

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 16

Issue 2

Gödöllő
2020

A BALATONI KŐSÜLLŐ (*SANDER VOLGENSIS*, GMELIN, 1788) ÁLLOMÁNY HÍMIVARSEJT MINŐSÉGÉNEK ÉS MÉLYHŰTÉSÉNEK VIZSGÁLATA AZ INDUKÁLT SZAPORÍTÁS FEJLESZTÉSE ÉS A GÉNBANKI MEGŐRZÉS CÉLJÁBÓL

Nagy Borbála¹, Várkonyi Levente¹, Fodor Ferenc², Koltai Tamás², Bodnár Ádám², Molnár József¹, Láng Levente Zete¹, Izsák Tibor¹, Staszny Ádám¹, Ferincz Árpád¹, Birkó-Sulyok Zita Katalin¹, Urbányi Béla¹, Szári Zsolt², Bokor Zoltán¹, Bernáth Gergely¹

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék
2100 Gödöllő, Páter Károly út 1./ 2484 Agárd

²Balaton Halgazdálkodási Nonprofit Zrt., 8600 Siófok, Horgony u.1.
nagy.borbala@mkk.szie.hu

Received – Érkezett: 16.11.2019.
Accepted – Elfogadva: 17.11.2020.

Összefoglalás

A kősüllő sperma mélyhűtése egyszerűbbé és gazdaságosabbá teheti a szaporítást, ezáltal elősegítheti a természetes populációk horgászati és természetvédelmi célú visszatelepítését egyaránt. Munkánk során 3 különböző kísérletet végeztünk sperma kinyerési (hagyományos fejés, katéter alkalmazása, fejés hígítóba és herepréselés) és mélyhűtési módszerek fejlesztésének céljából ($N=39$). A vizsgálatok során összehasonlítottunk 3 különböző hígítót (módosított Tanaka, csuka, glükóz), valamint két különböző méretű műszalmát (0,5 és 5 ml). A hímivarsejt progresszív motilitását a friss és a mélyhűtött mintákban egyaránt számítógépes spermavizsgáló rendszerrel (CASA) végeztük. Az eredmények alapján hatékony sperma kinyerési módszernek bizonyult a hagyományos és a katéteres fejés, valamint a herepréselés egyaránt, azonban a legnagyobb minta mennyiséget az utóbbi módszer eredményezte. Keltetőházi körülmények között igazoltuk az általunk kidolgozott mélyhűtési módszerek (módosított Tanaka hígító, 0,5 illetve 5 ml-es műszalma) alkalmazhatóságát a kősüllő sperma fagyasztása során.

Kulcsszavak: kősüllő, spermamélyhűtés, CASA, keltetőházi körülmények

The improvement of the quality assessment and cryopreservation methods in Volga pikeperch (*Sander volgensis*) sperm obtained from the Lake Balaton for practical and conservation purposes

Abstract

Sperm cryopreservation in Volga pikeperch (*Sander volgensis*) can simplify the propagation process and reduce the costs of the broodstock management. The method can help also the reintroduction of the natural populations in Volga pikeperch. In our study, 3 different experiments

were carried out to improve the sperm sampling (regular stripping method, catheter, stripping into Pike extender and squeezing of the testis) and cryopreservation methods extenders (Extenders: modified Tanaka, Pike and Glucose, Straws: 0.5 and 5 mL) ($N=39$) in Volga pikeperch. The progressive motility in both fresh and the cryopreserved samples was recorded with Computer-assisted Sperm Analysis (CASA). According to our results, the regular, catheter stripping and squeezing testis can be effectively applied in Volga pikeperch. However, squeezed testis provides the highest volume of sperm. Both cryopreservation methods (0.5 and 5 mL straws) using modified Tanaka extender were efficiently used in hatchery conditions.

