



## A halsperma tárolás módszereinek összehasonlítása különös tekintettel a fogassüllőre (*Sander lucioperca*)

HEGEDŰS RÓBERT – SZATHMÁRI LÁSZLÓ – TEMPFLI KÁROLY –  
BALI PAPP ÁGNES

Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,  
Mosonmagyaróvár

### ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők szakirodalmi adatok alapján áttekintik a halsperma tárolásának módjait. A szemlecikkben kiemelt szerepet kapott a két fő tárolási mód: a hűtve tárolás és a folyékony nitrogénben való mélyhűtés értékelése. A kutatók eddigi eredményeit összegyűjtve vizsgáltuk a lényegi változtatásokat az egyes módszerek között. A halsperma mélyhűtés közel 60 éves múltra tekint vissza. Ezen időszakban számos kutató foglalkozott több halfaj spermájának tárolásával, melynek eredményeként több módszer is kidolgozásra került.

**Kulcsszavak:** sperma, mélyhűtés, hűtve tárolás, motilitás.

### A SPERMAMÉLYHŰTÉS ÉS A RÖVID TÁVÚ HŰTVE TÁROLÁS FOLYAMATA

#### *A sperma begyűjtése*

A spermavétel első lépése a tejesek altatás mellett történő hormon kezelése. A spermavételhez legtöbb esetben fecskendőt használnak, néhány esetben viszont az ivarnyílásba helyezett kanül, illetve automata pipetta, szivornya segítségével végzik a fejtést. A megfelelő spermaminta vértől, ürüléktől és víztől mentes kell, hogy legyen. A spermaminta tárolása egy erre alkalmas méretű tároló eszközben (pl: 1,5ml-es eppendorf

cső) történik. *Bokor* (2009) a spermát kézi fejjel gyűjtötte, automata pipettázó segítségével. Későbbi kísérletei során a szennyeződések elkerülése végett a fejes egy ondóvezetékbe helyezett katéter (belső átmérő: 1 mm, külső átmérő 1,5 mm) segítségével történt. *Sarosiek et al.* (2016) a hagyományos és a katéteres fejest hasonlították össze a fogassüllőnél (*Sander lucioperca*). A kísérleteik eredményeként arra a következtetésre jutottak, hogy süllő esetében ajánlott a katéteres fejes, ezzel elkerülhető a sperma szennyeződésével járó minőségromlás.

### ***A natív sperma minősítése***

A natív spermát az alábbi szempontok alapján vizsgálják:

1. az előrehaladó mozgást végző spermiumok aránya (motilitás)
2. az előrehaladó mozgás ideje (sec.)
3. a haladó mozgás intenzitása
4. a sperma mennyisége (ml)
5. a sperma koncentrációja (spermiumszám/ml sperma)
6. a spermiumok morfológiája.

Gyakorlati alkalmazásban az első szempont, a motilitás szerint minősítik a spermát. A sperma motilitását becsléssel, míg a sperma mennyiséget és az előrehaladó mozgást hagyományos mérési módszerekkel határozzák meg. A koncentráció Bürker-kamrában történő sejtszámlálással állapítható meg. Mélyhűtésre minimum 80% motilitású, szennyeződésmentes és nem aktiválódott spermát célszerű használni (*Miskolczi* 2007).

*Kime et al.* (2001) szerint a CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) rendszer egyszerű és gyors módszer a halsperma minősítésére, az eljárás segítségével előre jelezhető a termékenyítő képesség is. A módszert először a humán orvostudományból adaptálták emlősökre, majd halakra. A rendszer a spermiumok mozgását kalkulálja ki a rögzített felvételek alapján és meghatározza a mozgás útját, arányát és más paramétereit (*Fauvel et al.* 2010).

A natív sperma minősítése fontos lépése a mélyhűtésnek és a rövid távú hűtve tárolásnak is.

### **Az ozmózis nyomás és a membrán változás hatása a sperma motilitására**

*Sadiqul Islam és Akhter* (2011) A hipo- vagy hiperozmotikus környezet egyaránt kiválthatja a halsperma motilitását. Az édesvízi halak spermája motilissé válik hipotóniás oldatban hígítva. Az édesvízi Cyprinidae család tagjainak (pl. aranyhal, ponty, domolykó) spermája megőrizte immotilitását, mikor a spermát NaCl, KCl, mannitol vagy glükóz izoozmotikus (a szeminális plazmával egyező, 300 mOsm/kg) oldatban hígították. Ezzel szemben a sperma motilis volt, ha az oldat ozmolalitása kisebb volt, mint a szeminális plazmában (<200 mOsm/kg); ez arra utal, hogy a spermavezetékben a szeminális plazma ozmolalitása gátolja a motilitást, míg a kiváltásában az ozmolalitás csökkenése játszik szerepet a vízbe történő kijutás után. Tengeri halfajoknál a hiperozmotikus tengervíz szintén kiváltja a motilitást. A tengeri gömbhal sperma a szeminális plazmában (300 mOsm/kg körül) nyugalmi állapotban van, míg a motilitás beindul, ha nő az környező oldat ozmolalitása (1200 mOsm/kg). A hiperozmotikus sokk növelheti a  $K^+$  és  $Ca^{2+}$  koncentrációt, és savasodást válthat ki. Valószínűsítik, hogy ezek a változások idézik elő a sperma motilitás aktivizációját. Elevenszülő (belső termékenyítés) halaknál, mint például az édesvízi *Xinophorus* nemzetség és az óceáni *Macrozoarces americanus*, a sperma motilitás kiváltható izotóniás ozmózisviszonyok között, viszont hipotóniás vagy hipertóniás ozmózis mellett nem. A motilitás kiváltása után ezeknél a fajoknál a sperma folyamatosan motilis akár 1 hétig is. Egy euryhaline (a sókoncentrációt széles határok között toleráló) hal, a medaka (*Oryzias latipes*) esetében a sperma motilitását változó ozmózisviszonyok között kiváltották deionizált vízben (25 mOsm/kg) és HBSS-ben (Hanks-féle kiegyensúlyozott sóoldat) hipotóniás, izotóniás és hipertóniás ozmózis mellett 92-től 686 mOsm/kg-ig. Más euryhaline halnál (pl. tilápia) a sperma motilitás aktivációja hasonló, de mérsékeltebb reakciót mutatott. A vizsgált egyedek brakkvízből származtak és édesvízhez (102) vagy tengervízhez szoktatták őket. Az édesvízben akklimatizált tilápia sperma motilitását 0 és 400 mOsm/kg ozmózis mellett sikerült kiváltani elektrolitokkal vagy azok nélkül, továbbá  $Ca^{2+}$ -ra szükség volt az aktiváláshoz. A tengervízhez szoktatott tilápia esetében a sperma aktiválható volt a NaCl 0 és 500 mOsm/kg közötti ozmolalitásánál 10 mM HEPES kiegészítés mellett, és a  $Ca^{2+}$  hozzáadása növelte a motilitást a magas ozmolalitás esetén (1000-1400 mOsm/kg). *Cosson* (2004) kutatásai alapján a tengeri gömbhal sperma hiperozmotikus sokk hatására aktiválódik (1200

