan tejesek közt 5 esetben kaptunk eltérő eredményt. A 11 előre nem meghatározható egyedből, 6 bizonyult tejesnek, 5 pedig ikrásnak az sdY PCR alapján. Összességében az



4. ábra: Az SZVT sebespisztráng-állomány morfológiai és ivari markeres vizsgálata során kapott ivararányok

SZVT állományban 37 tejes, 38 ikrás egyed fordult elő az ivari marker vizsgálata alapján, ami 49:51 százalékos ivararányt jelent (1. és 4. táblázat, 4. ábra).

**TERMÉSZETES VÍZI SEBES
PISZTRÁNG ÁLLOMÁNYOK IVARI
MARKERES VIZSGÁLATA**

A természetes populációk ivari markeres vizsgálata során igen nagy szórást kaptunk az ivararányok tekintetében. A KE patakot leszámítva minden esetben a tejes egyedek túlsúlyát kaptuk (56-78 %) az ikrásokkal szemben (22-44 %) (1. táblázat).

**EREDMÉNYEK
ÉRTÉKELÉSE**

A boncolt minták esetében az ivarszervek vizsgálatának eredményei teljesen megegyeztek az ivari markeres vizsgálatokkal, így az általunk elvégzett munkálatok alátámasztják az sdY gén ivari markerként való használhatóságát a magyar sebes pisztráng állományok esetében is. A marker hasznos eszköz a morfológiailag teljes biztonsággal nem meghatározható ivarú sebes pisztráng egyedek vizsgálatához. Az általunk használt sdY marker segítségével már fiatal korban, elméletileg akár a megtermékenyítést követően is meg lehet állapítani az egyedek ivarát azonban az egyedek ebben a korban még nem jelölhetők meg egyedileg, így a módszert a csak később, növedék korban, vagy anyaválogatáskor célszerű alkalmazni.

A növedék populációk szexálásával fel lehet állítani a megfelelő arányt (szükség esetén növelhető a tejesek aránya, mivel párzási időszakban a hímek közötti agresszivitás miatt megnövekedhet az elhullás) és el lehet kerülni a többlet költséggel járó egyedek gondozását.

Az általunk vizsgált tenyészállományokban a természetes várható ivararányokat találtunk, azaz a tejesek és ikrások aránya 50-50 százalék körül mozgott, ami a tenyésztők hozzáértésére utal. A természetes populációkban többségében a tejesek túlsúlyát kaptuk, ami eredhet az alacsony mintaszámokból, de esetleg utalhat a közelmúltban végzett telepítésekre, vagy az ivar arányt befolyásoló szelektív környezeti hatásokra is.

Ezen markergén használatát érdemes a továbbiakban is kutatni, esetleg gyorsabb és hatékonyabb kimutatási eljárást (gyorstesztet) kifejleszteni. A sebes pisztráng állományokon belül is érdemes még több egyednél megvizsgálni, és különböző környezeti hatások, esetleg szennyező anyagok, illetve környezeti hatások ivar kialakulásra gyakorolt hatását vizsgálni.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

A kutatást az OTKA K-105393, TÉT_15-1-2016-0008 és a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - 11476-4/2016/FEKUT projektek támogatták. Köszönetet szeretnénk mondani a Hoitsy & Rieger Kft-nek és Sáfrány Pisztráng-tenyésztés és Halfüstölde Bt-nek az együttműködésért,

illetve Horváth Jenőnek, Palkó Csabának és az Órségi Nemzeti Parknak, Dr. Nagy Lajosnak, Zábrák Károlynak és a Balaton-felvidéki Nemzeti Parknak, valamint Dr. Tóth Balázsnak és a Duna-Ipoly Nemzeti Parknak a természetes vizek mintázásában nyújtott segítségükért.

IRODALOMJEGYZÉK

Berta, P., Hawkins, J.B., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., Fellous, M., 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450. doi:10.1038/348448A0

Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. doi:10.1016/S0044-8486(02)00057-1

FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations. doi:92-5-105177-1

FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012, Food and Agriculture Organization of the United Nations. doi:10.5860/CHOICE.50-5350

Hoitsy, Gy., 2002: A pisztráng tenyésztése és horgászata. Magánkiadás, Lillafüred

Horváth, L., 2000: Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest

Li, J., Phillips, R.B., Harwood, A.S., Koop, B.F., Davidson, W.S., 2011. Identification of the sex chromosomes of brown trout (*Salmo trutta*) and their comparison with the corresponding chromosomes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetic and Genome Research* 133, 25–33. doi:10.1159/000323410

Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., Orban, L., 2012. Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034397

Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., Guiguen, Y., 2012. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology* 22, 1423–1428. doi:10.1016/j.cub.2012.05.045

Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., Guiguen, Y., 2013. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications* 6, 486–496. doi:10.1111/eva.12032

A pontysperma mélyhűtés módszertani fejlesztése

Bernáth Gergely^{1*}, Daniel Źarski^{1,2}, Kása Eszter¹, Staszny Ádám¹, Várkonyi Levente¹, Kollár Tímea¹, Hegyi Árpád¹, Bokor Zoltán¹, Urbányi Béla¹, Horváth Ákos¹

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter K. u. 1.

²UR AFPA, Université de Lorraine-INRA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ÖSSZEFOGLALÁS

SUMMARY

Kutatásunk során a pontysperma mélyhűtést befolyásoló paraméterek (ekvilibrációs idő, mélyhűtési módszerek, hígítók, hígítási arányok, aktiváló oldatok, mozgási időtartam, felolvasztás utáni tárolhatóság) vizsgálatát hajtottuk végre. A kidolgozott módszert teszteltük nagymennyiségű sperma mélyhűtése során egy programozható mélyhűtő berendezés alkalmazásával. A vizsgálatokban motilitás méréseket és termékenyítési tesztet végeztünk. A hígítás és felolvasztás után mért progresszív motilitás (pMOT), sebesség (VCL) és egyenesség (STR) értékek nem csökkentek szignifikánsan az 60 perc ekvilibrációs idő hatására. Hasonló motilitás értékeket rögzítettünk a hűtődoboz és a fagyasztó berendezés segítségével mélyhűtött sperma esetében. Szignifikánsan magasabb pMOT és VCL értékek voltak megfigyelhetőek pér hígítóval, mint a HBSS-sel és a szeminális folyadékkal. A legmagasabb felolvasztás utáni pMOT és VCL a pér hígító esetében 1:9 (pMOT: 52±12%, VCL: 76±9µm/s) és 1:20 (pMOT: 49±8%, VCL: 76±6µm/s) hígítás mellett volt megfigyelhető. A ponty aktiválóval kezelt csoportokban még 120 másodperc elteltével is mértünk aktív mozgást. A mélyhűtött pontysperma pMOT, VCL, STR értékei nem csökkentek 1, illetve 6 órás felolvasztás utáni tárolás során. A nagymennyiségű műszalma mélyhűtése során a termékenyítés szempontjából ideális pMOT (47±5%) VCL (62±9 µm/s) és STR (91±1%) értékeket rögzítettünk. A fagyasztott sperma esetében 32±6%-os termékenyülést tapasztaltunk.