Keywords: Volga pikeperch, sperm cryopreservation, CASA, hatchery conditions

Irodalmi áttekintés

A kősüllő egy Közép- és Kelet-Európában fellelhető halfaj. Húsának minősége közeli rokonáéhoz, a fogassüllőéhoz (*Sander lucioperca*) hasonlóan kiváló. A kősüllő stresszérzékenysége alacsonyabb és jobban tolerálja a csökkent oxigénszintet, mint az említett rokonfaj, habár növekedési erélye elmarad a fogassüllőhöz képest (Szabó et al. 2009). Állománya Európa-szerte jelentős mértékben lecsökkent az utóbbi két évtizedben (Holcik 2003). A horgász- és halászfogások „vesztéseit” tenyésztésből származó kihelyezésekkel lehetne pótolni (Szabó et al. 2009). Mesterséges szaporítására vonatkozóan igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, így annak további vizsgálata elengedhetetlen (Bokor et al. 2007). A spermamélyhűtés egyszerűbbé és költséghatékonyabbá teheti a szaporítási és nevelési folyamatokat (Bokor et al. 2019). A mélyhűtve történő tárolással kiküszöbölhető a spermáció és az ovuláció nem egy időben történő lezajlásából adódó probléma az ivási időszakban. Az ivarsejtek fagyasztása lehetővé teszi azok kiváló minőségű megőrzését, illetve génbankok létrehozását genetikai anyag megőrzésére akár veszélyeztetett fajok esetén is. A minták éveken keresztül tárolhatók rendkívül alacsony hőfokon ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) minőség romlás nélkül (Bernáth et al. 2018). Fajspecifikus mélyhűtési módszert, azonban csak néhány édesvízi faj esetén írtak le (Bernáth et al. 2015). A hímivartermék megfelelő minősége elengedhetetlen fontosságú a sikeres mélyhűtés és szaporítás elérése érdekében. A spermanyerés folyamán el kell kerülni annak vérrel, ürülékkel, vizelettel, vízzel és nyálkával történő szennyeződését, mert a sejtek aktiválódását okozhatják (Bozkurt 2019). A kősüllő mesterséges termékenyítésére nincsen kiforrott protokoll. A faj keltetőházi szaporításáról elenyésző mennyiségű adat áll rendelkezésünkre, a spermamélyhűtéséről pedig tudomásunk szerint csak egy tanulmányban írnak.

Anyag és módszer

A kísérleteinkhez a tejes állományt a Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt. biztosította. A vizsgálatok egy részét a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének telephelyén található haltartó infrastruktúrájában, másik részét a Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt. buzsáki telephelyének keltetőházában végeztük. Munkánk során 3 különböző kísérletet hajtottunk végre sperma kinyerési és mélyhűtési módszerek fejlesztésének céljából ($N=39$). Az oltást megelőzően a halakat 2-fenoxi-etanol (99%, 0,4 ml/l) tartalmazó vízben bódítottuk. A spermáció indukálásához hipofízis kezelést alkalmaztunk. A kísérleti terv alapján kinyertük a hímivarterméket. A sejtek progresszív motilitását a friss és a mélyhűtött mintákban egyaránt számítógépes spermavizsgáló

rendszerrel (CASA, Computer-assisted spermanalysis, Sperm Vision™ v. 3.7.4., Minitube of America, Venture Court Verona, Egyesült Államok) végeztük. A sejtek aktiválásához egy 50 mM NaCl tartalmú, 30 mM Tris-sel pufferelt oldatot használtunk (pH: 8,0±0,2) (Bokor et al. 2019). Az oldathoz 0,01 g/ml BSA-t (bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albumin) adtunk, hogy megakadályozzuk a sejtek letapadását. Vizsgálataink során a mélyhűtéshez védőanyagként 10% metanolt alkalmaztunk. A fagyasztás minden esetben polisztirol dobozban történt, 3 cm-en a folyékony nitrogén gőzében. A folyamat 3, illetve 7 percig tartott a műszalmák méretétől függően (Bokor et al. 2019, Horváth et al. 2003). A sperma felolvasztását 40 °C-os vízfürdőben (Thermo Haake P5, Thermo Electron Corp, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) végeztük. A 0,5 ml-es műszalmákat 13 másodpercig, az 5 ml-es műszalmákat 35 másodpercig olvasztottuk (Bokor et al. 2007 és 2019).

