

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 16 Issue 2

Gödöllő
2020

MÉLYHÚTOTT CSUKA (*ESOX LUCIUS*) SPERMÁBÓL SZÁRMAZÓ LÁRVÁK KÜLÖNBÖZŐ NÖVEKEDÉSI ÉS MORFOLÓGIAI PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA RÖVIDTÁVÚ LÁRVANEVELÉS SORÁN

Molnár József¹, Várkonyi Levente¹, Füzes-Solymosi Enikő², Birkó-Sulyok Zita Katalin¹, Izsák Tibor¹, Láng Levente Zete¹, Csenki-Bakos Zsolt¹, Staszny Ádám¹, Urbányi Béla¹, Bernáth Gergely¹, Bokor Zoltán¹

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

²Szegedfish Kft., 6728 Szeged, Nádvági út 2.
molnar.jozsef@szie.hu

Received – Érkezett: 12. 11. 2019.
Accepted – Elfogadva: 23.11.2020.

Összefoglalás

Kísérletünkben csukaszaporítást végeztünk friss és három különböző módszerrel fagyasztott sperma [(polisztirol dobozban (p. doboz) 5 ml-es műszalma, valamint programozható fagyasztó berendezésben (CRF) 5 ml-es műszalma és 10 ml-es kriocső)] alkalmazásával. Keltetést követően közvetlen kelés után (kikelt), a nem táplálkozó lárvaszakasz végén és 5. napos táplálkozó lárvaszakaszban vizsgáltuk a lárvákat különböző fejlődési és növekedési paraméterek alapján. A testtömeg adatok elemzése során a kikelt p. doboz 5 ml ($8,45 \pm 0,89$ mg) és 10 ml-es kriocső $8,39 \pm 1,49$ mg csoportja szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kontroll ($8,11 \pm 1,26$ mg) és CRF 5 ml ($7,87 \pm 0,85$ mg) csoportnál. A testhossz adatok vizsgálata során a kikelt lárvastádiumban a kontroll ($8,22 \pm 0,86$ mm) és a p. doboz 5 ml ($8,37 \pm 0,68$ mm) csoportok szignifikánsan eltértek a CRF 5 ml ($8,49 \pm 0,67$ mm), valamint a kriocső ($8,54 \pm 0,66$ mm) csoporttól. Az 5 napos táplálkozó lárvastádiumban a testtömeg és testhossz adatok alapján egyaránt magasabb értéket jegyeztünk fel a p. doboz 5 ml ($17,38 \pm 2,25$ mg; $14,83 \pm 0,88$ mm); CRF 5 ml ($17,58 \pm 2,18$ mg; $14,71 \pm 0,69$ mm) kriocső esetében ($17,28 \pm 1,95$ mg; $14,86 \pm 0,79$ mm) a kontroll csoporthoz ($16,48 \pm 2,04$ mg; $14,52 \pm 0,82$ mm) képest. A lárvamegmaradás vizsgálata során nem rögzítettünk szignifikáns eltérést a kontroll (69%) és a mélyhűtött csoportok (CRF 5 ml: 74%, kriocső 74%, p. doboz. 5 ml: 80%) között. A morfológia adatok elemzése során nem találtunk igazolható eltérést a lárvastádiumok kontroll és három mélyhűtött csoportjai között

Kulcsszavak: csuka, spermamélyhűtés, lárvanevelés, lárvadeformitás

The investigation of different growth and morphological parameters of larvae obtained from cryopreserved northern pike (*Esox lucius*) sperm

Abstract

Northern pike propagation was performed using fresh and frozen sperm using three different methods (5 ml straw in polystyrene box (P. box) and 5 ml straw, and 10 ml cryotube in a Controlled Rate-Freezer (CRF)). The larvae rearing experiment was maintained for 10 days following hatching. Growth and morphological parameters were recorded at immediately after hatching, at the end of the non-feeding larvae stage and 5 days of feeding larvae stage. Polystyrene box 5 ml ($8,45 \pm 0,89$ mg) and 10 ml cryotube ($8,39 \pm 1,49$ mg) groups showed significantly higher body weight than control ($8,11 \pm 1,26$ mg) and CRF 5 ml ($7,87 \pm 0,85$ mg) group at the immediately after hatching larvae stage. Body length in control ($8,22 \pm 0,86$ mm) and P. box 5 ml ($8,37 \pm 0,68$ mm) significantly differed from CRF 5 ml ($8,49 \pm 0,67$ mm) and from cryotube ($8,54 \pm 0,66$) group at the immediately after hatching larvae stages. A significantly higher Body weight and body length values were recorded in P. box 5 ml ($17,38 \pm 2,25$ mg; $14,83 \pm 0,88$ mm), CRF 5 ml ($17,58 \pm 2,18$ mg; $14,71 \pm 0,69$ mm) and cryotube ($17,28 \pm 1,95$ mg; $14,86 \pm 0,79$ mm) compared to the control group ($16,48 \pm 2,04$ mg; $14,52 \pm 0,82$ mm) at 5 days of feeding larvae stage. No significant difference was recorded between the control and the cryopreserved groups (CRF 5 ml: 74%, cryotube 74%, P. box. 5 ml: 80%) in larvae survival rate. No significant difference in larvae malformation rate was observed between the control and cryopreserved groups at the different larvae developmental stages.