Basic parameters of carp sperm cryopreservation were standardized using a controlled-rate freezer. The effect of different equilibration times, cryopreservation methods, extenders, dilution ratios, activating solutions on the post-thaw motility of common carp sperm was investigated. The suitable post-thaw storage time-interval as well as fertilizing capacity of cryopreserved sperm were also examined. The pMOT, VCL and STR values did not decrease significantly during 60 minutes of equilibration both in prediluted and thawed groups. A significantly higher pMOT and VCL were measured in thawed sperm cryopreserved with grayling extender compared to Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and seminal fluid. The highest pMOT and VCL were measured with grayling extender at a ratio 1:9 (pMOT: 52±12%, VCL: 76±9 µm/s) and 1:20 (pMOT: 49±8%, VCL: 76±6 µm/s). Using cyprinid activating solution, thawed sperm could move still at 120 seconds following activation. Six hours storage time did not have a significant effect on the motility parameters of thawed carp sperm. Agglutination was observed during cryopreservation of elevated volume of milt. Optimal pMOT (47±5%), VCL (62±9 µm/s) and STR (91±1%) were measured after thawing. A fertilization rate of 32±6% was observed with thawed sperm.

IMPROVEMENT OF COMMON CARP (CYPRINUS CARPIO) SPERM CRYOPRESERVATION

BEVEZETÉS

Gergely Bernáth^{1*}, Daniel Źarski^{1,2}, Eszter Kása¹, Ádám Staszny¹, Levente Várkonyi¹, Tímea Kollár¹, Árpád Hegyi¹, Zoltán Bokor¹, Béla Urbányi¹, Ákos Horváth¹

A ponty nagy múltú keltetőházi szaporításával párhuzamosan (Horváth et al. 1992) már évtizedek óta jelentős figyelem összpontosult a spermájának vizsgálatára és mélyhűtésére, amit nagyszámú irodalmi adat igazol. Billard et al. (1995b) átfogó cikkében részletesen leírták a sperma általános tulajdonságait (pl. szeminális plazma összetétele, átlagos sejtsűrűség), valamint a motilitás (pl. időtartam, energiafelhasználás a mozgás során stb.) és a mesterséges termékenyítés jellemzőit.

¹Department of Aquaculture, Szent István University, Páter Károly u. 1., H-2100 Gödöllő, Hungary

²UR AFPA, Université de Lorraine-INRA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Az első eredményeket a mélyhűtés témájában Moczarski publikálta 1977-ben. A következő évtizedekben a kutatók számba vettek számos paramétert, ami a módszerek eredményességét döntően befolyásolni képes. A különböző módszereket a kisebb-nagyobb sikerrel alkalmazták a sperma fagyasztása során (Kurokura et al. 1984, Horváth et al. 2003, Dzyuba et al. 2013, Bozkurt et al.

2014, Ögretmenatal. 2014). Nagy figyelem szegeződött a sperma mélyhűtése során alkalmazott hígítási arányokra (sperma: hígító+védőanyag). A kutatók széles skálán (1:1-1:9) tesztelték a hígítás hatását (Lahnsteiner et al. 2000, Linhart et al. 2000, Warnecke és Pluta 2003, Horváth et al. 2007, Li et al. 2013). Fontos tényező a sperma optimális hűtési sebessége, melyet hagyományos és modern módszerekkel egyaránt vizsgáltak a ponty esetében. Irawan et al. 2010-ben a műszalmák nitrogén fölötti távolságának (2-6 cm) növelésével, illetve csökkentésével próbálták lassítani és gyorsítani a folyamatot, ilyen módon tesztelve a hűtési folyamatok hatékonyságát. Modernebb eljárás a hűtési sebesség tesztelésére a programozható fagyasztó berendezés használata, amivel a kontrollált környezet miatt egységesebb, pontosabb eredményeket kaphatunk (Babiak et al. 1999, Butler & Pegg 2012). Warnecke & Pluta (2003) alacsony hűtési sebességek (3 és 6 °C/perc) összehasonlítása során alkalmazták hatékonyan a berendezést a pontysperma mélyhűtésére. Irawan et al. (2010) és Linhart et al. (2000) a ponty mélyhűtött spermájának 105 másodpercig tartó mozgását rögzítették. A sperma felolvasztását követően bizonyítást nyert, hogy a spermiumok spontán aktivációja bekövetkezhet, ami ugyanakkor nem befolyásolta negatívan a sejtek termékenyítő képességét (Boryspholets et al. 2009). Kevés irodalmi forrás foglalkozott napjainkig a tej felolvasztás utáni tárolhatóságával ponty esetében. Boryspholets et al. (2009) eredményeik szerint a 10 perces tárolás nem befolyásolta a minták minőségét. A ponty mélyhűtött spermájával végrehajtott termékenyítés számos esetben igen magas termékenyülést eredményezett (Horváth et al. 2003: 74%, Irawan et al. 2010: 74%, Lahnsteiner et al. 2003: 55-60%). Az eljárásokat azonban csak kevés esetben vizsgálták nagy mennyiségű sperma mélyhűtésére (Horváth et al. 2007, Lahnsteiner et al. 2003). A szisztematikus vizsgálatok ellenére mindmáig nem született egységes és minden körülmények között nagy hatásfokkal működő protokoll a pontysperma mélyhűtésére. A módszer alkalmazása nem épült be a faj keltetőházi szaporításának folyamatába.

Kutatásunk során megvizsgáltuk, hogy egyes paraméterek (ekvilibrációs idő, mélyhűtési módszerek, hígítók, hígítási arányok, aktiváló oldatok, mozgási időtartam, felolvasztás utáni tárolás) milyen hatással vannak a felolvasztott pontysperma mozgására. Az általunk fejlesztett módszert tesztelni kívántuk nagy mennyiségű minta során egy nagy kapacitású programozható fagyasztó berendezésben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A halak indukciója, szaporítása és a mintavétel

A vizsgálatainkat Gödöllőn, a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszéken végeztük 2014 és 2015 májusában. A Tanszéken tartott 16 tejes egyedből (átlagos

súly: 0,77-1,9 kg) és 9 ikrás egyedből (2-3,5 kg) álló ponty állományt az Aranyponty Zrt. gödöllői telephelyéről szereztük be. A tejesek spermációját 24-48 órával a tervezett fejés előtt 2,5 mg/ttg kg hipofízis injekcióval indukáltuk. Az ikrásokat a keltetőházi gyakorlatnak megfelelően két adagban oltottuk be (előadag 24 órával a tervezett fejés előtt: 0,4 mg/ttkg (testtömeg-kilogramm), döntőadag 12 órával a fejés előtt: 3,6 mg/ttkg). A porított hormonkészítményt 0,5 ml desztillált vízben oldottuk fel és 1 ml-es injekciós tűbe töltöttük. A halakat a hasúszó tövével oltottuk be. Az ikrásokat az ivaranyúlás bevarrását követően, kontrollált hőmérsékleten tartottuk (22-23 °C). A mintavétel során az egyedeket 2-fenoxi etanollal (99%, 0,4 ml/l) bódítottuk. Az anyákat nedves törölközőre helyeztük és a hasfal masszázásával nyertük ki az ivarterméket. A tejet minden esetben 4 °C-on, az ikrát keltetőházi körülmények között tároltuk (változó hőmérséklet).