Az első vizsgálat során 4 féle módon nyertünk spermát 5-5 haltól, melyek a következők voltak, hagyományos fejés, katéter alkalmazása, hígítóba történő fejés és herepréselés. A következő vizsgálat során módosított Tanaka (137 mM NaCl, 76,2 mM NaHCO₃, Bernáth et al. 2015), csuka (150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄ * 12H₂O, 1 mM MgCl₂ * 6H₂O, 1 mM CaCl₂ * 2H₂O, 20 mM Tris, és 0,5% BSA, pH: 8±0,2, Bernáth et al. 2017) és glükóz (350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH: 8,0±0,2, Bokor et al. 2007) hígítókat hasonlítottunk össze. Az ivarterméket 7 egyed heréjének kioperálásával és préselésével nyertük ki. A mélyhűtés során 0,5 ml-es műszalmát használtunk. A spermáció indukálásához az első két vizsgálatban 3 mg/ttkg hipofízist alkalmaztunk a spermanyerést megelőzően 24 órával. Az utolsó kísérlet folyamán kétféle mintavételi módszert (hagyományos fejés és herepréselés), ill. 0,5 és 5 ml-es műszalmákat (N=5) hasonlítottunk össze keltetőházi körülmények között (N=6-6). A halakat 48 órával a vizsgálatokat megelőzően 3,5 mg/ttkg hipofízissel oltottuk.

Az adatsorok normálítás vizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük. A nem normál eloszlást mutató értékeket arkusz-színusz négyzetgyök függvénnyel transzformáltuk. A csoportok közötti különbségeket Student féle egy mintás t-próbával, valamint egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA, kiegészítve: Tukey féle post-hoc teszt) vizsgáltuk. A vizsgálatok során az alkalmazott szignifikancia szint minden esetben P<0,05 volt.

Eredmények és értékelésük

Első kísérletünk során a legmagasabb motilitást a katéteres spermanyerés esetén (92±5%) mértük. A hagyományosan (5±7%) és a csuka hígítóba fejt (8±11%) sperma szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott, mint a préseléssel (63±12%) és a katéterrel nyert minta (1. ábra). A legnagyobb sperma mennyiséget a herepréselés módszerével kaptuk.

1. ábra: A négyféle mintavételi módszer összehasonlítása során mért progresszív motilitás ($N=20$). A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

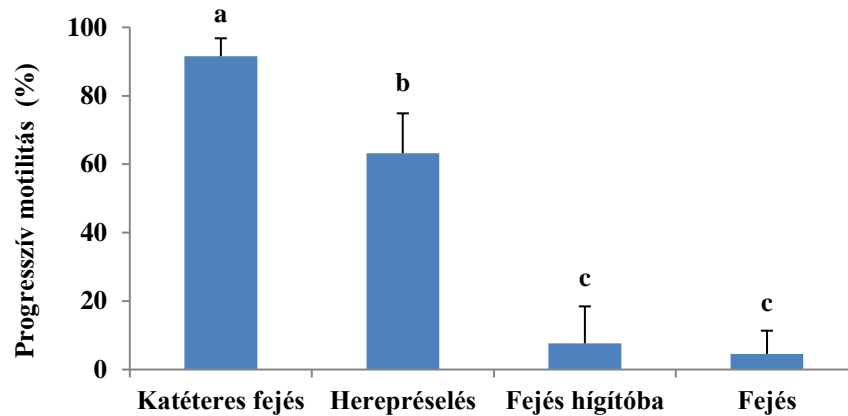


Figure 1: The progressive motility measured during the comparison of 4 different sampling methods ($N=20$). Different letters indicate statistically significant difference at the significance level of $P<0.05$. The columns represent mean and standard deviation.

