



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**A HALSPERMA MINŐSÍTÉSI RENDSZERÉNEK  
GAZDASÁGI CÉLÚ FEJLESZTÉSE**

Doktori értekezés tézisei

Bernáth Gergely

Gödöllő

2016

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Mezőgazdaság-tudomány

**vezetője:** Dr. Mézes Miklós  
egyetemi tanár, az MTA levelező tagja  
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és  
Környezettudományi Kar, Állattudományi  
Alapok Intézet Takarmányozástani Tanszék

**Témavezető:** Dr. Horváth Ákos  
tudományos főmunkatárs, PhD  
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és  
Környezettudományi Kar, Akvakultúra és  
Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási  
Tanszék

.....  
A programvezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## Rövidítések jegyzéke

Teljes név	A szövegben használt rövidítés
Bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)	BSA
Computer-assisted Sperm Analysis (számítógépes spermavizsgáló rendszer)	CASA
Controlled-rate freezer (programozható mélyhűtő berendezés)	CRF
Curvilinear velocity (sebesség)	VCL
Deszillált víz	Dv
Hank's Balanced Salt Solution (Hank's féle sóoldat)	HBSS
Horváth et al. módszer (Horváth et al. 2012)	Hm
Lahnsteiner et al. módszer (Lahnsteiner et al. 1996)	Lm
Lahnsteiner-féle általános sügér aktiválóoldat (Lahnsteiner 2011)	Sa
Módosított Lahnsteiner-féle aktiváló oldat (Lahnsteiner 2011)	La
Módosított Lahnsteiner-féle immobilizáló oldat (Lahnsteiner 2011)	Li
Módosított pér hígító	MPh
Módosított Tanaka hígító (Szabó et al. 2005)	Th
Nynca et al. módszer (Nynca et al. 2015)	Nm
Pér hígító (Horváth et al. 2012)	Ph
Ponty szemínális folyadék	Szf
Módosított pontyfélék aktiválóoldat (Saad et al. 1988)	Pa
Progressive motility (progresszív motilitás)	pMOT
Propídium-jodid	PI
Straightness (egyenesség)	STR
Woynárovich oldat (Woynárovich és Woynárovich 1980)	Wo

# 1. BEVEZETÉS

A halsperma-mélyhűtés a genetikai tartalékok megőrzése és a gyakorlati állattenyésztés során egyaránt nagyon fontos biotechnológiai eljárás. A sperma fagyasztásos tárolásának számos előnye lehet, pl. az aszinkron gametogenezis során mind a két ivarban a legjobb minőségű ivarterméket használhatjuk, egyszerűsítheti a termelést, lehetővé teszi az ivarsejtek szállítását és kereskedelmét, segíti a veszélyeztetett fajok megmentését, a genetikai szelekciót és irányított tenyésztést, valamint a génbankok létrehozását (Cabrita et al. 2010). A halak esetében az első sikeres spermamélyhűtés egyidős más háziállatokéval, ám míg a nagytestű emlősök körében az elmúlt több mint 50 évben a módszer több millárd dolláros üzletgáá nőtte ki magát, addig a halak esetében a gyakorlati alkalmazás továbbra is várat magára.

A mélyhűtés gazdaságosságának növelése és sikeres alkalmazásának egyik alapfeltétele a módszerek fejlődése (Tiersch 2008). Az egységes módszertan hiánya, valamint a közölt metodikák gyenge ismételtetősége súlyos akadálynak bizonyult a sperma manipulációjával járó technikák (pl. a mélyhűtés) halgazdálkodás gyakorlatában való elterjedésében (Cabrita et al. 2010, Tiersch 2008). Az eredményeket egy egységes rendszerbe kell beépíteni, amely a szaporodásbiológiai és genetikai információt egyaránt magába foglalja. A rendszer részét kell, hogy képezze a minták hosszú távú hatékony és szelektív tárolása, valamint azok minőségének ellenőrzése. Az infrastruktúra fejlesztése keretében adatbázisok és tároló állomások létrehozásával mindenki számára elérhetővé válhat ez a szolgáltatás. A folyamatban fontos szerepe lehet a kutatómunka mellett a gyakorlati szakemberek képzésének. A módszerek elterjedésének és gyakorlati alkalmazásának elengedhetetlen feltétele az anyagi háttér megteremtése. A nemzetközi menedzsment, támogatási rendszerek és pénzügyi alapok nagyban meggyorsíthatják a sztenderdizációs folyamatot világszerte (Aquagamete Cost Action 2015, Tiersch 2008).

## 1.1. Célkitűzések

**Kutatásom során a következő kísérletek megvalósítását tűztem ki célul:**

1. A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata a természetvédelmi és gazdasági szempontból egyaránt jelentős lénai tok (*Acipenser baerii*) és vágótok (*Acipenser gueldenstaedtii*) fajokban.
2. A sügérsperma minőségvizsgálatának és mélyhűtésének optimalizációja.
3. A pontysperma (*Cyprinus carpio*) mélyhűtésének sztenderdizációja.
4. A sperma tárolhatóságának vizsgálata és mélyhűtése különböző aranyhal-változatokban.
5. A sebes pisztráng (*Salmo trutta* m. *fario*) és márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) mélyhűtött spermáján a felolvasztás utáni tárolhatóság vizsgálata, illetve az utóbbi faj esetében a metanol és dimetil-szulfoxid (DMSO) mint védőanyagok összehasonlítása. A felolvasztás utáni sperma-ikra arány meghatározása és különböző spermamélyhűtési módszerek összehasonlítása az adriai pénzes pérben (*Thymallus thymallus*).