A friss és mélyhűtött sperma motilitásának vizsgálata

A pontysperma motilitás paramétereit [progresszív motilitás (pMOT), sebesség (curvilinear velocity-VCL), mozgás egyenessége (straightness - STR), Computer-aided Sperm Analysis 2010] közvetlenül a fejés után (kontroll csoport), valamint mélyhűtés és felolvasztás után egyaránt megmértük. A vizsgálatokat számítógépes spermavizsgáló berendezéssel végeztük (CASA, Computer-assisted Sperm Analysis, SpermVision™ v. 3.7.4., Minitube of America, VentureCourt Verona, USA). A sperma aktiválása során a kísérlettől függően desztillált vizet (Dv) vagy a pontyfélékre kifejlesztett aktiváló oldatot (45 mMNaCl, 5 mMKCl, 30 mMTris, pH 8) alkalmaztunk Saad et al. (1988) nyomán.

A sperma mélyhűtése és felolvasztása

A pontysperma mélyhűtése során a frissen lefejt mintákat a kísérlettől függően különböző összetételű hígítókkal és védőanyagként 10 % metanollal kevertük össze.

A vizsgálatok során használt hígítók:

1. Pér hígító [Ph]: 200 mM glükóz, 40 mMKCl, 30 mMTris, pH 8,0 (Horváth et al. 2012).
2. Módosított pér hígító [MPH]: 100 mM glükóz, 100 mMKCl, 30 mMTris, pH 8,0.
3. Ponty szemínális folyadék (Szf): pontysperma centrifugálva 20817 g-n, 5 percen keresztül, 4 °C-on (Eppendorf 5810R, Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Németország).
4. Hanks-féle sóoldat (HBSS, 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,19 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g Na_2HPO_4 , 0,06 g KH_2PO_4 , 0,35 g NaHCO_3 , 1 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 0,01 PhenolRed Na, pH 7,5 (Sigma-Aldrich, H9269).

A kísérleti elrendezéstől függően kétféle mélyhűtési eljárást alkalmaztunk. A polisztirol hűtődoboz (folyékony nitrogénnel 3 cm magasan feltöltve) használata során a mintákat egy 3 cm vastag hűtőkereten 3 percig fagyasztottuk, majd a szalmákat a nitrogénbe helyeztük 5 percre (Horváth et al. 2012). A másik eljárás során a spermát egy programozható mélyhűtő berendezésben (CRF, Controlled-rate freezer, IceCube 14s, IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf, Ausztria) fagyasztottuk le (kiindulási hőmérséklet: 7,5 °C, végpont: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc) (Bernáth et al. 2015). A műszalmákat 10 l-es (Bio 20, Statebourne Cryogenincs, Egyesült Királyság) vagy 35 l-es (VWR XSS 48/10, VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) úgynevezett kanniszteres kannában tároltuk. A mintákat vízfürdőben (ThermoHaake P5, ThermoElectronCorp, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) olvasztottuk fel 40 °C-on 13 másodpercig (Horváth et al. 2012).

Kísérleti terv

Az ekvilibráció hatásának vizsgálata a friss és felolvasztott sperma motilitására

A mélyhűtést megelőző ekvilibrációs idő vizsgálata során 6 tejestől lefejt mintát egyedileg kevertük össze pér hígítóval és védőanyaggal 1:9 arányban. Az előhígított mintákat 0, 30 és 60 perccel az összekeverés után polisztirol hűtődoboz segítségével hűtöttük le. Megmértük a minták progresszív motilitását mindhárom időpontban előhígított állapotban, valamint felolvasztás után. A sperma aktivációjához desztillált vizet alkalmaztunk.

Két mélyhűtési módszer összehasonlítása

A két módszer tesztelése során 4 tejes egyedi mintáját kevertük össze pér hígítóval és védőanyaggal 1:9 arányban. Minden egyed mintájából egy-egy műszalmát mélyhűtöttünk le mindkét módszerrel. Felolvasztás után megmértük a két módszerrel mélyhűtött spermaminták progresszív motilitását. Az aktiváció során desztillált vizet használtunk.

Háromféle hűtőmedium vizsgálata a spermamélyhűtés során

Vizsgálatunk során 5 tejes spermáját egyedileg kevertük össze pér hígítóval, szeminális folyadékkal (Szf), Hanks-féle sóoldattal valamint védőanyaggal (HBSS). Minden csoportból egy műszalmát hűtöttünk le programozható mélyhűtő berendezés segítségével. Felolvasztás után megmértük a különböző hígítóban mélyhűtött minták progresszív motilitását. A sperma aktivációját desztillált vízzel végeztük.

Kétféle pér hígító és négyféle hígítási arány vizsgálata spermamélyhűtés során

Vizsgálatunkban 6 tejes spermáját fejtük le, majd összekevertük pér hígítóval, módosított pér hígítóval, valamint védőanyaggal 1:1, 1:5, 1:9, and 1:20 arányban. Minden egyedi mintából programozható mélyhűtő

berendezéssel fagyasztottunk le egy-egy műszalmát. Felolvasztás után desztillált víz felhasználásával megmértük a minták progresszív motilitását.

Felolvasztás utáni mozgási időtartam vizsgálata

A kísérlet során 6 tejes egyedi mintáját hűtöttük le pér hígító, védőanyag valamint 1:9-es hígítási arány felhasználásával programozható mélyhűtő berendezésben. Felolvasztás után megmértük a minták motilitását. Az aktiváció során a desztillált vizet és a pontyféle aktiválót hasonlítottuk össze. Rögzítettük a pillanatnyi motilitást 10, 20, 30, 60, 90, 120 másodperccel az aktiváció után.

A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata egy illetve hat órán keresztül