mOsm/kg). Ezzel szemben a ponty sperma hipoozmotikus oldatban aktiválódott (200 mOsm/kg alatt). Emellett vannak példák édesvízi halaknál, arra, hogy az izotóniás oldat is hatékonyan kiváltja a motilitást. A csukánál (*Esox lucius*) a sperma izotóniás NaCl (250 mOsmol/kg, pH 9) oldatban motilis, és *Ictalurus punctatus*-nál a sperma 0,65%-os NaCl oldatban volt motilis. Következésképpen a hipotónia nem lehet az egyetlen tényező, amivel magyarázható a motilitás megindulása az édesvízi halaknál.

### **Hűtés és hidegsokk**

Az emlős sperma rosszul viseli a testhőmérsékletéről fagyponthoz közeli hűtést. A hidegsokk felmelegítéssel visszafordíthatatlan károsodásokat okoz a sperma motilitásában. Romlik a sejt membrán szelektív áteresztőképessége, ami különböző festési eljárásokkal kimutatható. A szerkezet tekintetében a hidegsokk leginkább az akroszóma (a sperma feji rész csúcsán) membránok roncsolódásában figyelhető meg. A hőmérsékletcsökkenés fázisváltozást okoz a membrán foszfolipideknél: folyadék-kristályos állapotból gél fázisba, ami merevebb membránszerkezethez vezet. A különböző foszfolipidek eltérő „fázisváltási” hőmérséklete miatt a membrán alkotói átrendeződnek (laterális migráció indul), és a lipidek szeparálódnak a membrán felületén. A változások befolyásolják/módosítják az áteresztő képességet.

A károsító hatások függenek a membrán koleszterin: foszfolipid arányától, a nem-kettősreget preferáló lipidek arányától, a szénhidrogén lánc telítettségétől, és a fehérje: foszfolipid aránytól. Mivel minden faj más spermafélépítéssel rendelkezik, a hűtés hatásai sem általánosíthatók. A sertéskan spermája a legérzékenyebb; a bika, a kos/bak, és a mén spermája nagyon érzékeny; a kutya és macska sperma közepesen érzékeny; míg a nyúl, az ember, és a kakas spermája a legkevésbé érzékeny a hidegsokkra.

A hűtés a testhőmérsékletéről 4 fokra csökkenti a sejtek metabolikus/anyagcsere aktivitását, ezáltal növelheti az élettartamot. Bár a sperma nagyon csekély bioszintetikus aktivitással bír, és a működés során inkább a katabolikus folyamatok játszanak szerepet. A fennmaradó metabolikus aktivitás végül a sejt halálához vezet az elkerülhetetlen öregedési folyamatok miatt. A metabolikus folyamat megállításához a sejteket -130 fok alá kell hűteni, ahol a hővezérelt kémiai reakciók már nem mennek végbe *Medeiros et al.* (2002).

### ***A halsperma rövid távú hűtve tárolása (0°C közeli hőmérsékleten)***

A rövid távú hűtve tárolás esetén a spermamintákat rövid ideig, maximum néhány hétig tárolják. A módszer előnye a kisebb munka- és eszközigénye, mivel csak a sperma tárolására alkalmas eszközre (pl. eppendorf cső) és megfelelő hígító vegyületre van szükség. A minta tárolása hűtőszekrényben 4°C-on történik. *Satterfield* és *Flickinger* (1995) északi süllő (*Sander vitreus*) spermáját 10 napig is tárolták 6°C-on. *Sarosiek et al.* (2013) kísérleteik folyamán bebizonyították sügér esetében, hogy a sperma hígítva és hígítatlanul hűtött körülmények (4°C) között napokig tárolható. *Křišťan et al.* (2014) motilitás vizsgálataik során a süllő spermát 48 óráig tárolták, hígítás nélkül szintén 6°C-on.

### **A RÖVID TÁVÚ TÁROLÁS EREDMÉNYESSÉGÉT LEGINKÁBB BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK BEMUTATÁSA:**

#### ***1. Tárolási hőmérséklet***

A tárolási hőmérséklet a prezerváció alatt a sejttanyagcsere csökkentésében fontos szerepet játszik. 3-15°C közötti rövid idejű tárolás során a 90 és 50%-os termékenyítési arány és a hőmérséklet között ketalazac (*Oncorhynchus keta*) esetében negatív korrelációt állapítottak meg. Az ikra annak ellenére, hogy a tárolás során hamarabb károsodik, a termékenységet később veszítette el a spermához viszonyítva (*Jensen és Alderdice* 1984). Walleye (*Sander vitreus*) esetében a spermát 0°C-on hűtötték négy különböző, módosított hígítóval, amelyek DMSO mellett egyéb adalékokat is tartalmaztak. A felolvasztást 32 illetve 21°C-on végezték. A legnagyobb termékenyítési arány a felengedett sperma esetén 83,2%, míg a frissen nyert spermánál 96,6% volt (*Moore* 1987). Az alig fagyponthoz feletti hőmérséklet vonatkozásában eddig nem számoltak be hidegvízi halfajok ivarsejtjeire gyakorolt káros hatásáról, legalábbis rövid tárolási időszakok esetén. Ennek köszönhetően a rövid idejű tárolás során leggyakrabban 0°C körüli tárolási hőmérsékletet alkalmaznak (*Jamieson* 1991). *Billard* (1981) 4°C-on, O<sub>2</sub>-ben tárolt szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) spermát, amelynek termékenyítő-képessége hasonló volt a friss spermához, és egyes nőivarú halak ikrája esetében 14 nap után is magas termékenyítési arányt figyeltek meg. *Stoss és Refstie* (1983) atlanti lazac (*Salmo salar*) sperma esetében 10 napig tartó termékenyítő-

képességet figyelt meg úgy, hogy a spermát 2 mm rétegben tárolták 0°C-on O<sub>2</sub>-dús légkörben, antibiotikumokkal kiegészítve (125 IU penicillin és 125 µg streptomycin/ml sperma). 24 nap után a minták már nem voltak termékenyítőképesek. Az antibiotikumok nélkül tárolt spermánál 6 nap elteltével 100%-os termékenyítést állapított meg.