## **2. VIZSGÁLATOK, EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK A KÜLÖNBÖZŐ RENDSZERTANI CSOPORTOKBAN**

### **2.1. A spermavizsgálat és -mélyhűtés részfeladatainak általános összefoglalása**

A vizsgált halfajokban a használt módszertan egy része megegyezett. Az anyákat nedves törölközőre helyeztem, és a hasfal masszázásával nyertem ki az ivarterméket. A tejet minden esetben 4 °C-on, az ikrát fajtól függően (meleg és hideg vízben ívó) keltetőházi körülmények között, illetve szintén 4 °C-on (hűtőszekrényben) tároltam. A friss és felolvasztott spermaminták motilitását számítógépes spermavizsgáló berendezéssel (CASA) rögzítettem. A munkám során két különböző rendszert alkalmaztam. A magyarországi és szlovén vizsgálataimban a Sperm Vision™ v. 3.7.4. (Minitube of America, Venture Court Verona), Lengyelországban végzett kutatásaimban a Sperm Class Analyzer v. 4.0.0. (Microptic S.L., Barcelona) rendszereket használtam. A sperma aktivációját Makler-kamrában (Sefi-Medical Instruments Ltd.) végeztem fajspecifikus, vagy a kísérleti beállításnak megfelelő oldattal. Az aktiváló oldatokhoz minden esetben 0,01 g/ml szarvasmarha szérumban albumint (BSA) kevertem, meggátolva ezzel a sejtek letapadását. A méréseket minden esetben legalább 2 ismétlésben végeztem el. Kísérlettől függően a sperma progresszív motilitását (pMOT), az egyenes ívmozgás sebességét (VCL) és a sejtek egyenes vonalú mozgásának arányát (STR) rögzítettem (WHO 2010). A paraméterek kiválasztása irodalomban megjelent közlemény alapján történt (Rurangwa et al. 2004, WHO 2010a, Wilson-Leedy és Ingermann 2007). A 3 paraméter a mozgás 3 különböző tulajdonságát írja le. A sejtsűrűség meghatározására Bürker-típusú sejtszámláló kamrát (Marienfield Superior, Paul Marienfield GmbH), valamint fénymikroszkópot (Nikon Eclipse E600, Auroscience, Budapest) használtam. A mélyhűtés során 0,5 ml-es műszalmákat alkalmaztam. A mintákat különböző hígítókból immobilizáltam (vizsgálat szerint), és 10% metanollal (védőanyag)

kevertem össze. Kutatásomban a kísérlettől függően kétféle mélyhűtési módszert vettem igénybe. A polisztirool hűtődoboz (folyékony nitrogénnel 3 cm magasan feltöltve) alkalmazása során a mintákat egy 3 cm vastag hűtőkereten 3 percig fagyasztottam, majd a szalmákat a nitrogénbe helyeztem 5 percre (Horváth et al. 2012). A másik eljárás során a spermát egy programozható mélyhűtő berendezésben (CRF, IceCube 14s, IceCube Series v. 2.24, Sy-Lab, Neupurkersdorf) fagyasztottam le (kiindulási hőmérséklet: 7,5 °C, végpont: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc). A programot a sügér fajban végzett kísérletek során dolgoztam ki. A műszalmákat 10 (Bio 20, Statebourne Cryogenincs) vagy 35 l-es (VWR XSS 48/10, VWR International, Debrecen) úgynevezett kaniszteres kannában tároltam. A mintákat vízfürdőben (ThermoHaake P5, Thermo Electron, Waltham) olvasztottam fel 40 °C-on 13 másodpercig (Horváth et al. 2012). A termékenyülést sztereomikroszkóppal határoztam meg (Leica MZ16.5, Wetzlar, Carl Zeiss Jena Technical Carl Zeiss GmbH). Az adatok elemzését minden esetben a Microsoft Excel (Microsoft, Redmond), SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago) és GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad, La Jolla, California) programok felhasználásával végeztem. A csoportok normál eloszlását Kolmogorov-Szmirnov, Shapiro-Wilk, és Jarque-Berrával tesztekkel ellenőriztem. A normál eloszlást nem mutató adatsorokat logaritmizáltam (VCL), vagy arkusz-színusz négyzetgyök függvénnyel (pMOT, STR, termékenyülési arány) transzformáltam. A különböző csoportok összehasonlításánál egyszempontos, illetve többszempontos varianciaanalízist (ANOVA), Kruskal-Wallis-, Student-féle független kétmintás t-próbát, Welch- valamint Mann-Whitney-teszteket alkalmaztam. A csoportok közötti különbségek kimutatásához Dunn-, Tukey-, Bonferroni-, vagy Dunett-T3 post-hoc teszteket használtam. A változók közötti összefüggések vizsgálatánál általánosított lineáris modellt és töbttényezős regressziót alkalmaztam. A hipotézisvizsgálatot minden esetben  $P \leq 0,05$  szignifikancia szinten végeztem. A felhasznált vegyszereket a Reanal (Budapest), POCH (Gliwice, Lengyelország) és Sigma-Aldrich (Budapest) cégektől

szereztem be. A fentiekben részletezett módszertantól való eltéréseket, valamint a módszerek egyedi alkalmazását a továbbiakban az adott fejezetben külön ismertetem.

## 2.2. Vizsgálatok tokfélékben (*Acipenseridae*)

### 2. táblázat. Általános módszertan a tokfélékben.

Vizsgált fajok	lénai tok és vágótok (2-2 tejes)
Motilitásvizsgálat	vizuálisan fénymikroszkóppal (friss sperma) és CASA berendezéssel (felolvasztás után), aktiváció: sóoldat (Horváth szóbeli közlése alapján)
Mélyhűtés	módosított Tsvetkova-féle hígító (Glogowski et al. 2002), 1:1 hígítási arány

#### Mélyhűtött toksperma felolvasztás utáni motilitásvizsgálata ( $N=10$ )

A mélyhűtött lénai tok és vágótok spermátételeket a felolvasztás után 12 órán keresztül tároltam (pMOT: óránként).

#### Mélyhűtött toksperma felolvasztás utáni életképesség-vizsgálata ( $N=10$ )

A mintákat 12 órán át tároltam és 3 óránként festettem meg sejtffestékekkel (SYBR green-ép és PI-sérült).

#### *2.2.1. A tokfélékben végzett vizsgálatok eredményei*

A lénai tok sperma 6 és 12 óra között mért motilitás értékei statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak a közvetlenül felolvasztás után mért átlagos motilitáshoz képest ( $50\pm 24\%$ ). A spermiumok életképessége szignifikánsan nem csökkent. Az átlagos motilitási értékek a vágótok esetében 2, illetve 12 óra tárolási idő között már szignifikánsan alacsonyabbak voltak a közvetlenül felolvasztás után mért eredményhez képest ( $32\pm 10\%$ ). A spermiumok membrán-integritás vizsgálata lénai tokhoz hasonló eredményt mutatott.