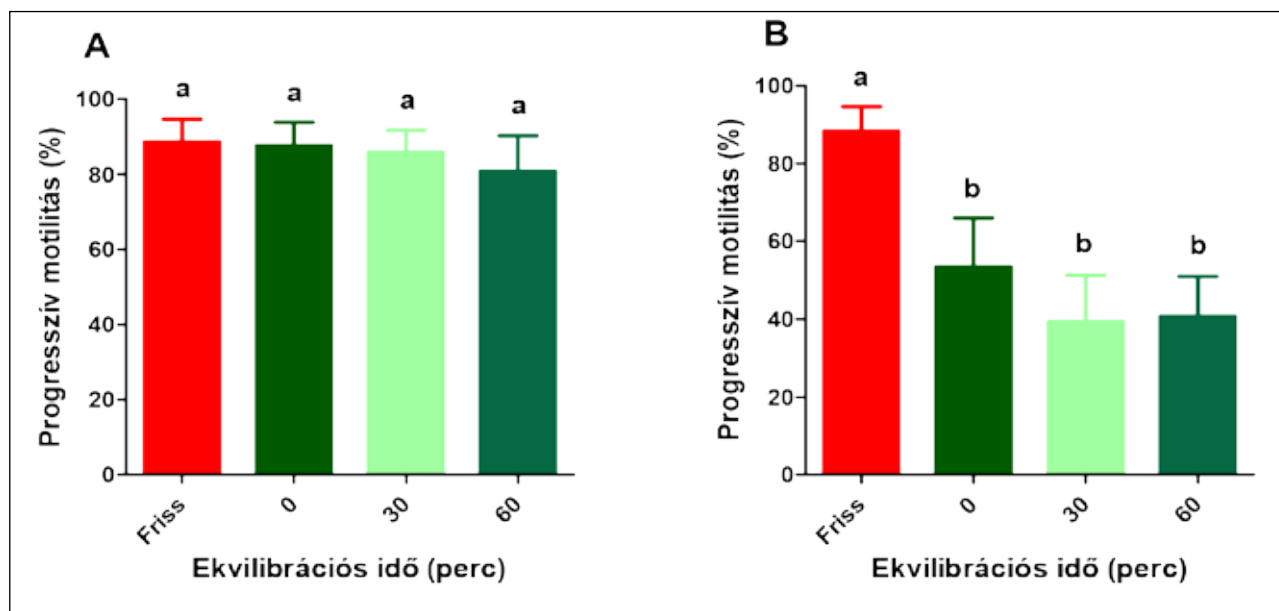
Vizsgálatunkban 6 tejes spermáját mélyhűtöttük CRF segítségével és pér hígító alkalmazásával. A tárolási idő hatásának megfigyelésére minden egyedi mintából külön-külön 1-1 műszalmát olvasztottunk fel. Az 1 óras tárolás során felolvasztás után 0, 15, 30, 45 és 60 perccel rögzítettük a mozgó spermiumok arányát. A 6 óras tárolási idő vizsgálata folyamán megmértük a minták progresszív motilitását a 0., 2., 4. illetve a felolvasztást követő 6. órában. A sejtek aktivációjánál desztillált vizet alkalmaztunk.

Nagymennyiségű pontysperma mélyhűtése és alkalmazása termékenyítés során

Hat tejes spermáját összekevertük 1:9 arányban pér hígítóban, 10% metanol védőanyagot adagoltunk hozzá és mélyhűtöttük CRF-ben. A minták friss motilitás paramétereit az összekeverést megelőzően egyedenként rögzítettük. Összesen 5,2 ml (104 műszalma) spermát fagyasztottunk le. Tíz-tíz műszalmát használtunk fel a termékenyítés teszt és a felolvasztás utáni motilitás vizsgálat során. A termékenyítés és motilitás vizsgálat során pontyféle aktiválót alkalmaztunk. Három oltott ikrás közül egy haltól sikerült ikrát lefejnünk. Kezelési csoportonként 0,2 g ikrát (100-200 ikraszem) termékenyítettünk meg 500 µl felolvasztott (hígított) és 50 µl friss (arányosan a mélyhűtött sperma mennyiségével) kontroll spermával (3 egyedi friss minta). A megtermékenyített ikraszemeket 22-23 °C-on állott csapvízben inkubáltuk és 24 óra elteltével gerinchúros állapotban meghatároztuk a termékenyülés arányát (gerinchúros embrió/összes ikraszem×100). A számlálást sztereomikroszkóppal, szabad szemmel végeztük.

Az adatok statisztikai elemzése

Az eredmények értékelését a Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok), SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Egyesült Államok), GraphPadPrism 5.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, Egyesült Államok), és R for Windows 3.3.1-es (The R Project for Statistical Computing, Copyright: The R foundation for Statistical Computing) felhasználásával végeztük. A kapott értékek normális eloszlását Kolmogorov-



1. ábra. Az sperma ekvilibrációs idejének vizsgálata során mért kihígított (A) és felolvasztott (B) pMOT értékek ponty fajban ($N=6$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($P \leq 0,05$).

Progressive motility of diluted (A) and thawed sperm (B) measured at various equilibration times ($N=6$). The graphs represent mean and SD (standard deviation) values.

Different letters indicate significant difference between groups ($P \leq 0,05$).

Smirnov- és Shapiro-Wilk-próbákkal ellenőriztük (szignifikancia szint: $P \leq 0,05$). A kezelési csoportok közötti különbségek bizonyítására egytényezős és kéttényezős varianciaanalízist (ANOVA), Kruskal-Wallis, Welch és Mann Whitney tesztek, valamint Tukey, Dunn, Dunnett T3, illetve Bonferroni post-hoc tesztek alkalmaztunk (szignifikancia szint: $P \leq 0,05$).

EREDMÉNYEK

A felolvasztott sperma pér és módosított pér hígító használatakor minden esetben 1:1 arányban agglutinált spermát (zselés képletet) és sejtszuspenziót tartalmazott.

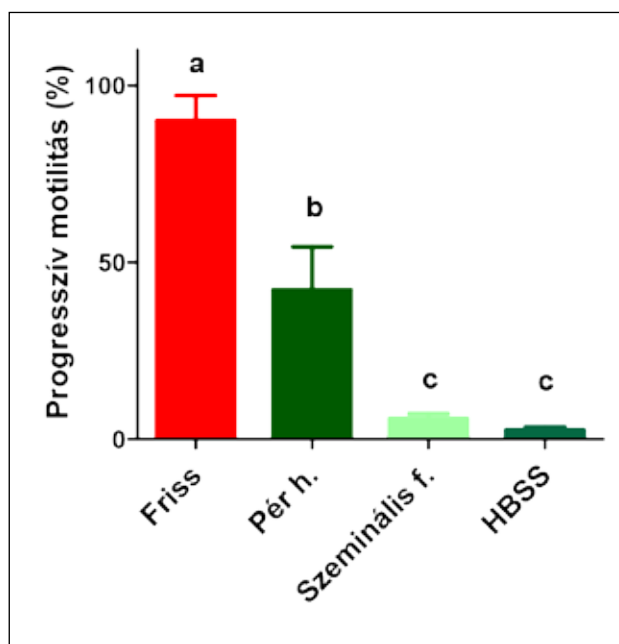
Ekvilibráció hatása a friss- és felolvasztott sperma motilitására

A kihígítás és felolvasztás után mért pMOT, VCL és STR értékek nem csökkentek szignifikánsan az ekvilibráció hatására. A mélyhűtés hatására a pMOT és a VCL szignifikánsan csökkent mindhárom csoportban (kontroll: pMOT: $88 \pm 6\%$, VCL: $126 \pm 22 \mu\text{m/s}$, mélyhűtött: pMOT 0 perc: $53 \pm 13\%$, 30 perc: $39 \pm 12\%$ 60 perc: $41 \pm 10\%$, VCL 0 perc: $63 \pm 10 \mu\text{m/s}$, 30 perc: $53 \pm 8 \mu\text{m/s}$, 60 perc: $51 \pm 6 \mu\text{m/s}$) (1. A és B. ábra).

Két mélyhűtési módszer összehasonlítása

Hasonló motilitás értékeket rögzítettünk a kétféle módszerrel lefagyasztott sperma esetében [doboz: pMOT ($33 \pm 16\%$) VCL ($47 \pm 5 \mu\text{m/s}$) és STR ($88 \pm 2\%$), CRF: pMOT ($32 \pm 13\%$) VCL ($54 \pm 10 \mu\text{m/s}$) és STR ($89 \pm 1\%$)].