*Harvey és Kelley* (1984) kutatásában a meleg vízi fajok esetében az ivarsejtek optimális tárolási hőmérséklete 0°C. Mozambiki tilápiánál (*Sarotherodon mossambicus*) a sperma motilitásában sokkal gyorsabban következett be csökkenés 0°C-os tárolás mellett, mint 5°C esetén, bár a sperma egyszerű tojássárgája-citrát hígítóval való 1:1 arányú keverésével az eltarthatóságot 18 napig sikerült meghosszabbítani.

*Harvey et al.* (1983) kísérletében lazacfélék termékenyítetlen ikráját -1°C-on 20 napig tárolták mesterséges tápoldatokban illetve petefészek-folyadékban. A termékenyülő-képesség az utóbbi esetében maradt fenn hosszabb ideig.

## **2. Tárolási légkör**

Mivel a termékenység függ az aerob anyagcsere-folyamatoktól, a légzéshez használt optimális oxigén-hozzáférés biztosításával az ivarsejtek termékenysége meghosszabbítható a tárolás alatt. *Billard* (1981) szerint az oxigénben tárolt szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) sperma jobban megtartotta termékenyítő-képességét 5 napos tárolás alatt, mint a légköri levegőben tárolt minta. *Stoss és Holtz* (1983) kutatásában tárolókonténerek oxigéntartalmának frissítésével a tárolás idejét 34 napig tudták növelni 0°C-os hőmérsékletnél, penicillin és streptomycin kiegészítés mellett. *Harvey és Kelley* (1984) szerint a tilápia ikratárolás utáni termékenységét 35%-ról 55%-ra növelték azáltal, hogy oxigént juttattak a mintatartályba.

Általánosságban elmondható, hogy a spermánál nagyobb oxigén-igény jelentkezik, mint az ikránál, és szintén nagyobb az oxigén-igény magasabb tárolási hőmérsékleten. (*Jamieson* 1991). *Cloud és Patton* (2009) oxigéndús környezetben a gyűjtött spermát 0-4 °C-on tárolták. A minták szállításánál is a megadott hőmérsékletet és oxigénellátottságot kell biztosítani.

## **3. Antibiotikumok**

*Stoss és Holtz* (1983) szerint az antibiotikumok használata egyaránt fontos hosszú és rövid idejű tárolásnál is, mivel az ivarsejtek vizeletből származó bakteriális és gombás

szennyezése elkerülhetetlen. *Stoss és Refstie* (1983) munkássága alatt az atlanti lazac (*Salmo salar*) sperma fertilitása penicillin és streptomycin kiegészítéssel 24, a nélkül csak 6 napig volt termékenyítésre alkalmas. *Stoss et al.* (1978) szerint az antibiotikumok gátolják a baktériumok fejlődését, ugyanakkor a ml-enként 9000 IU penicillin vagy 9 mg streptomycin káros hatással van a spermiumokra.

*Harvey és Kelley* (1984) Gram-negatív baktériumokat mutattak ki mozambiki tilápia (*Sarotherodon mossambicus*) petesejteknél 19 órás tárolást követően; a baktériumok fejlődését kanamycin-szulfáttal sikerült meggátolni. *Moore* (1987) sikeresen tárolt walleye (*Sander vitreus*) spermát ampicillin felhasználásával. A leszívással gyűjtött spermát ampicillint tartalmazó hígítóval keverték és 1 °C-on hűtötték 14 napig. A termékenyítési kísérletek átlagosan 90,8%-os fertilizációt mutattak 180 µg ampicillin/ml hígítónál, 86,4%-ot 3.325 µg ampicillin/ml hígítónál, és 93,2%-ot friss spermánál.

#### **4. A hígító, az ivarsejt-aktiválás megelőzése**

Az ivarsejtek aktiválásának megelőzése a legkritikusabb tényező rövid idejű tárolás esetében, mivel az aktiválás után a termékenység rohamosan csökken. Tekintve, hogy az ivarsejtek az ondóban, ill. a petefészek (vagy ovariális) folyadékban nem aktiválódnak, e közegben hígítás nélkül végzik a rövid idejű tárolást (*Jamieson* 1991). *Harvey és Kelley* (1984) kutatásában egyes melegvízi fajoknál létfontosságú a sperma hígítása. Ezeknél a fajoknál a fejsz alatti szennyezés beindítja a sperma mozgását, amit nem lehet meggátolni sem a tárolási hőmérséklet beállításával, sem kálium-ionok hozzáadásával. *Hara et al.* (1982) szerint a milkfish (*Chanos chanos*) spermájának hűtése sikeresebb volt a plazmával hígított módszerrel, mint a hígítatlan mintáknál. *Withler és Lim* (1982) kutatásában a 10% DMSO-t tartalmazó sóoldattal hígított sügér spermát sikerrel tárolta 5-10 °C között. *Harvey és Kelley* (1984) 5 napról 18 napra növelték a tilápia sperma felhasználhatóságát glükóz, glicin és szaharóz tartalmú tojássárgája-citrát hígító alkalmazásával. *Ohta és Izawa* (1996) japán angolnával (*Anguilla japonica*) végzett kísérleteinek eredményei jelzik, hogy a káliumion esszenciális összetevője az izotóniás oldatoknak a japán angolna sperma hűtve tárolásához (3 °C, 28 nap). Az optimális KCl koncentráció a rövid idejű tároláshoz (egészen 7 napig) 45-75 mM között van, míg hosszabb tároláshoz 15-45 mM közötti. Későbbi kutatásaik folyamán *Ohta és mtsai* (1997) japán angolna (*Anguilla japonica*) spermáját tárolták sikeresen K15 (15 mM

KCl, 149,5 mM NaCl, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,1, 20 mM TAPS-NaOH) és K30 (30 mM KCl, 134,5 mM NaCl, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,1, 20 mM TAPS-NaOH) hígítókkel.