### **2.2.2. A tokfélékben végzett vizsgálatok alapján levonható következtetések**

Eredményeim alapján kijelenthetem, hogy mindkét általam vizsgált tokféle spermája felolvasztás után hosszú ideig tárolható. A két faj közül azonban a vágótok-sperma érzékenyebbnek bizonyult.

### **2.3. Vizsgálatok a sügér fajban**

#### **3. táblázat. Általános módszertan a sügérben.**

---

<b>Állomány</b>	120 tejes és 36 ikrás
<b>Motilitásvizsgálat</b>	kétféle CASA rendszer alkalmazása (friss és felolvasztott sperma, <b>2.1.</b> fejezet)
<b>Oldatok</b>	Immobilizáló oldatok és hígítók: Ph, Th, Li Aktiváló oldatok: Pa, Sa, La, Wo
<b>Mélyhűtés</b>	hűtődoboz és CRF ( <b>2.1.</b> fejezet)

---

#### **2.3.1. A sügérsperma minőségvizsgálatának és mélyhűtésének optimalizációja**

A mélyhűtés során minden esetben hűtődobozt alkalmaztam.

##### A legjobb immobilizáló oldat kiválasztása (N=10)

A Th, Ph és Li oldatoknak a motilitásra gyakorolt hatását hasonlítottam össze 6 órás hígított tárolás során (pMOT: 2 óránként).

##### A legjobb aktiváló oldat kiválasztása I. (N=10)

A vizsgálatok során négyféle aktiváló oldatot (Pa, Sa, La és Wo) hasonlítottam össze (pMOT: 10, 30, 60, 90 és 120 mp-nél rögzítve).

##### A legjobb aktiváló oldat kiválasztása II. (N=10)

A fentebbi vizsgálatot módosítva, az adatokat 10, illetve 20 mp-nél rögzítettem.

##### A frissen lefejt sügérsperma tárolhatóságának vizsgálata (N=10)

A mintákat előhígítatlanul tároltam (6 óra) és óránként megmértem motilitásukat.

### A legjobb spermamélyhűtéshez használt hígító kiválasztása (N=7)

Vizsgálatom során a Th-t és Li-t mint hűtőmediumot hasonlítottam össze. A spermát 1:40 arányban hígítottam.

### A legjobb spermamélyhűtésnél alkalmazott hígítási arány kiválasztása (N=10)

A mélyhűtés (Th) során a következő hígítási arányokat teszteltem minden spermaminta esetében: 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40.

### A felolvasztott sügérsperma tárolhatósága 1, illetve 6 órán keresztül (N=10)

A felolvasztott mintákat (Th, 1:20) 1, illetve 6 órán keresztül tároltam, rögzítve a motilitást 15, illetve 120 perces időintervallumokban.

### A felolvasztott sügérsperma termékenyítőképesége (N=9)

A mélyhűtött (Th oldat használatával, 1:20-as hígítási arány) és a felolvasztott mintákkal termékenyítést végeztem.

## ***2.3.2. Két spermamélyhűtési módszer összehasonlítása a sügér fajban***

### A két mélyhűtési módszer összehasonlítása (N=5)

A mélyhűtés megkezdése előtt a hűtési görbét egy digitális hőmérő-szenzor segítségével mértem meg 3 cm-rel a folyékony nitrogén felülete felett (hűtési program megalkotása a CRF-hez, **2.1.** fejezet). A mélyhűtést (Th, 1:20) polisztirol dobozzal, valamint programozható fagyasztó berendezéssel egyaránt elvégeztem.

### A megfelelő hígítási arány kiválasztása a CRF-hez (N=4)

A felolvasztott (Th, CRF) sperma motilitását hasonlítottam össze 3 különböző hígítási arány alkalmazásával (1:5, 1:10, 1:20).

### **2.3.3. Nagy mennyiségű ivási időszakon kívül lefejt sügérsperma mélyhűtése**

Az ekvilibrációs idő, kihígított és felolvasztott sperma motilitására kifejtett hatásának vizsgálata (N=5)

Az előhígított és felolvasztott (Th, hűtődoboz, 1:20) minták motilitását rögzítettem 0, 30, és 60 perces ekvilibrációt követően.

A felolvasztás utáni progresszív motilitás, hígítási arány és sejtkoncentráció közötti összefüggés vizsgálata (N=5)

A felolvasztott (CRF, Th) sperma pMOT, sejtsűrűség (2.1. fejezet) és hígítási arány (1:5, 1:10, 1:20) közötti összefüggést vizsgáltam meg.

Felolvasztás utáni mozgás időtartam mérése (N=6)

A felolvasztott sperma motilitását 10, 20, 30, 60, 90, illetve 120 perccel az aktivációt (Pa, Sa, La, Wo) követően rögzítettem.

Szezonon kívül, nagy mennyiségben mélyhűtött sperma felhasználása a termékenyítés során (N=6)

A 67 db mélyhűtött (Th, 1:10, CRF) szalmából 57-et motilitás vizsgálat, 10-et pedig termékenyítés során teszteltem.