Három különböző hűtőmedium tesztelése a spermamélyhűtés során

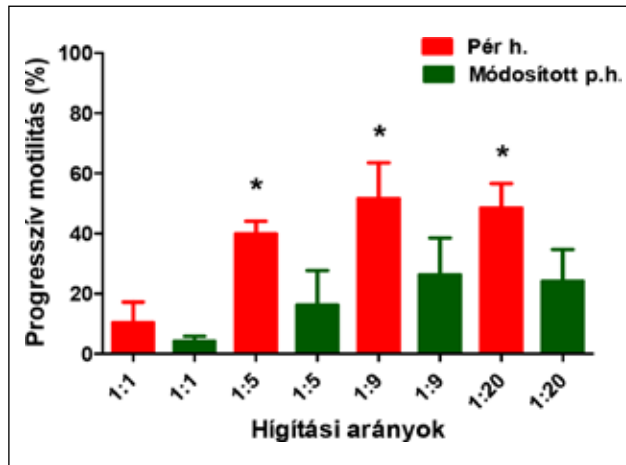


2. ábra. Különböző hígítók ($N=5$) összehasonlítása során mért pMOT értékek ponty fajban. Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($P \leq 0,05$).

Progressive motility measured using 3 different extenders ($N=5$). The graph represents mean and SD (standard deviation) values.

Different letters indicate significant difference between groups ($P \leq 0,05$).

Szignifikánsan magasabb pMOT ($42 \pm 12\%$) és VCL ($69 \pm 4 \mu\text{m/s}$) értékek voltak megfigyelhetők pér hígító használatakor, mint Szf (pMOT: $6 \pm 2\%$, VCL: $37 \pm 7 \mu\text{m/s}$) és HBSS (pMOT: $3 \pm 1\%$, VCL: $32 \pm 9 \mu\text{m/s}$) esetében. A mélyhűtés hatására mindhárom fagyasztott csoportban



3. ábra. Két eltérő hígító és négy különböző spermahígítási arány alkalmazása során mért felolvasztás utáni pMOT értékek ponty fajban ($N=5$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*“-gal jelölt hígító csoportok adott hígítási arányon belül szignifikánsan különböznek ($P \leq 0,05$).

Progressive motility measured using 2 different grayling extenders and 4 dilution ratios ($N=5$). The graph represents mean and SD (standard deviation) values. Columns of extender marked with asterisks at a ratio are significantly higher at $P < 0,05$.

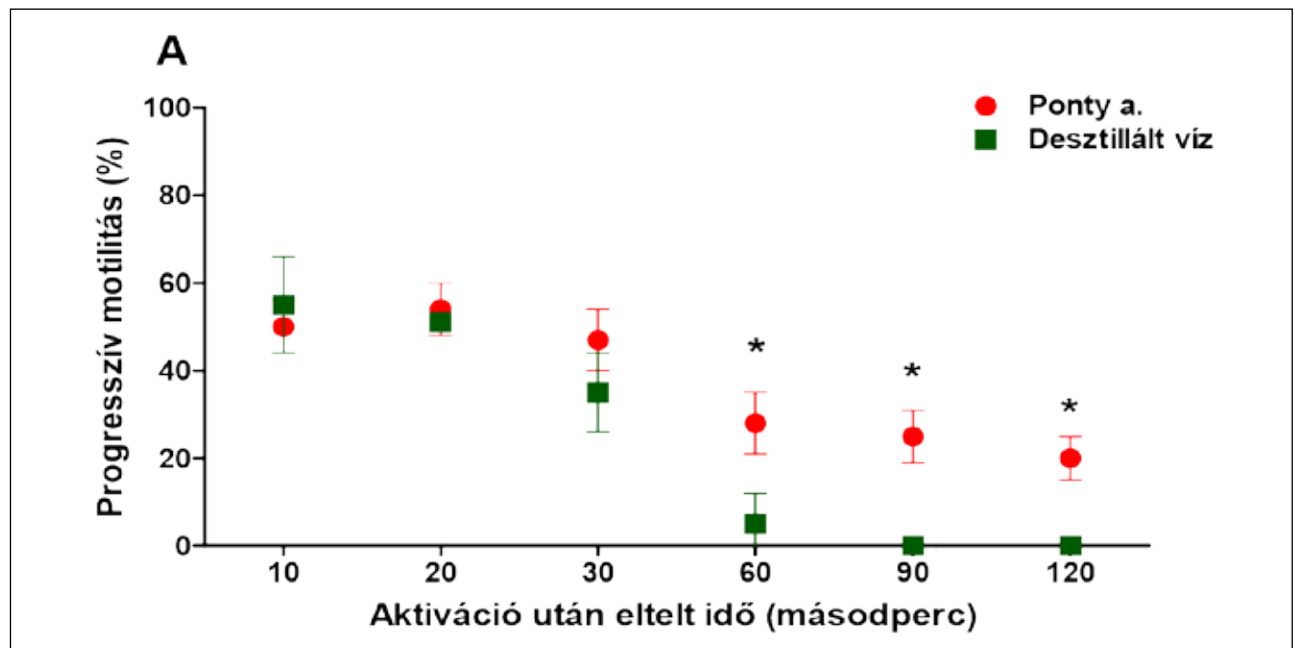
szignifikánsan alacsonyabb pMOT és VCL értékeket rögzítettünk, mint a kontrollban (pMOT: $90 \pm 7\%$, VCL: $147 \pm 13 \mu\text{m/s}$). Az STR értékek növekedtek a fagyasztás hatására (2. ábra).

Két eltérő összetételű pér hígító és négy különböző hígítási arány tesztelése spermamélyhűtés során

A legmagasabb felolvasztás utáni pMOT és VCL a Ph esetében 1:9 (pMOT: $52 \pm 12\%$, VCL: $76 \pm 9 \mu\text{m/s}$) és 1:20 (pMOT: $49 \pm 8\%$, VCL: $76 \pm 6 \mu\text{m/s}$) hígítás mellett volt megfigyelhető. A legmagasabb STR értéket a mélyhűtött csoportok között 1:5 hígítási arány alkalmazása során tapasztaltuk. A mélyhűtés hatására mindkét hígító és az összes hígítási arány használatakor szignifikánsan csökkent a pMOT és a VCL a friss kontrollhoz képest. A Ph esetében szignifikánsan magasabb pMOT illetve VCL értékeket mértünk 1:5, 1:9 és 1:20 hígítási arányok mellett, mint MPH használatakor. Az STR értékek nem különböztek szignifikánsan az egyes kísérleti csoportokban, valamint nem csökkentek a fagyasztás hatására (3. ábra).

