

Hazai ragadozó halfajok sperma mélyhűtésének fejlesztése és felhasználási lehetőségei a keltetőházi szaporítás során

Bernáth Gergely, Horváth Ákos, Urbányi Béla, Bokor Zoltán

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Természeti Erőforrások Megőrzése Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.

Összefoglalás

Hazánk őshonos ragadozó halfajai esetében nagy gazdasági jelentőséggel bírhat a spermamélyhűtés, mind a termelés, mind pedig az ökológiai szempontú természetes vízi halgazdálkodás szemszögéből egyaránt. A Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszéke több mint 10 éves múltra tekint vissza a harcsa (*Silurus glanis*), a csuka (*Esox lucius*), a süllő (*Sander lucioperca*), a kősüllő (*Sander volgensis*) és a sügér (*Perca fluviatilis*) spermamélyhűtési technológiájának fejlesztésében. A harcsa fajban az eljárást sikeresen ültettük át a keltetőházi körülmények közé. A többi halfaj esetében egy jelenleg is zajló szisztematikus kutatómunka révén igyekszünk a spermafagyasztást a gyakorlati halszaporítás lépései közé integrálni. Jelen összefoglaló fajonként kívánja bemutatni az eddig elért eredményeket.

The improvement of sperm cryopreservation in Hungarian predator fish species and the applicability in hatchery practice

Gergely Bernáth, Ákos Horváth, Béla Urbányi, Zoltán Bokor

Department of Aquaculture, Institute for Natural Resources Conservation, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Szent István University, 1 Páter Károly Str., H-2100 Gödöllő, Hungary

Summary

Sperm cryopreservation could play an important role in the culture of endemic Hungarian predator fish species from the point of view of farm production and the ecological water management as well. The Department of Aquaculture of Szent István University has a tradition of more than 10 years of wels catfish (*Silurus glanis*), northern pike (*Esox lucius*), pikeperch (*Sander lucioperca*), Volga pikeperch (*Sander volgensis*), and Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm cryopreservation. The application of frozen sperm in the hatchery propagation has been carried out already successfully in wels catfish and pikeperch. The improvement of the cryopreservation process in the

other mentioned species will allow its integration to farm production. This review presents the results in all species achieved so far.

Bevezetés

A különböző sejtek (pl. sperma) és szövetek hosszú távú tárolása az igen alacsony hőmérsékleten (-196 °C) történő fagyasztást követően lehetséges. Megfelelően kidolgozott módszer alkalmazása mellett a minták felolvasztást követően megőrzik minőségüket, életképességüket (Agarwal 2011; Bokor et al. 2019; Cabrita et al. 2010). Az eljárás az akvakultúra, a természetvédelem, valamint a rekreációs tevékenységek (horgászat) esetében is számos előnyt kínál (Martínez-Parámo et al. 2017). A spermamélyhűtés: 1. kiküszöböli az esetleges aszinkron ivartermék termelést az ikrás és tejes egyedek esetében, 2. egyszerűsítheti az anyahaltartás körülményeit, 3. lehetővé teszi a hímivar-sejtek szállítását és kereskedelmét, 4. elősegítheti spermabankok létrehozását, 5. támogatja a különböző szelekciós programokat (Cabrita et al. 2010).

A fagyasztás különböző halfajokban történő fejlesztése során nagy jelentőséggel bír az úgynevezett járulékos tudományágak ismerete. A mélyhűtés sikerességét nagymértékben befolyásolja a sperma minősége (Bernáth 2016; Cabrita et al. 2010). A sperma motilitása, sűrűsége, a spermiumok morfológiája, membránjának épsége, a DNS állomány töredezettsége, az ivarsejtek energiakészlete közvetlenül, vagy közvetetten befolyásolják a termékenyítő képességet (Cabrita et al. 2010; Fauvel et al. 2010; Gallego és Asturiano 2018). A különböző spermátételek minősége és a fagyasztással szembeni ellenállóképessége nagy változatosságot mutathat az egyedek között, valamint adott egyed esetében egyaránt. A megfelelő minta kiválasztása, ezáltal a minőség ellenőrzése kulcsszerepet tölt be a fagyasztást megelőzően és a felolvasztást követően (Cabrita et al. 2010).