*Bernáth* (2016) eredményei alapján a módosított Lahnsteiner-féle immobilizáló oldat bizonyult a legeredményesebbnek csapósügér (*Perca fluviatilis*) fajban. Összetétele a következő: 150 mM NaCl, 5mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, x 2H<sub>2</sub>O, 20 mM Tris, pH 8,0.

*Marques* és *Godinho* (2004) 6 trópusi halfaj (*Brycon lundii*, *Piaractus mesopotamicus*, *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, *Prochilodus lineatus*, *Prochilodus marggravii*) spermájával végeztek rövid idejű hűtési kísérleteket. Munkájuk során az említett halfajok spermamintáit eppendorf csövekben és műanyag tasakokban tárolták, oxigénnel és levegővel dúsítva, 1,7-4,9 °C-on. Hígító anyagot nem használtak kísérleteik során. A legrövidebb tárolási időtartam a *Leporinus friderici* esetében 7 óra volt, a leghosszabb a *Prochilodus lineatus* esetében 20 óra.

#### A HALSPERMA MÉLYHÜTÉS TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉSE

A halsperma-mélyhűtés úttörő kísérlete *Blaxter* (1953) nevéhez fűződik. A szárazjégen (-79°C) történő mélyhűtés után életképes hering spermiumokat nyert. A múlt század 90-es éveiben a kutatók a világ több pontján mintegy 200 halfaj spermáját hűtötték sikeresen (*Rana* 1995). A csontos halak (*Osteichthyes*) főosztályából a pisztrángfélék családjának (*Salmonidae*) spermamélyhűtési technológiája fejlődött a leggyorsabban. Ez annak köszönhető, hogy jelenleg is számos kutatócsoport dolgozik a világon, többek közt a szivárványos pisztráng hímivarsejtnek mélyhűtési metódusán (*Lahnsteiner et al.* 1997; *Cabrita et al.* 2001).

A sügérfélék (*Percidae*) spermamélyhűtésével, azon belül is az amerikai kontinensen őshonos walleye-vel (*Sander vitreus*) elsőként *Moore* (1987) foglalkozott. *Bergeron et al.* (2002) kísérleteik során a walleye esetében három új hígítót használtak. Egy másik amerikai eredetű sügérféle, amellyel *Ciereszko et al.* (1993) vizsgálták a sárga sügér (*Perca flavescens*) volt. Évekkel később *Glogowski et al.* (1999) szintén a sárga sügér (*Perca flavescens*) spermájának sikeres mélyhűtéséről publikáltak. Európában őshonos sügérfélék közül, hazai kutatócsoport, a csapósügér (*Perca fluviatilis*)



spermamélyhűtésével kísérletezett (Horváth és Urbányi 2001). A Szent István Egyetem kutatói három sügérféle, a kősüllő (*Sander volgensis*), a széles durbinca (*Gymnocephalus baloni*) és a magyar bucó (*Zingel zingel*) spermamélyhűtésével kísérleteztek. Sikeres mélyhűtést azonban csak a magyar bucó esetében sikerült véghezvinni (Keresztessy et al. 2003).

Az elmúlt 15 év kutatásainak súlypontja az újabb fajok mélyhűtési technológiájának finomításán túl, a mélyhűtés okozta károsodások és a spermaminőség alaposabb vizsgálatára irányult. A spermamélyhűtés során fellépő DNS károsodások felkutatására a szakemberek a Comet assay nevű módszert alkalmazták sikeresen (Labbe et al. 2001; Cabrita et al. 2005). Az életképes spermiumok tesztelésére az élő-halott fluoreszcens festési eljárás adott lehetőséget (Flajshans et al. 2004). E módszer pontossága áramlásos citométeres (flow cytometer) vizsgálattal kombinálva javítható tovább (Liu et al. 2007; Horváth et al. 2008).

## **A HALSPERMA-MÉLYHŰTÉS MÓDSZEREI**

1. Mélyhűtés szárazjég (-79°C) segítségével
2. Mélyhűtés folyékony nitrogén (-196°C) gőzében
3. Mélyhűtés programozható hűtőgép segítségével (Bokor 2009)

### **1. Mélyhűtés szárazjég (-79°C) segítségével**

A módszer során a szárazjég (-79°C) tömb felületén vájatokat alakítanak ki, majd ebbe csepegtetik a hűtőmediummal kevert spermát, a mélyhűtés során pelletek képződnek. Következő lépésként a pelleteteket folyékony nitrogénbe helyezik, ahol a mélyhűtés végső szakasza befejeződik (Urbányi 1999). Az említett technikánál általában a pelleteteket krio-csővekben, folyékony nitrogénben tárolják. A pelletek a sperma tárolására műszalmát is használnak. Ilyenkor a mintákat a szárazjég tömb felszínén vagy összetört szárazjég közt hűtik (Magyary 1996).

### **2. Mélyhűtés folyékony nitrogénben (-196°C)**

A mélyhűtési eljárás során, a műszalmákba töltött hígítóval és krioprotektív anyaggal kevert spermamintákat, folyékony nitrogénnel töltött polisztirol dobozba helyezik,

meghatározott magasságban a nitrogén felszínétől, a párolgó nitrogén gőzében előhűtik. Az előhűtés történhet fémlapon, fémrácson (Magvary *et al.* 1996), vagy a folyékony nitrogén felszínén úszó polisztirol kereten műszalmákban (Baynes és Scott 1987).

A módszer előnye, hogy viszonylag olcsó. Hátránya, hogy felolvasztás után a spermiumok motilitása gyorsan és drasztikusan csökken. Gyakorlati alkalmazásának hátránya, hogy a folyékony nitrogén beszerzéséről gondoskodni kell.