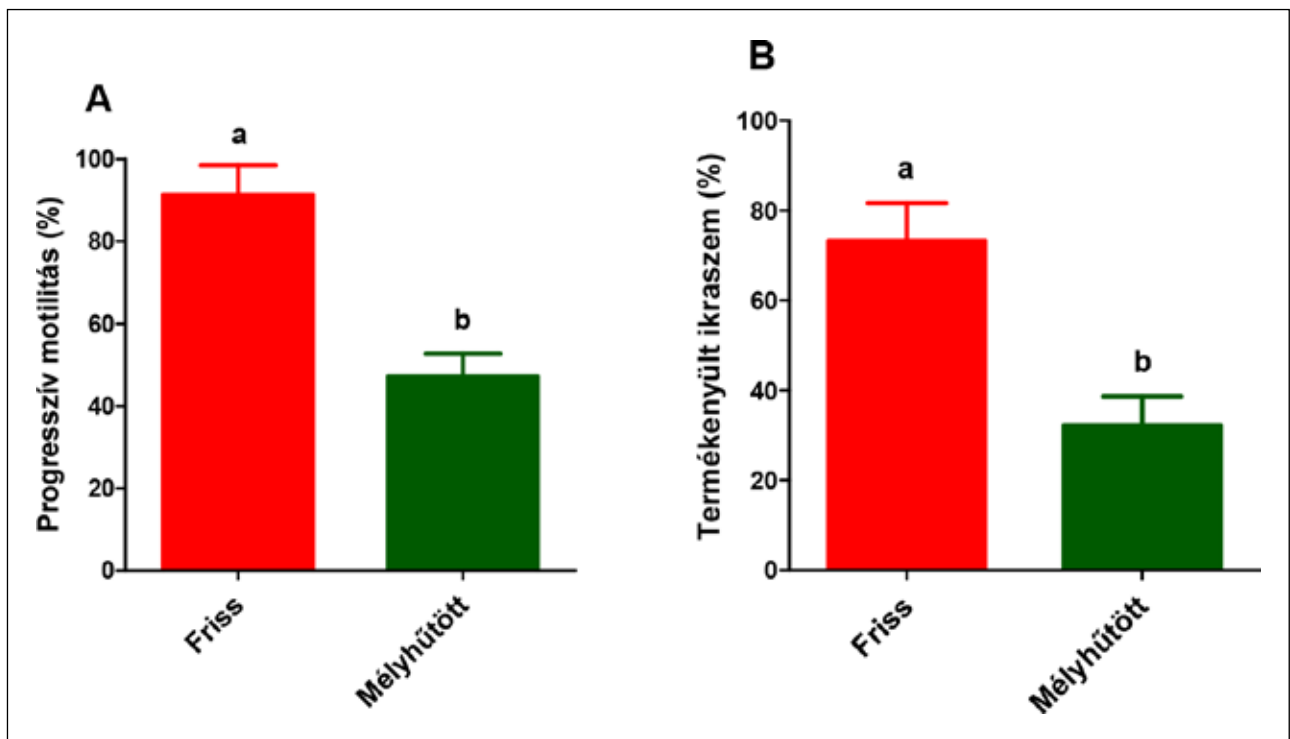
Felolvasztás utáni mozgási időtartam vizsgálata

A vizsgálat során az aktivációt követően 60 másodperc elteltével Pa ($28 \pm 7\%$) és Dv ($5 \pm 7\%$) esetében egyaránt szignifikánsan alacsonyabb pMOT értékeket rögzítettünk, mint 10 másodpercnél (Pa: $50 \pm 6\%$, Dv: $55 \pm 11\%$). A VCL értékek szignifikáns csökkenése Pa esetében 60 másodperc után ($40 \pm 13 \mu\text{m/s}$), Dv esetében már 20 másodperc után ($52 \pm 9 \mu\text{m/s}$) bekövetkezett (10 mp: Pa: $71 \pm 8 \mu\text{m/s}$, Dv: $75 \pm 7 \mu\text{m/s}$). Az STR Pa esetében nem



4. ábra. Két eltérő aktiváló oldat és a sperma felolvasztás utáni mozgás időtartamának tesztelése során mért pMOT értékek ponty fajban ($N=6$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A „*“-gal jelölt időpontokban az egyes aktiváló oldatokhoz tartozó motilitás értékek szignifikánsan különböznek ($P \leq 0,05$).

The pMOT of cryopreserved sperm activated using 2 different activating solution and the longevity of the movement (investigated for up to 120 seconds, $N=6$). The graph represents mean and SD (standard deviation) values. Activator at given activation time marked with asterisks is significantly higher at $P < 0,05$.



5. ábra. Nagy mennyiségű műszalma mélyhűtése során mért pMOT (A), termékenyülés (B), értékek ponty fajban ($N=6$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók. A különböző betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($P \leq 0,05$).

The pMOT(A) and fertilization rate (B) obtained with commercial-scale cryopreserved sperm ($N=6$). The graphs represent mean and SD (standard deviation) values. Different letters indicate significant difference between groups ($P \leq 0.05$).

csökkent 120 másodperccel az aktivációt követően, Dv használatakor 120 másodperc után tapasztaltunk szignifikáns csökkenést. A ponty aktiváló alkalmazása során szignifikánsan magasabb értékeket mértünk pMOT és VCL esetében az aktivációt követő 60 másodperc, STR esetében 90 másodperc elteltével, mint desztillált vízzel. (4. ábra).

A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata egy, illetve hat órán keresztül

A mélyhűtött pontysperma pMOT, VCL, STR értékei nem csökkentek 1, illetve 6 órás felolvasztás utáni tárolás során. Közvetlenül a felolvasztás után a pMOT és VCL értékek szignifikánsan csökkentek a kontrollhoz viszonyítva.

Nagy mennyiségű pontysperma mélyhűtése és a mélyhűtött sperma alkalmazása termékenyítés során

A nagy mennyiségű műszalma mélyhűtése során a termékenyítés szempontjából ideális pMOT ($47 \pm 5\%$) VCL ($62 \pm 9 \mu\text{m/s}$) és STR ($91 \pm 1\%$) értékeket rögzítettünk. A pMOT és VCL értékek a mélyhűtés hatására szignifikánsan csökkentek (kontroll: pMOT: $91 \pm 7\%$, VCL $129 \pm 37 \mu\text{m/s}$, STR: $83 \pm 5\%$). A fagyasztott sperma esetében $32 \pm 6\%$ -os termékenyülést tapasztaltunk. A termékenyülés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoport termékenyülési százaléka ($73 \pm 8\%$) (5. ábra).

Eredmények értékelése

A pontysperma mélyhűtés előtti és felolvasztás utáni motilitási paramétereire nem volt hatással az ekvilibrációs idő. Lahnsteiner et al. (2000) szintén egy pontyféle, az állas kűsz (*Chalcalburnus chalcoides*) spermáján vizsgálta az ekvilibrációs idő mélyhűtött spermára kifejtett hatását. Tíz perces, 4°C -on és 15°C -on történő ekvilibráció szignifikáns csökkenést eredményezett a felolvasztás utáni motilitásban. A szívárványos pisztráng fajban (*Oncorhynchus mykiss*) tesztelt 1 és 60 perces ekvilibrációs idők negatív hatása volt megfigyelhető különböző koncentrációkban alkalmazott DMSO alkalmazása során, a felolvasztott sperma termékenyítő-képességére nézve (Stoss and Holtz, 1983). Babiak et al. (2001) vizsgálatukban a 10 perces ekvilibrációs idő negatív hatását írták le a szívárványos pisztrágnál. A mélyhűtés sikerességének csökkenése azonban összefüggést mutatott a védőanyag típusával. A dimetil-acetamidnál nem, míg a DMSO és etilénlikol esetében mérhető volt a káros hatás. A fent említett irodalmi adatokkal szemben vizsgálatainkban a pontysperma ellenállt a kihígítás okozta ozmotikus stressznek Mazur (1977). A metanol, mint védőanyag, nem volt toxikus a sejtek számára az ekvilibráció során (Cloud & Patton 2009). Az egy órás tárolási idő, a sügérhez hasonlóan, elegendő lehet a

műszalmák tömeges megtöltésére, ezzel is lehetővé téve a pontysperma nagy mennyiségű mélyhűtését.