### **2.3.4. A sügér fajban végzett vizsgálatok eredményei**

Az immobilizáló kiválasztása során a legmagasabb progresszív motilitás értékeket 0, 2, 4 és 6 órás kihígított tárolást követően Lahnsteiner-féle immobilizáló (Li) esetében rögzítettem. Az aktiváló oldatok összehasonlítása során, 30 másodperc elteltével minden vizsgált aktiváló oldat esetében 5 % alá csökkent a motilitás. Húsz másodperc alatt a legkisebb mértékű motilitáscsökkenést Lánál mértem. A tesztelt aktiválók között nem fedeztem fel különbséget a különböző időpontokban (10, 20, 30, 60, 90, 120 mp) rögzített pMOT, VCL és STR paraméterek felolvasztást követő vizsgálata során. A 6 órás natív tárolás során a motilitás 2 óra elteltével szignifikánsan csökkent. A Th (54±14%) eredményesebbnek bizonyult a sügérsperma mélyhűtésénél, mint a

Li ( $19\pm 17\%$ ). A legmagasabb motilitást a kísérletek során az 1:10 és 1:20 hígítási aránynál mértem. A felolvasztott sperma tárolásánál a motilitás negyed óra után már csökkenést mutatott, ám szignifikáns csökkenést csak 2 óra elteltével tapasztaltam. A CRF és hűtődoboz motilitás paraméterei számottevően nem különböztek a felolvasztás után. A pMOT és STR értékek esetében nem találtam szignifikáns különbséget a kihígított minták között a különböző ekvibrációs idők (0, 30 illetve 60 perc) esetében. A felolvasztott sperma motilitás paraméterei nem csökkentek a 60 perces ekvibrációs idő hatására. A kis mennyiségben mélyhűtött sperma termékenyítő-képessége  $75\pm 6\%$ , progresszív motilitása  $58\pm 25\%$  volt. A nagy mennyiségű szalma mélyhűtése során optimális pMOT ( $37\pm 7\%$ ), VCL ( $92\pm 10 \mu\text{m/s}$ ), STR ( $89\pm 3\%$ ) értékeket, valamint magas,  $72\pm 14\%$ -os termékenyülést rögzítettem.

### ***2.3.5. A sügér fajban végzett vizsgálatok alapján levonható következtetések***

A legalkalmasabb immobilizáló oldatnak az Li bizonyult a 6 órás vizsgálat eredményei alapján. A motilitás mérésére rövid idő (10-20 másodperc) áll rendelkezésre, de az eljárás során La sikerrel alkalmazható. A felolvasztás utáni aktivációs idő vizsgálata hasonló tendenciát mutatott, mint a frissen lefejt sperma esetében. Az Sa egyszerű összetételének köszönhetően könnyen adaptálható és sztenderdizálható aktiváló a termékenyítési kísérletekben és a keltetőházi szaporításban egyaránt. A friss és felolvasztott minták motilitását 2 óra tárolás számottevően befolyásolta. Kísérleteim során eredményesen alkalmaztam a sügérsperma mélyhűtésére a korábban európai angolna sperma fagyasztására használt módosított Tanaka hígítót (Szabó et al. 2005). Vizsgálataim során a sügérsperma nagyobb mértékű toleranciát mutatott a fagyasztás okozta sérülésekkel szemben magasabb hígítási arányok mellett (1:10 és 1:20). A kihígított és felolvasztott csoportok progresszív motilitás és STR értékeit jelentősen nem befolyásolta az 1 órás ekvibrációs idő, ami számos szalma megtöltését teszi lehetővé. A CRF és a hűtődoboz hasonlóan jól alkalmazhatónak bizonyult a

mélyhűtés során. A mélyhűtött spermát sikeresen használtam fel a termékenyítési tesztekben (hűtődoboz: 75%, CRF: 72%).

## 2.4. Pontyfélékben (*Cyprinidae*) végzett vizsgálatok

### 4. táblázat. Általános módszertan a pontyfélékben.

Faj	Ponty	Aranyhal
Motilitásvizsgálat	CASA (friss és felolvasztott sperma)	
Oldatok	Aktiváló oldatok: Pa, Dv Hígítók: Ph, MPh (kevesebb cukor, több KCl), Szf, HBSS	Hígító illetve aktiváló: Ph és Pa
Mélyhűtés	hűtődoboz és CRF (2.1. fejezet)	hűtődoboz

#### 2.4.1. A pontyban végzett vizsgálatok

##### Az ekvilibráció hatásának vizsgálata (N=6)

Az előhígított felolvasztott (Ph, hűtődoboz, 1:9) minták motilitását rögzítettem 0, 30 és 60 perces ekvilibrációt követően.

##### Két mélyhűtési módszer összehasonlítása (N=4)

Minden egyed mintájából egy-egy műszalmát mélyhűtöttem mindkét módszerrel (Ph, 1:9).

##### Háromféle hűtőmédiium vizsgálata a spermamélyhűtés során (N=5)

Minden csoportból (Ph, Szf, HBSS) az összes mintával mélyhűtést végeztem (CRF, 1:9).

##### Kétféle pér hígító és négyféle hígítási arány vizsgálata (N=6)

A mélyhűtést (CRF) 1:1, 1:5, 1:9 és 1:20 arányban, Ph és MPh alkalmazásával végeztem el.

##### Felolvasztás utáni mozgási időtartam vizsgálata (N=6)

A mélyhűtött (CRF, Ph, 1:9) és felolvasztott mintákat Dv- és Pa-val egyaránt külön aktiváltam (mérés: 10, 20, 30, 60, 90, 120 mp).

### A mélyhűtött sperma felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata (N=6)

A felolvasztott mintákat (CRF, Ph, 1:9) 1, illetve 6 órán keresztül tároltam, rögzítve a motilitást 15, illetve 120 perces időintervallumokban.

### Nagymennyiségű pontysperma mélyhűtése és alkalmazása termékenyítés során (N=6)

Összesen 104 műszalmányi kevert spermamintát fagyasztottam le (CRF, Ph, 1:9) és alkalmaztam a termékenyítés során.

### ***2.4.2. Különböző aranyhalváltozatokban végzett vizsgálatok***

#### Többféle aranyhalváltozat spermájának együttes tárolhatósága (elővizsgálat, N=5)

A mintákat kétféle hőmérsékleten tároltam (4 °C, illetve 20 °C-on) 10 órán keresztül (pMOT: óránként).

#### A fekete teleszkópszemű (N=4), az Oranda (N=3) és a Calico (N=3) aranyhalváltozatok spermájának fejés utáni tárolhatóságának vizsgálata

A spermamintákat fejést követően tároltam 4 °C-on 48 órán keresztül (pMOT: 6 óránként).

#### A három aranyhalváltozat spermasűrűségének összehasonlítása

A tárolási vizsgálatban említett különböző változatoktól lefejt spermamintákból 1µl spermát kihígítottam 999 µl pér hígítóban (1000-szeres hígítás, módszertan: 2.1. fejezet).