A második vizsgálat folyamán hasonló progresszív motilitás értéket mértünk a friss sperma ($49\pm 9\%$) és a Tanaka hígító ($40\pm 15\%$) alkalmazása esetén. A friss sperma motilitását a csuka ($25\pm 16\%$) és glükóz ($2\pm 1\%$) hígítókkal összehasonlítva szignifikáns különbséget tapasztaltunk. A glükóz hígítónál rögzített progresszív motilitás szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a módosított Tanaka, vagy a csuka hígító alkalmazásával kapott érték (2. ábra).

2. ábra: A három különböző hígító összehasonlítása során mért progresszív motilitás ($N=7$). A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek ($P<0,05$). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

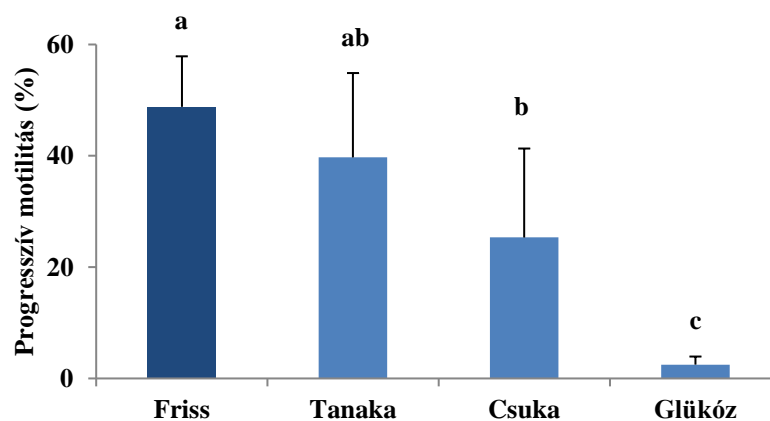


Figure 2: The progressive motility measured during the comparison of 3 different extenders ($N=7$). Different letters indicate statistically significant difference at the significance level of $P<0.05$. The columns represent mean and standard deviation.

A harmadik kísérletben a progresszív motilitás értéke mindkét spermavételi módszer (hagyományos fejés (65±35%), herepréselés (68±21%)) esetén hasonló volt (3. ábra). A minták progresszív motilitása között nem volt szignifikáns különbség a 0,5 (42±8%) és az 5 (28±12%) ml-es műszalmák összehasonlítása során. Mélyhűtést követően mindkét csoportnál szignifikáns csökkenés volt mérhető a progresszív motilitás esetén a friss spermához képest (73±19%) (4. ábra).

3. ábra: Kétféle mintavételi módszer összehasonlítása során, keltetőházi körülmények között mért progresszív motilitás (N=12). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

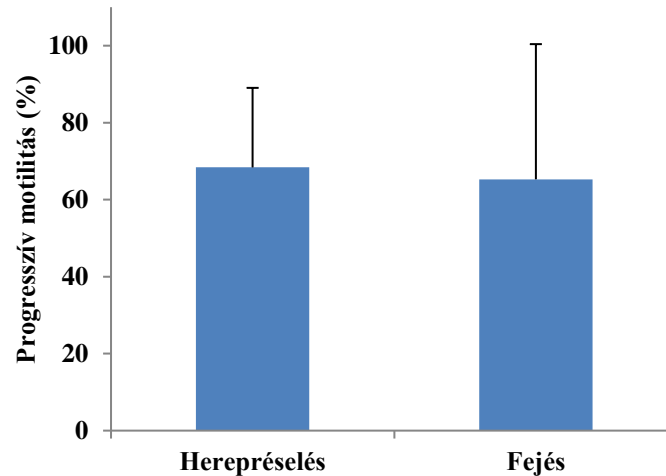


Figure 3: The progressive motility measured during the comparison of 2 different sampling methods at hatchery conditions (N=12). The columns represent mean and standard deviation.

4. ábra: A 0,5 ml-es és 5 ml-es műszalma összehasonlítása során, keltetőházi körülmények között mért progresszív motilitás (N=5). A különböző betűk statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek (P<0,05). Az ábrán átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások láthatók.