A pontysperma esetében bebizonyosodott, hogy a gyors fagyasztás (56 °C/perc), valamint az egy lépcsős fagyasztási eljárás magas felolvasztás utáni motilitást eredményez. Az irodalmi adatok korábban főként kétlépcsős, relatíve lassabb hűtési módszerek sikeres alkalmazásáról számoltak be. Cognie et al. (1989) 5 °C/perc-et eredményesen használták (2 °C-tól -7 °C-ig) és 25 °C/perc (-7 °C-tól -70 °C-ig; 25 °C/perc) a pontysperma esetében. Magyary et al. 1996-ban szintén kétlépcsős (lassú) módszert alkalmazták sikeresen (0 °C-tól -4 °C-ig: 4 °C/perc és -4 °C-tól -80 °C-ig: 11 °C/perc). Linhart et al. (2000) hasonló hűtési programot (4 °C-tól -9 °C-ig: 4 °C/perc, -9 °C-tól -80 °C-ig: 11 °C/perc, végül tárolás -80 °C-on 6 percig és áthelyezés folyékony nitrogénbe) alkalmazva a fagyasztást sikeresen végezték el egy dél-csehországi pontytörzs esetében. Warnecke & Pluta (2003) kutatásukban 3 különböző módszert használtak. Két módszerben három hűtési lépcsőt (1. 2-től -7 °C-ig, 2. -7-től -30 °C-ig, 3. -30-tól -80 °C-ig, áthelyezés folyékony nitrogénbe) és lassú átlagos sebességet (3 és 6 °C/perc) állítottak be. Ezzel szemben a harmadik eljárásnál (a korábbiakkal ellentétben) egy lépésben (2-től -50 °C-ig) végezték el a mélyhűtést 10/perces (gyorsabb) sebességgel. Az eredmények azt mutatták, hogy a gyorsabb sebesség (6 illetve 10 °C/perc) eredményesebbnek bizonyult. Kísérletünkben a lefejt tej ellenállt a mélyhűtés okozta stressznek (Denniston et al. 2000) az egylépcsős, gyors fagyasztás során. A kísérlet -ismereteink szerint - első ízben bizonyítja, hogy a pontysperma eredményesen hűthető egy korábban még nem alkalmazott hűtési sebességgel (56 °C/perc).

Horváth et al. 2003-ban közölt munkájukban a cukortartalom fontosságáról számoltak be. Eredményeik alapján háromféle, eltérő glükóz tartalmú hígítót hasonlítottunk össze. Az irodalmi adatoknak megfelelően és az általunk leírt összetétel alapján, a pér hígító (glükóz 36,04 g/l, Horváth et al. 2012) eredményesebbnek bizonyult a pontysperma mélyhűtése során, mint az alacsony glükóztartalmú HBSS (1g/l, Sigma Aldrich, H9269) és a ponty szemínális folyadék (0,009-0,1 g/l (Gosh, 1985, Kruger et al. 1984). Hasonló tendencia mutatkozott a kétféle összetételű (több és kevesebb glükóz tartalmú) pér hígító összehasonlításánál. A HBSS számos halfaj spermájának mélyhűtésében jól használható, többek között a zebradánió (*Danio rerio*, Yang et al. 2007), kék harcsa (*Ictalurus furcatus*, Hu et al. 2014), csatorna harcsa (*Ictalurus punctatus*, Christensen és Tiersch 1997), óriás laposhal (*Hippoglossus hippoglossus*, Ding et al. 2011), fehér sügér (*Morone chrysops*, Devireddy et al. 2006) és csíkos sügér (*Morone saxatilis*, Thirumala et al. 2006) fajok esetében. A halak szemínális folyadéka fiziológias közegét biztosít a spermiumok számára és immobilizálja azokat a külvilágba (pl. víz) kerülést megelőzően (Alavi

et al. 2007, Billard et al. 1995a). Kutatásunk azonban bizonyította, hogy a pontysperma esetében a mélyhűtésre használt hígító összetételében a glükóz tartalom mellett, annak mennyisége szintén nagy jelentőséggel bír.

Eredményeink alapján a pontyspermát 1:5, 1:9 és 1:20 hígításban ajánlott a magasabb glükóz tartalmú pér hígítóban kihígítani a mélyhűtést megelőzően. Lahnsteiner et al. (2003) és Linhart et al. (2000) szintén eredményesen alkalmaztak magasabb hígítási arányt ponty faj esetében (1:5). Munkájukban azt tapasztalták, hogy az 1:7-nél magasabb arány már szignifikánsan alacsonyabb kelést eredményezett az állas küsz (*Chalcalburnus chalcoides*) esetében. A felolvasztott pontysperma spontán aktivációjának kutatása során Dzyuba et al. (2010) a spermát 1:1 aránnyal fagyasztották sikerrel. Horváth et al. (2003) kutatásukban 1:9 hígítással (glükóz hígító) a kontrollhoz hasonló termékenyülés és kelés eredményeket értek el. Vizsgálataink igazolták, hogy a pontysperma fagyasztható magasabb hígítási arányok alkalmazásával is (1:9 és 1:20). A termékenyítés szempontjából azonban az 1:9-ben kihígított, sűrűbb felolvasztott sperma alkalmazása optimálisabb a keltetőházi szaporítás során.

A pontysperma felolvasztás utáni motilitása drasztikusan lecsökkent az aktivációt követő 30 másodperc elteltével, de a csökkenés nem volt azonos mértékű a két eltérő aktiválóban. A minták progresszív motilitása Pa-val két perc elteltével 30% és 20% között volt. Linhart et al. (2000) kutatásukban hasonló eredményt írtak le, a dél-csehországi ponty törzsből származó sperma esetében 120 másodperces motilitás időtartamot mértek. Ögretmen et al. (2014) azonban, a propoliszt különböző mennyiségben tartalmazó hígítók tesztelése során a Pa alkalmazásával, az aktivációt követően csak 39 másodpercig rögzítettek motilitást. A desztillált vizet friss és felolvasztott sperma aktiválására korábban már sikeresen alkalmazták zebradánió (*Danio rerio*) és csuka (*Esox lucius* L.) (Yang et al. 2007, Alavi et al. 2009) fajokban. A pontysperma esetében a termékenyítés során azonban a Pa alkalmazása indokolt, hiszen a hosszabb mozgási időtartam, nagyobb esélyt biztosít a termékenyítésre.

A hatórási felolvasztás utáni tárolás nem volt negatív hatással a pontysperma motilitás értékeire. Boryshpolets et al. (2009) bizonyították, hogy 10 perces tárolás nincs hatással a felolvasztott pontysperma termékenyítő képességére. Kovács et al. (2010) afrikai harcsán (*Clarias gariepinus*) végzett vizsgálatukban a felolvasztott spermát 24 órán keresztül tárolták. A tárolás nem befolyásolta a minták termékenyítő képességét. Esetünkben a pontysperma motilitása magas maradt (a felolvasztást követően) 6 óra elteltével is, ami lehetővé teszi a termékenyítésre való felhasználásának meghosszabbítását.