#### A három aranyhalváltozat spermájának felolvasztás utáni tárolhatóságának vizsgálata (N=5)

A vizsgálat során a mélyhűtött (hűtődoboz, Ph, 1:9) mintákat a felolvasztást követően 6 órán át tároltam (pMOT: 2 óránként).

### Termékenyítési kísérlet Oranda (N=5) és Calico (N=5) változatokban

Felolvasztott (hűtődoboz, Ph, 1:9) Oranda és Calico spermával termékenyítést végeztem.

#### ***2.4.3. A pontyfélékben végzett vizsgálatok eredményei***

A ponty és aranyhal sperma 50%-ban agglutinálódott a mélyhűtés hatására különböző pér hígítók alkalmazásával. A motilitásmérést a jelenség ellenére el tudtam végezni.

A kihígítás és felolvasztás után mért pMOT, VCL és STR értékek nem csökkentek szignifikánsan az 60 perc ekvilibrációs idő hatására. Hasonló motilitás értékeket rögzítettem a hűtődoboz és a fagyasztó berendezés segítségével mélyhűtött sperma esetében. Szignifikánsan magasabb pMOT és VCL értékek voltak megfigyelhetők pér hígítóval, mint HBSS-sel és a szeminális folyadékkal. A legmagasabb felolvasztás utáni pMOT és VCL a pér hígító 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 Pa-val aktivált csoportokban még 120 másodperc elteltével is mértem aktív mozgást. A mélyhűtött pontysperma pMOT, VCL, STR értékei nem csökkentek 1, illetve 6 órás felolvasztás utáni tárolás során. Nagymennyiségű 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, valamint  $32\pm 6\%$ -os termékenyülést rögzítettem.

A kevert aranyhal-állományon végzett vizsgálatban, a lefejt spermaminták pMOT értékei nem csökkentek 10 órás tárolás alatt. A  $4^\circ\text{C}$ -on tárolt minták esetében még 27 óra elteltével is pMOT-t mértem ( $64\pm 15\%$ ). A 3 aranyhal változat spermamintájának 48 órás tárolásakor az Oranda változat esetében szignifikáns csökkenést tapasztaltam a pMOT és VCL értékekben a kontrollhoz képest 48 óra után. A változatok spermájának sűrűsége nem különbözött szignifikánsan. A felolvasztott Calico aranyhalsperma esetében 6 óra tárolás után szignifikánsan alacsonyabb pMOT-t rögzítettem,

mint 0 óránál. Az Oranda, illetve Calico változatok mélyhűtött spermája alacsony termékenyülést eredményezett.

#### ***2.4.4. A pontyfélékben végzett vizsgálatok alapján levonható következtetések***

A pontysperma felolvasztás előtti és utáni motilitási paramétereire nem volt hatással az ekvilibrációs idő. Mindkét vizsgált mélyhűtési módszer alkalmas a sperma mélyhűtésére. A pontysperma esetében bebizonyosodott, hogy a gyors (56 °C/perc), egylépcsős fagyasztási eljárás magas felolvasztás utáni motilitást eredményez. Eredményeim alapján a pontyspermát 1:9 hígításban ajánlott a magasabb glükóz tartalmú pér hígítóban kihígítani a mélyhűtést megelőzően. A pontysperma esetében a termékenyítés során a Pa alkalmazása indokolt, hiszen a hosszabb mozgási időtartam nagyobb esélyt biztosít a termékenyítésre. Esetemben a pontysperma motilitása magas maradt 6 óra elteltével is, ami lehetővé teszi a termékenyítésre való felhasználhatósági idő meghosszabbítását. A termékenyülésben tapasztalt csökkenés a felolvasztott sperma agglutinációjával állhatott összefüggésben.

Az eredmények alapján az Oranda változat spermája kevésbé bizonyult ellenállóknak a 48 órás tárolási idő során, míg a Calico változat spermája érzékenyebbnek bizonyult a felolvasztás utáni tárolásra. Alacsony termékenyülést rögzítettem felolvasztott sperma alkalmazásával az Oranda és Calico változatok esetében, mely valószínűsíthetően az ikra szállítása során adódó tárolási idő és a sperma felolvasztást követő agglutinációja miatt következett be.



## 2.5. Vizsgálatok lazacfélékben (*Salmonidae*)

### 5. táblázat. Általános módszertan a lazacfélékben.

<b>Faj</b>	sebes pisztráng	márványpisztráng	adriai pér
<b>Motilitásvizsgálat</b>	CASA (friss és felolvasztott sperma, 2.1. fejezet)	fénymikroszkóp, CASA (friss és felolvasztott sperma)	
<b>Oldatok</b>	aktiváló: Billard-féle termékenyítő oldat (Billard 1977) hígító: Ph		Lásd: kísérleti terv
<b>Mélyhűtés</b>		hűtődoboz, 1:4	hűtődoboz, Lásd: kísérleti terv

#### 2.5.1. A sebes pisztrángban végzett vizsgálatok

##### A felolvasztott sperma motilitása 60 perces tárolás során (N=6)

A mélyhűtés (1:4 hígítás) és felolvasztás után 0, 10 és 60 perc elteltével rögzítettem a progresszív motilitást.

##### Termékenyítési kísérlet (N=6)

A fent említett spermamintákkal a termékenyítést felolvasztást követően 0, 10 és 60 perc elteltével végeztem el.

#### 2.5.2. A márványpisztrángban végzett vizsgálatok

##### A felolvasztott sperma motilitása 60 perces tárolás során (N=5)

A mélyhűtés (Ph, 1:4) során védőanyagként 10% metanolt vagy dimetil-szulfoxidot (DMSO) alkalmaztam. Felolvasztás után 0, 10 és 60 perc elteltével rögzítettem a progresszív motilitást.

##### Termékenyítés (N=5)

A kétféle védőanyaggal fagyasztott mintákból (lásd: előző kísérlet) termékenyítést végeztem 0, 10 és 60 perccel a felolvasztást követően.