Halakban az első sikeres spermafagyasztást a hering (*Clupea harengus*) esetében végezték 1953-ban (Blaxter 1953). Napjainkig közel 200 édesvízi és tengeri halfaj esetében dolgoztak ki eredményes mélyhűtési eljárást (Agarwal 2011). A módszereket sok esetben már sikeresen alkalmazták a kutatásban (laboratóriumi körülmények között) és termelő gazdaságok keltetőházaiban egyaránt (Bokor et

al. 2010; Cabrita et al. 2010). A fenntartható akvakultúra (természeti és humán erőforrások optimalizációja), a termelés intenzifikációja új irányt jelent hazai és nemzetközi szinten egyaránt (Bernáth et al. 2016). A spermamélyhűtés a szaporítási technológiák fejlesztését segítheti, javítva a termelés gazdasági hatékonyságát, természetvédelmi, és rekreációs szempontból jelentős halfajaink esetében egyaránt (Bernáth et al. 2016; Bokor et al. 2019).

A mélyhűtött harcsa (*Silurus glanis*) sperma alkalmazása keltetőházi szaporítás során

A harcsa hazánk egy kiemelt gazdasági és horgászati jelentőséggel bíró halfaja. Keltetőházi szaporítása során a klasszikus fejés módszerével csak kis mennyiségű és gyakran rossz minőségű tej nyerhető ki a hím egyedektől. Az általánosan alkalmazott eljárás a here kioperálása, mely azonban a tejesek leölését eredményezi. A sperma fagyasztása optimálisabb sperma felhasználást tesz lehetővé (Bokor et al. 2019).

Az elmúlt 10 évben szisztematikus kutatómunka eredményeként sikeresen dolgoztuk ki a harcsa sperma üzemi méretben (5 és 10 ml sperma) történő fagyasztását (Bokor et al. 2010 és 2019). A mélyhűtött sperma minden esetben megőrizte a mozgási képességét a felolvasztást követően (52-60%). A módszerek minden esetben nagy mennyiségű (200 és 250 g ikra/Zuger üveg) ikra termékenyítése során tesztelésre kerültek, keltetőházi körülmények között. Az eljárások sikerességét mutatta a friss spermához hasonló kelési arány (5 ml: 50-95%, 10 ml: 66%) is (Bokor et al. 2010 és 2019). Vizsgálataink továbbá bizonyították, hogy a fagyasztás nincs negatív hatással a harcsaivadék túlélésére (93-99%) (Bokor et al. 2015), melynek tesztelése laboratóriumi és üzemi körülmények között egyaránt megvalósult.

A csuka (*Esox lucius*) sperma üzemi szintű mélyhűtésének fejlesztése

A csuka keltetőházi szaporítása során a harcsához hasonlóan szükséges a hím egyedek leölése a megfelelő mennyiségű és minőségű sperma kinyeréséhez. A tej hosszú távú tárolásával a korábban már említett előnyök miatt gazdaságosabbá tehető a faj indukált szaporítása (Cejko et al. 2020; Hulak et al. 2008).

A csukasperma üzemi szintű fagyasztásának kidolgozását 3 éve kezdtük meg. A vizsgálatok során lépésről lépésre haladva írtunk le egy teljesen új hígítót (150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂ × 6H₂O, 1 mM CaCl₂ × 2H₂O, 20 mM Tris, and 0,5% BSA, pH: 8, Bernáth et al. 2017). A fagyasztást sikeresen optimalizáltuk laboratóriumi körülmények között (0,5 ml), majd eredményesen ültettük át keltetőházi kísérletek mellett üzemi mennyiségű spermamennyiségre (5-10 ml). A felolvasztást követően minden esetben magas motilitás

értékeket kaptunk (0,5 ml: 45%, 5 ml: 57%, 10 ml: 41%). A módszer keltetőházi alkalmazásának optimalizációja és a mélyhűtésből származó lárvák életképességének vizsgálata jelenleg is zajlik.

A süllő (*Sander lucioperca*) és a kősüllő (*Sander volgensis*) spermamélyhűtésének fejlesztése és alkalmazása keltetőházi körülmények között

A süllő hazánk egyik legértékesebb, legkiválóbb húsminőségű ragadozó hala. A többi tenyésztett ragadozó halfajunk mellett fontos szerepet tölt be a tógazdasági haltermelés során, hiszen ritkítja a jövevény, a ponty számára táplálékkonkurens halfajokat (Bokor et al. 2007 és 2008). A hasonló húsminőségű rokonfaj, a kősüllő esetében a horgászati hasznosítás a jellemzőbb. Természetes populációi csökkenő tendenciát mutatnak (Nagy 2020).