### **3. Mélyhűtés programozható hűtőgép segítségével**

A leginkább kontrollálható módszer. A programozható hűtőgépek laboratóriumi és üzemi szintű termelésre egyaránt alkalmasak. A gép hűtőterébe a nitrogén gőze elektronikus úton szabályozva kerül be, ezáltal a kívánt hűtési sebesség teljes pontossággal szabályozható. A programozható berendezések hátránya a magas beszerzési költség és a többi módszernél lényegesen drágább üzemeltetés, amelyhez komoly laboratóriumi háttér szükséges (Bokor 2009). Bokor *et al.* (2015) programozható fagyasztó berendezés (CRF, controlled-rate freezer) alkalmazásával végeztek mélyhűtési kísérleteket csapósügér (*Perca fluviatilis*) spermán. A kísérletben 4 egyed spermáját mélyhűtötték le 1:5, 1:10, 1:20-as hígítási arányban. A kísérlet eredménye, hogy az 1:20-as hígításban a CRF berendezés alkalmazásával mélyhűtött sperma progresszív motilitása  $49\pm 6\%$  volt, ami magasabb, mint 1:5-nél ( $39\pm 6\%$ ). 1:20-as hígításnál magasabb volt a VCL (motilitás sebessége, curvilinear velocity) érték is ( $129\pm 11 \mu\text{m/s}$ ), mint a 1:5 ( $115\pm 9 \mu\text{m/s}$ ) és 1:10 esetében ( $112\pm 17 \mu\text{m/s}$ ).

### **A MÉLYHŰTÉS KÖZBEN LEJÁTSZÓDÓ VÁLTOZÁSOK A SEJT BEN**

A további hűtés (-10 fok körül) során a jégkristályképződés jelent mechanikai stresszt a sejtek számára. Az optimális hűtési hőmérséklet fajoként eltérő: 10 fok/perc embernél, 50-100 fok/perc között bikáknál. A krioprotektív anyagok (CPA) használatával gátolják a jégkristályképződést és mérséklik a hígítási/oldási/mélyhűtési káros hatásokat. A leggyakoribb CPA a spermánál a glicerin. A nem-permeálódó (nem jut be a sejtbe) CPA-khoz hasonlóan a glicerin extracelluláris hatásként ozmotikusan serkenti a sejt dehidrációt, így csökkenti az intracelluláris vízmennyiséget, ami a mélyhűtés során jeget képezhet. Reaktív oxigén gyökök: szerepük van a kapacitáció

során. Különösen a szuperoxid anion ( $O_2^-$ ), a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és a nitrogén-monoxid (NO) játszik szerepet a kapacitáció megindításában. A kapacitáció során betöltött fiziológiai szerepük ellenére a szabad gyökök károsak a sperma életképességére. A sperma kifejezetten érzékeny az oxidatív stressz hatásokra, mivel sok többszörösen telítetlen foszfolipid található a membránban, és nem képes újraszintetizálni a membránalkotókat. A sperma reaktív oxigén gyök/származék (ROS) előállító folyamatait még nem térképezték fel, de a sperma esetében is ROS termelődik az  $O_2$  nem teljes redukciója során a légzési láncban, mint minden aerob sejtben, amelynek légzéshez köthető az ATP anyagcsere mechanizmusa. Krioprezerváció során a sperma számos változásnak van kitéve: szeminális plazma hígulás, alacsony hőmérséklet, hipertóniás környezet. Ezek a körülmények ronszolják és átalakítják a plazma membránt, méghozzá a kapacitációhoz hasonló módon. Ha ezek a membránváltozások nem letálisak, csökkent élettartamhoz és életképességhez vezetnek, hasonlóan, mint a kapacitáción átesett sperma esetében. *Medeiros et al.* (2002)

## A HALSPERMA MÉLYHÜTÉS LÉPÉSEI

### *A spermahígítás, egyensúlyozás*

A hűtőmedium egy megfelelő összetételű hígítóból és egy krioprotektív (a fagyás károsító hatásaitól védő) anyagból álló keverék. A jó hígító a spermát reverzibilisen immobilizálja, nem aktiválja annak mozgását, nem tartalmaz toxikus anyagokat, ozmotikus koncentrációja tolerálható, a pH-ja enyhén lúgos és kiváló pufferkapacitással bír (*Leung* 1991). A sperma mélyhűtéséhez a sejtmembránon gyorsan behatoló intracelluláris anyagok használhatók, 5-15 %-os koncentrációban. A sperma:hűtőmedium arány általában 1:1-10 közötti értéket mutat (*Miskolczi* 2007). *Harvey et al.* (1983) alapján az egyensúlyozás jelentése: a védőanyag-koncentráció kiegyenlítődése az extra- és intracelluláris tér között. Az optimális időt az egyensúlyozásnál kísérletileg kell meghatározni. Ha a spermium kisméretű és jó membrán permeabilitású, DMSO (Dimetil-sulfoxid) és metanol használata esetén az egyensúlyozás rövid idő alatt (1-2 perc) megy végbe. *Lanes et al.* (2008) braziliai lepényhal (*Paralichthys orbignyanus*) spermájánál nem is alkalmazták a mélyhűtés során egyensúlyozás időt.

A leggyakrabban használt intracelluláris védőanyagok az alkoholok (metanol, etilén-glikol, propilén-glikol, glicerin), az oxidok (dimetilsulfoxid (DMSO)) és az amidok (dimetil-acetamid (DMA)). Mélyhűtés során használatosak még a sejtekbe bejutni képtelen, azaz extracelluláris (glükóz, fruktóz, szacharóz, Na-sók) védőanyagok is (Kopeika és Kopeika 2008). A védőanyagokat 5-50%-os koncentrációban használt

ák, a legjobb eredményeket viszont jellemzően 5-20%-os koncentráció esetén kapták (Tiersch 2000). A legelterjedtebb a fent említett védőanyagok közül a DMSO. Hátránya, hogy tárolás során nem stabil molekula, mely az eddigi ismeretek szerint a DNS-ben száltöréseket okozhat. A DMSO 10%-nál nagyobb hígításnál aktiválhatja a spermát. Az etanol és a metanol behatoló képessége gyors (Kopeika és Kopeika 2008). Horváth et al. (2014) adriai pér (*Thymallus thymallus*) és márvány pisztráng (*Salmo marmoratus*) spermáját mélyhűtötték sikeresen. Hígító összetétele: 200 mM glükóz, 40 mM KCl és 30 mM Tris (pH 8,0) keverékét használták. Krioprotektív anyagként 10% etanolt alkalmaztak. A kísérleteikben 1:1, 1:4, 1:9 hígítási arányokat alkalmaztak. Szabó et al. (2005) módosított Tanaka hígítót (137 mM NaCl, 76,2 mM NaHCO<sub>3</sub>) használták európai angolna (*Anguilla anguilla*) spermamélyhűtésénél. Bokor et al. (2015) a mélyhűtés során ugyanezt a módosított Tanaka hígítót és 10% metanolt (védőanyag) alkalmaztak sikeresen csapósügér (*Perca fluviatilis*) spermamélyhűtési kísérleteik során. Bernáth et al. (2015) viszont ugyanúgy csapósügér (*Perca fluviatilis*) esetében módosított Lahnsteiner hígítót használták, ami 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 1mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 20 mM Tris, pH 8.0 keveréke volt. Fagyvédőként szintén 10% metanolt használtak.