### **2.5.3. Az adriai pérben végzett vizsgálatok**

#### Sejtkoncentráció meghatározása

Vizsgálatomban a megfelelő sperma-ikra arány teszteléséhez (2014) és különböző mélyhűtési módszerek összehasonlításához (2015) meghatároztam a mélyhűtésre és termékenyítésre kiválasztott mintáim sejtkoncentrációját (100-, vagy 1000-szeres hígítás, Ph, módszertan: **2.1.** fejezet).

#### Mélyhűtés (N=5)

2014-es kísérletemben (sperma-ikra arány meghatározása), Horváth et al. (2012) módszerét (Ph, 1:1) alkalmaztam, míg 2015-ös vizsgálatomban 3 publikált mélyhűtési eljárás eredményességét hasonlítottam össze [Hm, Lm (ion alapú hígító, 1:3), Nm (glükóz hígító, 1:5)].

#### Termékenyítési teszt (N=5)

2014-es kísérletemben a négy tesztelni kívánt sperma-ikra arány alapján ( $10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $5 \times 10^4$  spermium/ikraszem) végeztem termékenyítést. 2015-ös kutatásomban a háromféle publikált protokollal mélyhűtött mintákat alkalmaztam a termékenyítés során.

### **2.5.4. A lazacfélékben végzett vizsgálatok eredményei**

A sebes pisztráng esetében a legmagasabb pMOT ( $56 \pm 15\%$ ) és termékenyülés ( $45 \pm 22\%$ ) értékeket a felolvasztás után 10, illetve 60 perc elteltével rögzítettem. A márványpisztrángban a metanol esetében szignifikánsan magasabb termékenyülést és kelést rögzítettem a felolvasztás után 0 és 10 perc elteltével, mint a DMSO használatakor. Szignifikáns csökkenést rögzítettem a termékenyülés és kelés értékeknél a metanol alkalmazásával a 0 és 60 perces csoportok között. A DMSO esetében hasonló eredményt tapasztaltam a 0 és 10 perces, valamint a 0 és 60 perces csoportok között. A pérben végzett vizsgálatok során a legmagasabb termékenyülést ( $60 \pm 7\%$ ) és kelést ( $53 \pm 7\%$ ) az átlagosan  $5 \times 10^4$  spermiumot számláló csoportban értem el, amely a friss kontrolltól

szignifikánsan nem különbözött. Lm alkalmazásával szignifikánsan alacsonyabb pMOT-ot és termékenyülést mértem, mint Hm-mel. Hm és Nm használatával hasonló eredményeket értem el.

### ***2.5.5. A lazacfélékben végzett vizsgálatok alapján levonható következtetések***

Eredményeim alapján a sebes pisztráng sperma esetében a tárolási idővel szemben magas tolerancia volt megfigyelhető. A márványpisztráng sperma azonban érzékenynek bizonyult a tárolási időre. Utóbbi esetében beigazolódott, hogy a metanol sikeresebb védőanyag, mint a DMSO. Bizonyítottam, hogy a Nynca et al. (2015) által használt  $1,5 \times 10^5:1$  sperma-ikra aránynál jóval alacsonyabb mennyiségű sperma is sikeres termékenyülést eredményezhet ( $5 \times 10^4:1$ ). A különböző módszerek összehasonlítása során az általam használt Horváth et al. (2012), valamint Nynca et al. (2015) módszere a kontrollhoz hasonló termékenyülési eredményt hozott. Gyakorlati szempontból gazdaságosabb az általam alkalmazott 0,5 ml-es műszalma méret, szemben a Nynca et al. (2015) által alkalmazott 0,25 ml-es műszalmával, hiszen egyidejűleg több sperma mélyhűtését teszi lehetővé a kétszeres kapacitás.

## 2.6. Új tudományos eredmények

1. Meghatároztam a lénai tok és a vágótok sperma felolvasztás utáni felhasználhatóságának időbeni korlátait (lénai tok: 6 óra, vágótok: 2 óra).
2. Kidolgoztam egy hatékony spermavizsgálati (módosított Lahnsteiner-féle immobilizáló, illetve aktiváló és általános sügér aktiváló) és két mélyhűtési módszert a sügér fajban [módosított Tanaka hígító, 1:10 és 1:20 hígítási arány, 3 cm-en a folyékony nitrogén gőzében 3 percig, vagy programozható fagyasztó berendezéssel (hűtés kezdete: 7,5 °C, hűtés befejezése: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc)]. A fagyasztás kis és nagy mennyiségű minta esetében egyaránt magas termékenyülést eredményezett.
3. Egységesítettem a pontysperma mélyhűtésének egyes paramétereit (pér hígító, 1:9 hígítási arány). A módszert sikeresen teszteltem nagy mennyiségű sperma mélyhűtése során (programozható fagyasztó berendezés, hűtés kezdete: 7,5 °C, hűtés befejezése: -160 °C, hűtési sebesség: 56 °C/perc).
4. Meghatároztam a sebes pisztráng és márványpisztráng mélyhűtött spermájának fejés utáni felhasználhatóságának időbeni korlátait (60, illetve 10 perc). Utóbbi esetében kísérletesen bizonyítottam, hogy a metanol eredményesebben alkalmazható védőanyag a spermamélyhűtés során, mint a DMSO.
5. Az adriai pér sperma esetében eredményesen alkalmazható, felolvasztás utáni alacsony spermium-ikra arányt ( $5 \times 10^4$ :1) megállapítottam, valamint kísérletesen kiválasztottam a fagyasztás során jól működő leggazdaságosabb módszert.