A süllő esetében hatékonynak bizonyult (motilitás: 40% kelés: 41%) a glükóz alapú hígító metanol, mint védőanyag hozzáadása mellett 0,5 ml sperma fagyasztása során (Bokor et al. 2007). A sikeres módszertani fejlesztést követően az eljárást keltetőházi körülmények között alkalmaztuk. A szaporítás során 10, 30, valamint 50 g süllő ikrát termékenyítettünk meg. A mélyhűtött minták 53%-ban tartalmaztak mozgó sejteket. Az eredmények alapján minden esetben magas kelési arányt (10 g: 47%, 30 g: 55%, 50 g: 87%) eredményezett a felolvasztott sperma alkalmazása a termékenyítés folyamán (friss kontroll: 61%) (Bokor et al. 2008). Süllő esetében a keltetőházban történő alkalmazás részleteinek további tesztelése, míg a kősüllő esetében fejlesztett fagyasztási módszerek keltetőházi kidolgozása jelenleg is zajlik.

Üzemi mennyiségű sügér (*Perca fluviatilis*) sperma mélyhűtésének fejlesztése

A csapósügér az egyik legígéretesebb hal lehet az édesvízi intenzív akvakultúrában. Számos európai országban már sikeresen alkalmazzák a faj piaci termelés céljából történő indukált szaporítást (Zarski et al 2017). A fenntartható halhús előállítás azonban csak kontrollált körülmények között jöhet létre, melynek alapja az örökítő anyag ivási időszakon belüli és kívüli biztosítása. A spermamélyhűtés a faj esetében kulcsszerepet játszhat az intenzív akvakultúra szempontjából (Bernáth et al. 2016).

Kísérleteink során egységesítettük a sügér sperma fagyasztási technológiáját. Magas motilitási értéket (72%) és termékenyülést (75%) rögzítettünk, mely a módszer sperma kis mennyiségben történő fagyaszthatóságát igazolta (Bernáth et al. 2015a és b). A vizsgálatok következő szakaszában, üzemi mennyiségben fagyasztottuk le a faj spermáját (3 ml, 67 műszalma) az ivási időszakot megelőzően. A termékenyítés során ismét bizonyítást nyert az

eljárás alkalmazhatósága (termékenyülés: 72%) (Bernáth et al. 2016). A mélyhűtési technológia intenzifikálásának következő lépcsőfokát jelenti új, nagyméretű műszalmák és kriocsövek tesztelése (5 ml). A módszerek keltetőházi fejlesztése jelenleg is folyamatban van.

Következtetések

Hazánk őshonos ragadozó halfajai esetében nagy gazdasági jelentőséggel bírhat a spermamélyhűtés, mind a termelés, mind pedig az ökológiai szempontú természetes vízi halgazdálkodás szemszögéből egyaránt. Kísérleteink több mint 10 évre nyúlnak vissza a harcsa, csuka, süllő, kőszüllő, valamint a sügér esetében. Az eredményeink igazolták, teljes mértékben a harcsa és nagyrészt süllő esetében is, hogy a módszer alkalmazható a keltetőházi szaporítás során. A további fajok esetében az éppen zajló kutatás és fejlesztés szintén lehetővé fogja tenni a gyakorlati felhasználást. Az alkalmazott módszerek a fenntartható akvakultúra fejlődésében fontos szerepet tölthetnek be.

Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatok elvégzéséhez a GINOP-2.3.2-15-2016-00004, az EUREKA_HU_12-1-2012-0056 (PERCAHATCH), a Halászati Operatív Program III. tengelye ("Európai Halászati Alap: a megújuló halászatért"- az Európai Unió és Magyarország támogatásával), és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 pályázatok járultak hozzá. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatások továbbá Bernáth Gergely Bolyai János Kutatási (BO/00508/18/4) Ösztöndíjának és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készültek el.