A pontyspermára általunk optimalizált mélyhűtési módszer ismételtetésének tesztelése során a CRF egy körben, eredményesen mélyhűtött le 104 szalmát. Az

eredményekben optimális átlagos pMOT-ot rögzítettünk, a szalmák közötti alacsony különbséggel. Ez az eredmény a módszer ismételtetését igazolta. A termékenyülésben tapasztalt csökkenés a felolvasztott sperma agglutinációjával állhatott összefüggésben. A tendencia ellentmond a Horváth et al. (2003) vizsgálatukban levont következtetéseknek, amelyek szerint az agglutináció nem befolyásolta a termékenyülést. Állításuk szerint kísérleteikben az összetapadt régióból a spermiumok ki tudtak szabadulni az ikrával való összekeverés során. Vizsgálatunkban azonban az agglutinálódott rész rátapadt az ikraszemekre, ami meggátolhatta azok termékenyülését.

Kutatásunk során egységesítettük a pontysperma mélyhűtésének egyes paramétereit (pér hígító, 1:9 hígítási arány, optimalizált hűtési program (hűtés kezdete: 7,5 °C, hűtés befejezése: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc). A módszert sikeresen teszteltük nagy mennyiségű sperma mélyhűtése során.

Köszönetnyilvánítás

A munka a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - 1476-4/2016/FEKUT, COST Action FA1205 AQUAGAMETE és az Aranypony Zrt. támogatásával jött létre.

Irodalomjegyzék

- 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, 276–283.
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Viveiros, A.T.M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2009. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology* 72, 32–43.
- Babiak, L., Fraser, S., Dobosz, K., Goryczko, H., Kuzminski, Strzezek J., 1999. Computer controlled freezing of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spermatozoa for routine programmes. *Aquaculture Research* 30, (9) 707–710.
- Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J., Demianowicz, W., 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 56, 177–192.
- Billard R, Cosson J, Crim LW, Suquet M., 1995a. Sperm physiology and quality, in: Bromage, N.R., Roberts, R.J., (Eds.), *Brood Stock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, Amsterdam, p. 25–52.
- Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., and Linhart, O., (1995b): *Biology of sperm and artificial reproduction in carp*. In: *Aquaculture*, 129, 95–112. p.
- Bernáth, G., Bokor, Z., Kása, E., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Kollár, T., Urbányi, B., Žarski, D., Radóczy Ifj., J., Horváth, Á., 2015. Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. *Cryobiology* 70, 76–78.
- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Li, P., Hulak, M., Gela, D., Linhart, O., 2009. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology* 59, 291–296.
- Bozkurt, Y., Yavaş, İ., Yıldız, C., 2014. Effect of different avian egg yolk types on fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Aquacult. Int.* 22, 131–139.
- Butler, S., Pegg, D., 2012. Precision in cryopreservation-Equipment and Control, in: Katkov, I., (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology*. InTech, Rijeka, pp. 505–547.
- Cloud J., Patton, S., 2009. Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation, in: Cabrita E., Robles V., Herráez P. (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 237–250.
- Cognie, P.F., Billard, R., Chao, N.H., 1989. La Cryoconservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*. *Journal of Applied Ichthyology* 5, 165–176.
- Computer-aided Sperm Analysis 2010. in: WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, World Health Organization.
- Devireddy, R.V., Campbell, W.T., Buchanan, J.T., Tiersch, T.R., 2006. Freezing response of white bass (*Morone chrysops*) sperm cells. *Cryobiology* 52, 440–445.
- Denniston, S.R., Michelet S., and Godke, A.R., (2000): *Principles of cryopreservation*. 59–74. p. In: Tiersch, R.T., and Mazik, M.P., (Eds.): *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 439. p.
- Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2010. Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze-thawing in different fish species. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 720–725.
- Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Bondarenko, O., Rodina, M., Gela, D., Bondarenko, V., Shaliutina, A., Linhart, O., 2013. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Cryobiology* 66, 192–194.

- Gosh, R.I., 1985. EnergeticeskijObmenPolovych-KletokiEmbrionoy u Ryb.NaukovaDumka, Kiev, 147 pp.
- Horváth, Á., Miskolczi, E., Urbányi, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources* 16, 457–460.
- Horváth, A., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Osz, K., Szabó, K., Urbányi, B., 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology* 54, 251–257.
- Horváth, Á., Jesenšek, D., Csorbai, B., Bokor, Z., Rabóczki, É., Kaczkó, D., Bernáth, G., Hoitsy, G., Urbányi, B., Bajec, S.S., Snoj, A., 2012. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 358–359, 213–215.
- Horváth, L., Tamàs, G., Seagrave, C., 1992. Carp and pond fish culture: including Chinese herbivorous species, pike, tench, zander, wels catfish and goldfish, Fishing news books, London.
- Irawan, H., Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science* 122, 236–243.
- Kovács, É., Müller, T., Márián, T., Krasznai, Z., Urbányi, B., Horváth, Á., 2010. Quality of cryopreserved African catfish sperm following post-thaw storage. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 737–741.
- Kruger, J.C. de W., Smit, G.L., Van Vuren, J.H.J., Ferreira, J.T., 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish. Biol.* 24, 263–272.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37, 267–273.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., Weismann, T., 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 54, 1477–1498.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., 2003. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology* 60, 829–841.
- Li, P., Hulak, M., Li, Z.H., Sulc, M., Psenicka, M., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., 2013. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm induces protein phosphorylation in tyrosine and threonine residues. *Theriogenology* 80, 84–89.
- Linhart, O., Rodina, M., Cosson, J., 2000. Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. *Cryobiology* 41, 241–250.
- Magyary, I., Urbányi, B., Horváth, L., 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *Journal of Applied Ichthyology* 12, 117–119.
- Mazur, P., 1977. Slow-freezing injury in mammalian cells, in: *The Freezing of Mammalian Embryos*. Ciba Foundation Symposium, London, 52, p. 42–49.
- Moczarski, M., 1977. Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. *Bull Acad Pol Sci Biol.* 25 (3), 187–90.
- Saad, A., Billard, R., Theron, M.C., Hollebecq, M.G., 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture* 71, 133–150.
- Stoss, J., Holtz, W., 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture* 32, 321–330.
- Thirumala, S., Campbell, W.T., Vicknair, M.R., Tiersch, T.R., Devireddy, R.V., 2006. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology* 66, 964–973.
- Öğretmen, F., İnanan, B.E., Öztürk, M., 2014. Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Cryobiology* 68, 107–112.
- Warnecke, D., Pluta, H.-J., 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture* 215, 167–185.
- Yang, H., Carmichael, C., Varga, Z.M., Tiersch, T.R., 2007. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology* 68, 128–136.



MASZ
MAGYAR AKVAKULTÚRA SZÖVETSÉG

**„A HALÁSZATI ÁGAZATFEJLESZTÉS
LENDÜLETVÉTELÉÉRT”**

Elnök: Dr. Váradi László

Cím: 5540 Szarvas, Anna-liget 8. • Tel: 06-66/515 405; Fax: 06-66/312 142

E-mail: info@masz.org, weblap: <http://www.masz.org>