Bokor et al. (2007) fogassüllő (*Sander lucioperca*) és kösüllő (*Sander volgensis*) kísérletek során három különböző hígítót használtak:

1. Glükóz hígító (350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8.0)
2. KCl hígító (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8.0)
3. Szacharóz hígító (300 mM szacharóz, 30 mM Tris, pH 8.0).

Védőanyagként metanolt és DMSO-t keverték a mintákhoz 10% koncentrációban. Kísérleteik során a glükóz hígító-DMSO keverék bizonyult a legjobbnak, mivel felolvasztás után a motilitás ekkor mutatott legkedvezőbb értéket. Későbbi kísérleteiknél a glükóz (350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8.0) és metanol (10%)

keveréket alkalmazták fogassüllő (*Sander lucioperca*) spermával végzett vizsgálatokban (Bokor 2008).

### **A mélyhűtött minták tárolása**

A mélyhűtött minták cseppfolyós nitrogénnel (-196°C) feltöltött tartályban tárolhatók. A tárolás történhet műszalmában (0,25, 0,5 ml, esetleg nagyobb), műanyag- illetve üvegsőben, valamint alumínium tasakban (Magyary et al. 1996). Kopeika és Kopeika (2008) szerint a 10 ml-nél nagyobb térfogatú tárolók már nem alkalmasak a halsperma mélyhűtésre. Véleményük szerint ekkora méretnél már gyakorlatilag lehetetlen biztosítani az egyenletes mélyhűtést. Horváth et al. (2010) ponty (*Cyprinus carpio*) spermájának mélyhűtésénél a hígított spermát 5 ml-es műszalmákba töltötték, majd a mélyhűtést polisztirol dobozba töltött folyékony nitrogén gőzében végezték, 3 cm vastag polisztirol kereten. Az előhűtés ideje 7 perc volt. Ezután a műszalmákat cseppfolyós nitrogénbe helyezték.

A fogassüllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűtésénél az előhűtésre szintén 3 cm vastag polisztirol keretet javasol, cseppfolyós nitrogén gőzébe, viszont az előhűtés ideje mindössze 3 perc. Ezek után a műszalmák szintén folyékony nitrogénbe kerülnek (Bokor 2009).

## **SAJÁT VIZSGÁLATOK, KÖVETKEZTETÉSEK**

A mélyhűtési kísérletek folyamán fogassüllő (*Sander lucioperca*) esetében kétféle spermahígítót használtunk: pér-hígítót és glükóz hígítót. Összetételük a következő volt:

- Pér-hígító: 200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0
- Glükóz hígító: 350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8,0

A pér- és glükóz hígítók speciálisan pér és ponty sperma mélyhűtésére kikísérletezett oldatok. A kísérleteink során süllő esetében a hígítási arány 1:8:1 volt, ahol is a spermamennyiség és a védőanyag 10-10%-ot tett ki. A mélyhűtött minta 80%-a hígító volt. Eredményeink szerint a glükóz hígító és a metanol kombináció alkalmazásával a minták magasabb felolvasztás utáni motilitást produkáltak összehasonlítva a pér-hígító és DMSO alkalmazásával. A mélyhűtés előtti motilitás értéke 70 és 90% között alakult, a felolvasztás után pedig drasztikusan, 5-15% közé csökkent. Ehhez hasonlóan

csökkenést figyeltünk meg a motilitás időtartamában is, 1-4 percről a felolvasztás utáni 0,5 percre. Kezdeti eredményeink alapján indokolt lenne egy, a speciálisan fogassüllő számára kifejlesztett hígítóval dolgozni.

Spermavizsgálataink során megállapítottuk, hogy jelentős egyedi különbségek fordulnak elő a spermaminták motilitása között. A mintavételt követően mért motilitás 50 és 90% között, míg a motilitás időtartama 1 és 4,5 perc között változott. A spermamintákat hűtőszekrényben (4°C-on) hét napig tároltuk, a motilitást pedig naponta mértük. A tárolás alatt minden minta esetében csökkenő motilitás jellemző. A legtöbb vizsgált mintánál (70%) a motilitás már a harmadik napon 10% alá csökkent, míg a minták mintegy 20%-ánál a hetedik napon is 40-50% közötti motilitást mértünk. A tárolás során a motilitás ideje is fokozatosan csökkent, az egyedek között pedig statisztikailag igazolható ( $P < 0,05$ ) különbségeket mértünk. Megállapítottuk, hogy az 1,5 ml-es Eppendorf-csőben tárolt minták két napos, hozzáadott adalékanyag (hígító) nélküli tárolás után még jellemzően felhasználhatók. A hígító nélkül, hűtve (4°C-on) tárolt minták tehát mindössze átlagosan 1-3 napig használhatók, míg mélyhűtéssel akár hónapokig is tárolhatók lehetnek, de drasztikus motilitás csökkenés mellett.

A süllő esetében két immobilizáló oldatot teszteltünk.

1. Lahnsteiner-féle immobilizáló oldat: 150 mMol/l NaCl, 5 mMol/l KCl, 1 mMol/l MgSO<sub>4</sub>, 1 mMol/l CaCl<sub>2</sub>, 10 mMol/l hepes (pH 7.8)

2. Kobayashi féle immobilizáló oldat: 130 mM NaCl, 40 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 2,5 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH9.5.