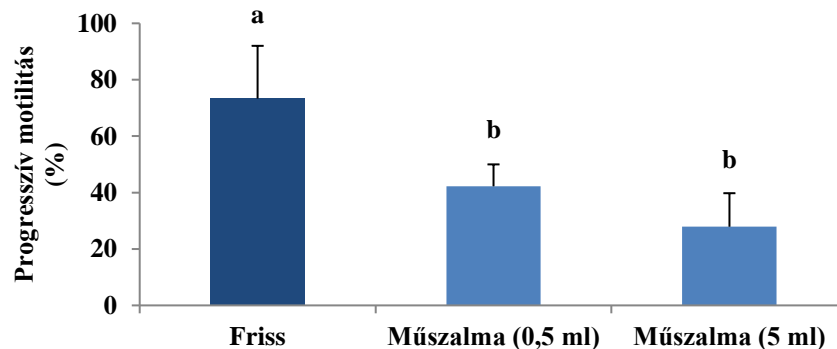


Figure 4: The progressive motility measured during the comparison of 0.5 and 5 mL straws at hatchery conditions (N=5). Different letters indicate statistically significant difference at the significance level of P<0.05. The columns represent mean and standard deviation.

Első kísérletünk folyamán a katéteres mintavételnél mértük a legmagasabb motilitást ($92\pm 5\%$), amihez hasonló értéket (90% felett) Glogowski et al. írt le 2000-ben szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) esetében. Hulak et al. 2008-ban a csuka (*Esox lucius*) sperma vizsgálata során két spermanyerési módszert hasonlított össze, a hagyományos fejest és a herepréselést. Kísérletünkkel ellentétben (hagyományos fejes ($5\pm 7\%$) és herepréselés ($63\pm 12\%$) nem találtak szignifikáns különbséget a két módszer között. A fejes hátrányának tulajdonították azonban, hogy a másik mintavételi módszerrel szemben kisebb mennyiségű, illetve szennyezettebb minta nyerhető ki, ami esetünkben is tapasztalható volt. Eredményeink és a korábbi irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a különböző módszerek hatékonysága fajspecifikus lehet.

A korábban más fajoknál eredményesen tesztelt oldatok közül (Bernáth et al. 2015, Várkonyi et al. 2018), a módosított Tanaka hígító bizonyult optimálisnak a kősüllő sperma fagyasztása során. Az egyetlen kősüllő fajban megjelent spermamélyhűtési irodalmi adattal (Bokor et al. 2007, $30\pm 10\%$ -os motilitás) ellentétben a glükóz hígító alacsony eredményt mutatott a felolvasztást követően.

A hagyományos fejes és a herepréselése egyaránt nagy hatásfokkal működött a keltetőházi vizsgálatunkban. Bokor et al. (2019) szintén keltetőházi körülmények között herepréselés alkalmazásával végzett mintavételt európai harcsa (*Silurus glanis*) esetében. A sejtek progresszív motilitása ugyancsak magas, $89\pm 3\%$ volt. Bokor et al. 2007-ben fogassüllőben leírt tanulmányában $45\pm 30\%$ -os motilitást mért hagyományos fejes alkalmazásával keltetőházi körülmények között. Vizsgálatunk során magas $65\pm 35\%$ -os progresszív motilitást rögzítettünk a kősüllő sperma esetén, mely igazolta, hogy a két rokonfaj esetében egyaránt használható az említett módszer. A keltetőházi mélyhűtési kísérletünkben mindkét méretű műszalma egyaránt alkalmazhatónak bizonyult. Bokor et al. 2008-as 0,5 ml-s műszalmával végzett kutatása során a fogassüllő esetén $53\pm 5\%$ -os motilitást rögzített. A kősüllőnél kapott progresszív motilitás a 0,5 ml-es úrtartalom esetén szintén hasonló volt ($42\pm 8\%$).