## 2.7. Javaslatok

Eredményeim alapján a gyakorlati alkalmazás, illetve kísérletes körülmények között végzett vizsgálatok elősegítése céljából a következő javaslatokra szeretném felhívni a figyelmet:

1. Javaslom a mélyhűtött lénai toksperma felhasználását legfeljebb 6 órával, míg a vágótokét legfeljebb 2 órával a felolvasztást követően.
2. A sügérsperma minősítése során a minták kihígítására javaslom a módosított Lahnsteiner-féle immobilizáló, aktiválására pedig a módosított Lahnsteiner-féle aktiváló, vagy az általános sügéráktiváló alkalmazását.
3. A sügérsperma mélyhűtése során javaslom az 1:10-es hígítási arány, a módosított Tanaka hígító és a programozható berendezés használatát.
4. Javaslom a ponty esetében a pér hígító és 1:9-es hígítási arány alkalmazását, valamint a programozható berendezés felhasználását.
5. Javaslom a mélyhűtött márvány- és sebes pisztráng sperma felhasználást legfeljebb 1 órával a felolvasztást követően.
6. Az adriai pér sperma mélyhűtésére javaslom Horváth et al. (2012) módszerét, továbbá termékenyítésnél az  $5 \times 10^4$ :1-es sperma-ikra arány alkalmazását a felolvasztást követően.

## Az értekezés témakörében megjelent közlemények

### Tudományos közlemények folyóiratban

1. Horváth, Á., Jesenšek, D., Csorbai, B., Bokor, Z., Raboczki, 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.
2. Żarski, D., Horváth, Á., **Bernáth, G.**, Palińska-Żarska, K., Krejszeff, S., Müller, T., and Kucharczyk, D. (2014). Application of different activating solutions to in vitro fertilization of crucian carp, *Carassius carassius* (L.), eggs. *Aquacult International* 22, 173–184.
3. Horváth, Á., Bokor, Z., **Bernáth, G.**, Csenki, Z., Gorjan, A., Herráez, M.P., Urbányi, B., and Jesenšek, D. (2015). Very low sperm–egg ratios result in successful fertilization using cryopreserved sperm in the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 435, 75–77.
4. **Bernáth, G.**, Bokor, Z., Kása, E., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Kollár, T., Urbányi, B., Żarski, D., Radóczy Ifj., J., and Horváth, Á. (2015). Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. *Cryobiology* 70, 76–78.
5. **Bernáth, G.**, Żarski, D., Krejszeff, 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, 94–98.
6. Horváth, Á., Labbé, C., Jesenšek, D., Hoitsy, G., **Bernáth, G.**, Kaczkó, D., Bokor, Z., and Urbányi, B. (2015). Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. *Journal of Applied Ichthyology* 31, 119–124.
7. Lujčić, J., **Bernáth G.**, Marinović, Z., Radojković N., Simić, V., Ćirković, M., Urbányi B., Horváth Á. (2015). Fertilizing capacity and motility of tench *Tinca tinca* (L., 1758) sperm following cryopreservation. *Aquaculture Research* Elérhető online: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.12865/abstract>.
8. **Bernáth G.**, Bokor Z., Urbányi B., Horváth Á. (2015). Veszélyeztetett tokfélék mélyhűtött spermájának felolvasztás utáni minőség-ellenőrzése. *Halászat*, Vol. 108 (1) pp. 32-36.
9. Bokor Z., **Bernáth G.**, Kása E., Várkonyi L., Hegyi Á., Kollár T., Urbányi B., Zarski, D., Radóczy J. Ifj., Horváth Á., (2015). Két spermamélyhűtési eljárás alkalmazhatóságának összehasonlítása csapósüger (*Perca fluviatilis*) fajban. *Halászat* Vol. 108 (3). pp. 25-28.

## Konferenciakiadványban megjelent közlemények

1. **Bernáth, G.**, Kaczkó, D., Hoitsy, Gy., Jesenšek, D., Horváth, Á. (2012). Európában őshonos pisztrángfélék spermájának mélyhűtése és a mélyhűtött sperma felhasználása fajmegőrzési célokra. XXXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Május 23-24. 2012., p. 42.
2. Kollár, T., **Bernáth, G.**, Csenki, Zs., Kovács, R., Kása, E., Horváth, Á. Zebradánió (*Danio rerio*) spermamélyhűtésének kidolgozása. XXXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2014. május 28-29.
3. Horváth, Á., Labbé, C., Jesenšek, D., **Bernáth, G.**, Kaczkó, D., Bokor, Z., Urbány, B. Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. 4<sup>th</sup> International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Albufeira, Portugal, September 17-20, 2013, p. 126-127.
4. **Bernáth, G.**, Żarski, D., Krejszeff, S., Palińska-Żarska, K., Kollár, T., Bokor, Z., Kucharczyk, D., Urbányi, B., Horváth, Á. Systematic optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. 4<sup>th</sup> International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Albufeira, Portugal, September 17-20, 2013, p. 128-129.
5. **Bernáth, G.**, Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, Á. Post-thawing quality of cryopreserved sperm in two endangered acipenseriform species. 7<sup>th</sup> International Symposium On Sturgeon, Nanaimo, Canada, July 21-25, 2013.
6. Kollár, T., Csenki, Zs., Kovács, R., **Bernáth, G.**, Horváth, Á. Effect of different fluorides on quality of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. „VIII. Carpathian Basin Biological Symposium - I. Sustainable Development in the Carpathian Basin" international conference, Budapest, November 21-23. 2013., Book of abstracts p. 44-45.
7. Kollár, T., Csenki, Zs., Kovács, R., **Bernáth, G.**, Horváth, Á. Effect of different fluorides on quality of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. „20<sup>th</sup> Youth Scientific Forum” international conference, Keszthely, May 23-24. 2014.
8. **Bernáth, G.**, Żarski, D., Król, J., Krejszeff, J. Palińska-Żarska, Z., Bokor, Z., Kucharczyk, D., Urbány, B., Horváth, Á. Methodical standardization of motility assessment and short-term storage in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). 10<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Olhão, Portugal, 25-30 May 2014. Abstract book p. 136.
9. **Bernath, G.**, Bokor, Z., Kollár, T., Kása, E., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Urbányi, B., Horváth, Á. The comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch *Perca fluviatilis* sperm. Aquaculture Europe 14, Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014, Book of abstracts p. 21.