Eddigi eredményeink alapján e két immobilizáló oldat közül a Lahnsteiner-féle immobilizáló oldattal még a 3. napon 10-45%-os motilitású spermát kaptunk, további vizsgálatok szükségesek.

*Ohta és Izawa (1996)* eredményei alapján a rövid idejű hűtve tárolási kísérletekben az alábbi hígítókat teszteljük (összetételük fent említésre került): K15 és K30. Továbbá adatokat gyűjtünk majd a natív sperma hígító nélküli eltarthatósága kapcsán is. Véleményünk szerint a gyakorlatban a rövid idejű hűtve tárolás járhatóbb út, mint a mélyhűtés. Nagy előnye a kis munkaigényesség, egyszerűség. Gyakorlatban történő alkalmazása jóval kisebb eszközigenyű, költséghatékonyabb, a mélyhűtésnél alacsonyabb a kockázati tényezője.

Vizsgálataink során mért több napi motilitási eredményekből adódóan célunk az, hogy a süllő számára megfelelő, a sejtre nézve nem toxikus, hígító kikísérletezésével a süllősperma akár hetekig is tárolható legyen 4°C-on, hűtőszekrényben.

## **Different methods of fish sperm preservation with special regard to the pike-perch (*Sander lucioperca*) – a review**

RÓBERT HEGEDŰS – LÁSZLÓ SZATHMÁRI– KÁROLY TEMPFLI –

ÁGNES BALI PAPP

Széchenyi István University

Faculty of Agricultural and Food Sciences

Department of Animal Sciences

Mosonmagyaróvár

### **SUMMARY**

Based on literature data, the authors review different methods applied for the preservation of fish spermatozoa. The two most common preservation techniques are discussed in detail, and a comparison is given between cooling and freezing (cryopreservation) methods of preservation. Fish sperm preservation dates back nearly 60 years. During this period, several research teams have aimed to improve both long-term and short-term storage of fish sperm from many species.

**Key words:** sperm, cryopreservation, cooling, motility

### **Köszönetnyilvánítás**

A kutatást az EFOP-3.6.1-16-2016-00017 „Nemzetköziesítés, oktatói, kutatói és hallgatói utánpótlás megteremtése, a tudás és technológiai transzfer fejlesztése, mint az intelligens szakosodás eszközei a Széchenyi István Egyetemen“ projekt támogatta.

## IRODALOM

- Baynes, S.M. – Scott, A.P. (1987): Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, **66**. 53-67.
- Bergeron, A. – Vandenberg, G. – Proulx, D. – Brailey, B.L. (2002): Comparison of extenders, dilution of cryopreserved walleye semen. *Theriogenology*, **57**. 1061-1071.
- Bernáth, G. (2016): A halsperma minősítési rendszerének gazdasági célú fejlesztése. Doktori értekezés. Gödöllő
- Bernáth, G. – Žarki, D. – Krejszeff, S. – Paliňka-Žarka, S. – Bokor, Z. – Król, J. – Kollár, T. – Kucharczyk, D. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2015): Optimization of condition for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. *J. Appl. Ichthyol.*, **31**. 94-98.
- Billard, R. (1981): Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, **23**. 287-293.
- Blaxter, J.H.S. (1953): Sperm storage and cross-fertilisation of spring and autumn spawning herring. *Nature*, **172**. 1189-1190.
- Bokor, Z. (2009): A harcsa (*Silurus glanis*) és a süllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata gyakorlati szempontok alapján. Doktori értekezés. Gödöllő.
- Bokor, Z. – Bernáth, G. – Kása, E. – Várkonyi, L. – Hegyi, Á. – Kollár, T. – Urbányi, B. – Zarski, D. – Iff. Radóczy, J. – Horváth, Á. (2015): Két spermamélyhűtési eljárás alkalmazhatóságának összehasonlítása csapósügér (*Perca fluviatilis*) fajban. *Halászat*, **108/3**. 25-29.
- Bokor, Z. – Horváth, Á. – Horváth, L. – Urbányi, B. (2008): Cryopreservation of pikeperch (*Sander lucioperca*) sperm in hatchery conditions. *The Israel Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, **60**. 166-169.
- Bokor, Z. – Müller, T. – Bercsényi, M. – Horváth, L. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2007): Cryopreservation of sperm of two european percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and volga pikeperch (*Samder volgensis*). *Acta Biologica Hungarica*, **58**. 199-207.



- Cabrita, E. – Robles, V. – Alvarez, R. – Herráez, M.P.* (2001): Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, **201**. 301-314.
- Cabrita, E. – Robles, V. – Rebordinos, L. – Sarasquete, C. – Herráez, M.P.* (2005): Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cryobiology*, **50**. 144-153.
- Cloud, J. – Patton, S.* (2009): Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. 237-350. p. In: Cabrita, E., Robles, V., and Herráez, P., (Eds.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis Group. **549**.
- Ciereszko, A. – Ramseyer, L. – Dabrowski, K.* (1993): Cryopreservation of yellow perch semen. *Progressive Fish-Culturist*, **55**. 261-264.
- Cosson, J.* (2004): The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, **12**. 69-85.
- Fauvel, C. – Suquet, M. – Cosson, J.* (2010): Evaluation Of fish perm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, **26**. 636-643.
- Flajšhans, M. – Cosson, J. – Rodina, M. – Linhart, O.* (2004): The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biology International*, **28**. 955-959.
- Glogowski, J. – Ciereszko, A. – Dabrowski, K.* (1999): Cryopreservation of muskellunge and yellow perch semen. *North American Journal of Aquaculture*, **61**. 258-262.
- Hara, S. – Canto, J.T. – Almendras, J.M.E.* (1982): A comparative study of various extenders for milkfish (*Chanos chanos*), sperm preservation. *Aquaculture*, **28**. 339-346.
- Harvey, B. – Kelley, N. – Ashwood-Smith, M.J.* (1983): Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, **20**. 432-439.
- Harvey, B. – Kelley, R. N.* (1984): Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture*, **36**. 85-95.
- Harvey, B. – Stoss, J. – Butchart, W.* (1983): Supercooled storage of salmonid ova. *Can Tech Rep Fish. Aquat. Sci.*, **1222**. Series I:1-9.
- Horváth, Á. – Jesenek, D. – Snoj, A. – Csorbai, B. – Bokor, Z. – Urbányi, B.* (2014): Cryopreservation of sperm of the adriatic grayling (*Thymallus thymallus*) and the

marble trout (*Salmo marmoratus*). *Columella – Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, Vol. **1**. 49-55.