Következtetések és javaslatok

Az eredmények alapján hatékony sperma kinyerési módszerek bizonyult a hagyományos, a katéteres fejes, valamint a herepréselés egyaránt, a legnagyobb ivarsejt mennyiséget azonban az utóbbi módszer eredményezte. A hagyományos fejes esetén az ivartermék könnyen szennyeződhet vizelettel vagy bélsárral, ami nagymértékben befolyásolja a sperma minőségét. A here préselését javaslom alkalmazásra a keltetőházi szaporítás során a megfelelő mennyiség és minőségű hím ivartermék kinyeréséhez. A 3 különféle hígító összehasonlítása során a módosított Tanaka bizonyult a legeredményesebbnek a kősüllő sperma mélyhűtéséhez. Keltetőházi körülmények között igazoltuk az általunk kidolgozott mélyhűtési módszerek alkalmazhatóságát a faj spermájának fagyasztása során.

Köszönetnyilvánítás

A kísérletek végrehajtásához a GINOP-2.3.2-15-2016-00004, a Halászati Operatív Program III. tengelye, és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 pályázatok járultak hozzá. A kutatás 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 készült.

Irodalomjegyzék

- Bernáth G., Csenki Zs., Bokor Z., Várkonyi L., Molnár J., Szabó T., Staszny Á., Ferincz Á., Szabó K., Urbányi B., Pap L.O., and Csorbai B. (2018): The effects of different preservation methods on ide (*Leuciscus idus*) sperm and the longevity of sperm movement. *Cryobiology*, 81. 125-131.
- Bernáth G., Żarski D., Krejszef S., Palińska-Żarska K., Bokor Z., Król J., Kollár T., Kucharczyk D., Urbányi B., and Horváth Á. (2015): Optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 31. 1. 94-98.
- Bernáth G., Várkonyi L., Szanati E., Molnár J., Kajtár A., Solymosi E., Urbányi B., and Bokor Z. (2017): Practical improvement of pike (*Esox lucius*) sperm cryopreservation. *Aquaculture Europe*, Dubrovnik, Croatia, Október 17-20
- Bokor Z., Bernáth G., Várkonyi L., Molnár J., Láng L.Z., Tarnai-Király Zs., Solymosi E., and Urbányi B. (2019): The applicability of large-scale sperm cryopreservation in wels catfish (*Silurus glanis*) optimized for hatchery practice. *Aquaculture*, 506. 337-340.
- Bokor Z., Horváth Á., Horváth L., and Urbányi B. (2008): Cryopreservation of pike perch sperm in hatchery conditions. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 60. 168-171.
- Bokor Z., Müller T., Bercsényi M., Horváth L., Urbányi B., and Horváth Á. (2007): Cryopreservation of sperm of two European percid species, the Pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga pikeperch (*S. volgensis*). *Acta Biologica Hungarica*, 58. 199-207.
- Bozkurt Y. (Eds.) (2019): *Biological Research in Aquatic Science*, 11-36.
- Glogowski J., Kwasnik M., Piros B., Dabrowski K., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., and Ciereszko A. (2000): Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Research*, 31. 289-296.
- Holcik J. (2003): Changes in the fish fauna and fisheries in the Slovak section of the Danube River: a review. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 39. 3. 177-195.
- Horváth Á., Miskolci E., and Urbányi B. (2003): Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, 16. 5. 457-460.
- Hulak M., Rodina M., and Linhart O. (2008): Characteristics of stripped and testicular northern pike (*Esox lucius*) sperm: spermatozoa motility and velocity. *Aquatic Living Resources*, 21. 2. 207-212.
- Szabó G., Müller T., Molnár T.G., Sudár G., Zake Z., Hancz Cs. (2009): Különböző takarmányadagok hatása a kösüllő (*Sander volgensis* Gmelin 1788) növekedésére és testösszetételére intenzív nevelés mellett. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 17. 1. 37-46.
- Várkonyi L., Bokor Z., Molnár J., Fodor F., Szári Zs., Ferincz Á., Staszny Á., Láng L.Z., Csorbai B., Urbányi B., and Bernáth G. (2018): The comparison of two different extenders for the improvement of large-scale sperm cryopreservation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Reproduction in Domestic Animals*, 54. 3. 639-645.