10. Kollár, T., **Bernáth, G.**, Csenki-Bakos, Zs., Kovács, R., Kása, E., Urbányi, B., Horváth, Á. Development of cryopreservation of Zebrafish *Danio rerio* sperm. Aquaculture Europe 14, Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014, Book of abstracts p. 21.
11. Żarski, D., Palińska-Żarska, K., Krejszeff, S., **Bernáth G.**, Król, J., Bokor Z., Kucharczyk, D., Horváth A. Does mechanical actuation improve in vitro fertilization effectiveness in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*? Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014, Book of abstracts p. 1468.
12. Horváth, Á., Bokor, Z., **Bernáth, G.**, Urbányi, B., Snoj, A., Susnik Bajec, S., Jesensek, D. Application of sperm cryopreservation to the culture and conservation of salmonid species: a Slovenian-Hungarian collaboration. VII International Conference „Water and Fish”, June 10-12. 2015. p. 62.
13. Lujčić, J., **Bernáth G.**, Marinović, Z., Kollár T., Kása E., Simic, V., Čirković, M., Urbányi B., Horváth Á. The effect of extenders and cryoprotectants on various parameters of cryopreserved tench Tinca Tinca sperm. Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014.
14. **Bernáth, G.**, Bokor, Z., Żarski, D., Kása, E., Kollár, T., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Urbányi, B., Horváth, Á. Out of season quality assesment and cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. VII International Conference „Water and Fish”, June 10-12. 2015. p. 178.
15. Kasa, E., Bernath, G., Kollar, T., Zarski, D., Lujic, J., Marinovic, Z., Bokor, Z., Hegyi, A., Urbanyi, B., Horvath, A. Vitrification of the sperm of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) VII International Conference „Water and Fish”, June 10-12. 2015. p.

## Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó publikációk

### Tudományos közlemények folyóiratban

1. Szentés, K., Kása, E., Urbányi, B., Csorbai, B., Szabó, T., Borbély, Gy., Mészáros, E., **Bernáth, G.**, Tóth, G., Horváth, Á. (2013). Intenzív rendszerben nevelt barramundi (*Lates calcarifer*) természetes és indukált ivarérése és ivarváltása. Halászat, Vol. 106 (3) pp. 23-26.
2. Szentés, K., Mészáros, E., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, G., **Bernáth, G.**, Urbányi, B., and Horváth, Á. (2012). Gonad development and gametogenesis in the Asian sea bass (*Lates calcarifer*) grown in an intensive aquaculture system. Journal of Applied Ichthyology 28, 883–885.



## Konferenciakiadványban, összefoglalóként megjelent közlemények

1. Szentés, K., Mészáros, E., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Kása, E., Urbányi, B., Horváth, Á. (2012). Zárt, édesvízi rendszerben nevelt barramundi (*Lates calcarifer*) ivaréresének vizsgálata. XXXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás Szarvas, 2012. május 23-24. 20.p.
2. Szentés, K., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Kása, E., Urbányi, B., Tóth, G., Horváth, Á. Hormonindukció hatása a korai ivarátfordulásra zárt, édesvízi rendszerben nevelt barramundi (*Lates calcarifer*) állományban. XXXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás Szarvas, 2013. május 22-23. 68.p.
3. Kása, E., Szentés, K., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Urbányi, B., Tóth, G., Horváth, Á. A barramundi (*Lates calcarifer*) sókoncentráció növelésével indukált ivarváltásának vizsgálata szövettani módszerekkel (poszter), XXXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás Szarvas, 2013. május 22-23. Kivonat 31.p.
4. Horváth, Á., Szentés, K., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Urbányi, B. (2012). Early sex inversion of the asian sea bass reared in a freshwater intensive system. 10th International Congress on the Biology of Fish. 2012. July 15-19. Madison, Wisconsin, USA. Book of abstracts p. 58.
5. Szentés, K., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Kása, E., Urbányi, B., Tóth, G., Horváth, Á. Effects of hormonal induction on gonad development of freshwater-reared Asian sea bass *Lates calcarifer* AQUACULTURE 2013 - "Strike a Chord for Sustainable Aquaculture" Nashville, Tennessee, USA 22-25. Febr. 2013. Book of abstracts p. 1075.
6. Szentés, K., Mészáros, E., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Urbányi, B., Horváth, Á. (2011). Gonad development and gametogenesis in the asian sea bass (*Lates calcarifer*) grown in an intensive aquaculture system. 3<sup>rd</sup> International Workshop on the Biology of Fish Gametes: Budapest, Hungary, 2011. september 7-9.
7. Szentés, K., Mészáros, E., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Urbányi, B., Horváth, Á. (2012). Histological assesment of gonadal development of asian sea bass (*Lates calcarifer*) reared in an intensive system. Aquaculture Europe, September 1-5. 2012. Prague, Czech Republic. Book abstracts p. 1079.
8. Szentés, K., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, G., **Bernáth, G.**, Kása, E., Urbányi, B., Tóth, G., Horváth, Á. Hormone induction and early sex inversion of the asian sea bass, *Lates calcarifer*, reared in a freshwater intensive system Domestication in Finfish Aquaculture 23-25.10.2012. Olsztyn, Poland. Book of abstracts p. 53.

9. Krejszeff, S., Żarski, D., **Bernáth, G.**, Palińska-Żarska, K., Kupren, K., Kucharczyk, D. Effect of temperature on short-term storage of ide (*Leuciscus idus*) eggs. 4<sup>th</sup> International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Albufeira, Portugal, September 17-20, 2013, p. 172-173.
10. Szentés, K., Horváth, Á., Szabó, T., Csorbai, B., Borbély, Gy., **Bernáth, G.**, Kása, E., Urbányi, B., Kašpar, V., Pšenička, M. Morphology and ultrastructure of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) spermatozoa. 10<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Olhão, Portugal, 25-30 May 2014. Abstract book p. 112.
11. Zarski, D., Krejszeff, S., Palinska-Zarska, K., **Bernath, G.**, Urbanyi, B., Bokor, Z. The spawning efficiency index as a tool in aquaculture research and production. VII International Conference „Water and Fish”, June 10-12. 2015. p. 23.
12. Lujic, J., **Bernáth, G.**, Marinovic, Z., Lefler, K., Urbányi, B., Horváth, Á. Spermatogonial transplantation as a novel technique in aquaculture and fish conservation. VII International Conference „Water and Fish”, June 10-12. 2015. p. 66.