Horváth, Á. – Páramo, S.M. – Kovács, Á.I. – Urbányi, B. – Herráez, P. (2010): A ponty (*Cyprinus carpio*) ovariális folyadékának hatása friss és mélyhűtött pontysperma motilitására. *Állattani közlemények*, **95**. 25-33.

Horváth, Á. – Urbányi, B. (2001): Cryopreservation of sperm of some European cyprinids and percids. *World Aquaculture*, **32**. 23-25.

Horváth, Á. – Wayman, W.R. – Dean, J.C. – Urbányi, B. – Tiersch, T.R. – Mims, S.D. – Johnson, D. – Jenkins, J.A. (2008): Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study. *Journal of Applied Ichthyology*, **24**. 443-449.

Jamieson, B. G. M. (1991): *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press. Cambridge.

Jensen, J. O. T. – Alderdice, D.F. (1984): Effect of temperature on short-term of eggs and sperm of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture*, **37**. 251-256.

Keresztessy, K. – Horváth L. – Urbányi, B. – Horváth, Á. – Baska, F. – Pethő Á. – Masek, P. (2003): Veszélyeztetett tiszai halfajok megőrzési lehetőségei. *Hidrológiai Közlöny*, **83**. 73-75.

Kime, D.E. – Van Look, K.J.W. – McAllister, B.G. – Huyskens, G. – Rurangwa, E. – Ollivier, F. (2001): Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **130**. 425-433.

Kopeika, E. – Kopeika, J. (2008): Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi Hadi, S.M., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Szerk.): *Fish Spermatology*. Alpha Science International Ltd. Oxford. UK. 347-396.

Křišťan, J. – Hatef, A. – Alavi, S.M.H. – Policar, T. (2014): Sperm morphology, ultrastructure, and motility in pikeperch *Sander lucioperca* (Percidae, Teleostei) associated with various activation media. *Czech J. Anim. Sci.*, **59**. 1–10.

Labbe, C. – Martoriati, A. – Devaux, A. – Maisse, G. (2001): Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, **60**. 397-404.

Lahnsteiner, F. – Weismann, T. – Patzner, R.A. (1997): Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, **28**. 471-479.

Lanes, C.F.C. – Okamoto, M. – Cavalcanti, V.P. - Collares, T. – Campos, F.V. – Deschamps, C.J. – Robaldo, B.R. – Marins, F.L. – Sampaio, A.L. (2008): Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, **275**. 361-365.

Liu, Q.H. – Li, J. – Zhang, S.C. – Xiao, Z.Z. – Ding, F.H. – Yu, D.D. – Xu, X.Z. (2007): Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology*, **67**. 1168-1174.

Magyary, I. (1996): Halgaméták és halembriók mélyhütése. Doktori értekezés. Gödöllő.

Magyary, I. – Urbányi, B. – Hilge, V. (1996): Simple, inexpensive, portable and efficient method for fish sperm freezing. Congress on Refrigeration and Aquaculture. Bordeaux. March 20-22.

Marques, S. – Godinho, H.P. (2004): Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*, Vol. **47**. 799-804.

Medeiros, C. M. - Forell, F. – Oliveira, A. T. – Rodrigues, J. L. (2002): Current status of sperm cryopreservation: Why isnt it better? *Theriogenology*, **57**. 327-344

Miskolczi, E. (2007): A mélyhütés okozta károsodások vizsgálata 3 halfaj spermiumain. Doktori értekezés. Gödöllő.

Moore, A. A. (1987): Short-term storage and cryopreservation of walleye semen. *Progressive Fish-Culturist*, **49**. 40-43.

Ohta, H. – Izawa, T. (1996): Diluent for cool storage of the japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, **142**. 107-118.

Ohta, H. – Tanaka, H. – Kagawa, H. – Okuzawa, K. – Iinuma, N. (1997): Artificial fertilization using testicular spermatozoa in the japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fisheries Science*, **63**. 393-396.

Rana, K.L. (1995): Preservation of Gametes. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Szerk.) *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Stirling. Blackwell Science. 53-75.

- Sadiqul Islam, M. - Akhter, T.* (2011): Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences*, **1**. 11-19.
- Sarosiek, B. – Cejko, B.I. – Kurcharczyk, D. – Žarki, D. – Judycka, S. – Kowalski, R.K.* (2013): Short-term storage of perch (*Perca fluviatilis* L.) milt under cooling conditions. *Reproductive Biology*, **13**. 39.
- Sarosiek, B. – Dryl, K. – Krejszef, S. – Žarki, D.* (2016): Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) milt collected with a syringe and a catheter. *Aquaculture*, **450**. 14-16.
- Satterfield, Jr. J.R. – Flickinger, S.A.* (1995): Field Collection and Short-Term Storage of Walleye Semen. *The Progressive Fish-Culturist*, **57**. 182–187.
- Stoss, J. - Büyükhattipoglu, S. - Holtz, W.* (1978): Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. *Ann. Biol. Anim. Biophys*, **18**. 1077-1082.
- Stoss, J. – Holtz, W.* (1983): Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. *Aquaculture*, **25**. 217-222.
- Stoss, J. – Refstie, T.* (1983): Short-term and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, **30**. 321-330.
- Szabó, G. – Müller, T. – Bercsényi, M. – Urbányi, B. – Kucska, B. – Horváth, Á.* (2005): Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryopreservation. *Acta Biologica Hungarica*, **56**. 173-175.
- Tiersch, T.R.* (2000): Introduction. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Szerk): *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. Pp. XXIII.
- Urbányi, B.* (1999): A haltenyésztés géntartalékainak megőrzése androgenezis és spermamélyhűtés kombinálásával. Doktori értekezés. Gödöllő.
- Withler, F. C. – Lim, L.C.* (1982): Preliminary observations of chilled and deep storage of grouper (*Epinephalus tauvina*) sperm. *Aquaculture*, **27**. 389-392.

*A szerzők levélcíme – Address of the authors:*

HEGEDŰS R. – SZATHMÁRI L. – TEMPFLI K. – BALI PAPP Á.

Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,  
Állattudományi Tanszék

H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár tér 2.

hegedusrobert88@gmail.com