Irodalomjegyzék

- Agarwal, N. K. 2011. Cryopreservation of fish semen. In: Thapliyal, M., Thapliyal, A., Bhatt, J.P. (Eds.), Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology, Transmedia Publication, pp. 104–127.
- Bernáth, G. 2016. A halsperma minősítési rendszerének gazdasági célú fejlesztése. Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő, p. 112.
- Bernáth, G., Bokor, Z., Kása, E., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Kollár, T., Urbányi, B., Žarski, D., Radóczy Ifj, J., Horváth, Á. 2015a. Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. *Cryobiology* 70, 76–78.
- Bernáth, G., Žarski, D., Krejszeff, S., Palińska-Žarska, K., Bokor, Z., Król, J., Kollár, T., Kucharczyk, D., Urbányi, B., Horváth, Á. 2015b. Optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 94–98.
- Bernáth, G., Bokor, Z., Žarski, D., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Staszny, Á., Urbányi, B., Radóczy Ifj, J., Horváth, Á. 2016. Commercial-scale out-of-season cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm and its application for fertilization. *Animal Reproduction Science* 170, 170–177.
- Bernáth, G., Várkonyi, L., Szanati, E., Molnár, J., Kajtár, A., Solymosi, E., Urbányi, B., Bokor, Z. 2017. Practical improvement of pike (*Esox lucius*) sperm cryopreservation Aquaculture Europe, 17-20 in October, Dubrovnik, Croatia.
- Bokor, Z., Müller, T., Bercsényi, M., Horváth, L., Urbányi, B., Horváth, Á. 2007. Cryopreservation of sperm of two European percid species, the Pike perch (*Sander lucioperca*) and the Volga pikeperch (*S. volgensis*). *Acta Biologica Hungarica* 58, 199–207.
- Bokor, Z., Horváth, Á., Horváth, L., Urbányi, B. 2008. Cryopreservation of pike perch sperm in hatchery conditions. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgheh* 60, 168–171.
- Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, L., Horváth, Á. 2010. Commercial-scale cryopreservation of wels catfish (*Silurus glanis*) semen. *Aquaculture Research* 41, 1549–1551.
- Bokor, Z., Ittész, I., Mosonyi, G., Kotrik, L., Müller, T., Urbányi, B., Horváth, Á. 2015. Survival and growth rates of wels catfish (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758) larvae originating from fertilization with cryopreserved or fresh sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 31, 164–168.
- Bokor, Z., Bernáth, G., Várkonyi, L., Molnár, J., Láng, Z. L., Tarnai-Király, Z., Solymosi, E., Urbányi, B. 2019. The applicability of large-scale sperm cryopreservation in wels catfish (*Silurus glanis*) optimized for hatchery practice. *Aquaculture* 506, 337–340.
- Blaxter, J. H. S. 1953. Sperm Storage and Cross-Fertilization of Spring and Autumn Spawning Herring. *Nature* 172, 1189–1190.
- Cabrera, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M. P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 623–635.
- Cejko, B.I., Sarosiek, B., Dryl, K., Judycka, S., Szczepkowska, B., Szczepkowski, M., Kowalski, R. K. 2020. The effect of cryopreservation extender on sperm motility and hatch success in northern pike (*Esox lucius*). *Aquaculture* 514, 734482.
- Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J. 2010. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26 (5), 636–643.
- Gallego, V., Asturiano, J. F. 2018. Sperm motility in

- fish: technical applications and perspectives through computer-aided sperm analysis (CASA-Mot) systems. *Reproduction, Fertility and Development*, 30 (6) 820–832.
- Hulak, M., Rodina, M., Alavi, S. M. H., Linhart, O. 2008. Evaluation of semen and urine of pike (*Esox lucius* L.): Ionic compositions and osmolality of the seminal plasma and sperm volume, density and motility. *Cy-bium* 32(2), suppl. 189-190.
- Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T. R., Cabrita, E. 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture* 472, 156–177.
- Nagy, B. 2020. A balatoni kősüllő (*Sander volgensis*) állomány hímivarsejt minőségének és mélyhűtésének vizsgálata az indukált szaporítás fejlesztése és a génbanki megőrzés céljából. Diplomadolgozat, Szent István Egyetem, Gödöllő, p. 41.
- Żarski, D., Bernáth, G., Król, J., Cejko, B. I., Bokor, Z., Palińska-Żarska, K., Milla, S., Fontaine, P., Krejszeff, S. 2017. Effects of hCG and salmon gonadolibérine analogue on spermiation in the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Theriogenology* 104, 179–185.