Keywords: northern pike, sperm cryopreservation, larvae rearing, larvae malformation

Irodalmi áttekintés

A halsperma mélyhütésének módszere segítségével növelhető a halgazdaságokban a mesterséges szaporítás hatékonysága. A mélyhűtött sperma (-196 °C) akár évek múlva is felhasználható (Ashwood-Smith, 1980; Stoss, 1983). Fontos lehet génbankok létrehozása a veszélyeztetett fajok megőrzése esetében is. A szaporodási időszak során a tejes és ikrás egyedekben gyakran eltérő időpontban van jelen a legjobb minőségben kinyerhető ivartermék, mely hatására a szaporítás hatékonyságának kockázata növekszik a szinkronizációs problémák okán. A sperma mélyhűtése megoldást nyújthat a folyamat elkerülésére (Bobe és Labbé, 2009; Cabrera és mtsai, 2010; Martínez-Páramo és mtsai, 2017), ami kulcsfontosságú lehet megannyi halfaj szaporítása esetén (Bernáth és mtsai, 2016; Migaud és mtsai, 2002). Csuka fajnál a sperma minősége a szaporodási időszak előrehaladtával változik (Bondarenko és mtsai, 2018). A mélyhűtés során szükséges a spermához hozzáadni egy sok esetben fajspecifikus, különböző sókat és cukrokat tartalmazó hígítót, valamint sejtkárosodást megakadályozó védőanyagot (Hoar és mtsai, 1983; Horváth és mtsai, 2003; Várkonyi és mtsai, 2019a). A mélyhűtés előtt és felolvasztása után a sperma motilitás ellenőrzése elengedhetetlen, amit általánosságban számítógépes spermavizsgáló rendszer segítségével (CASA, Computer-assisted Sperm Analysis) végeznek (Fauvel és mtsai, 2010). A csuka spermát (tudomásunk szerint) először 1994-ben mélyhűtötték sikeresen (Babiak és mtsai, 1995). Az elmúlt évtizedekben a csuka szaporítási módszerének és sperma mélyhűtési technikájának fejlesztése tekintetében számos kutatást végeztek (Alavi és mtsai, 2009; Bondarenko és mtsai, 2018; Cejko és mtsai, 2020; Dietrich és mtsai, 2016; Hulak és mtsai, 2008; Szabó, 2016; Zhang és mtsai, 2011). A halsperma mélyhűtés hatására bekövetkező

sejtkárosodás és lárva fejlődési rendellenességek feltárása érdekében egyaránt készültek tanulmányok (Bernáth és mtsai, 2018; Bobe és Labbé, 2010; Horváth és mtsai, 2000) más halfajok esetében, csuka fajban (tudomásunk szerint) viszont jelenleg még a témában nem állnak rendelkezésre adatok.

Anyag és módszer

A csuka anyaállomány a Szegedfish Kft. halgazdaságából származott. A hormonális indukciót megelőző napon került be a kísérlethez felhasznált 5 db ikrás (átlagos testtömeg: 6340 ± 1260 g) és 5 db tejes (átlagos testtömeg: 1365 ± 172 g) a gazdaság keltetőházába, ivaronként elkülönítve, átfolyóvízes medencébe. A keltetőházban természetes megvilágítás mellett történt az egyedek beérlelése. A hormonális indukció a fejés előtt 48 órával történt $3,5$ mg/testtömeg kg ponty hipofízissel. A beérlelés során a vízhőmérséklet hozzávetőlegesen 14 °C volt. A halak bódítását 60 ml/100 l rendszervíz koncentrációjú etilén-glikol-monofeniléter oldattal végeztük. Az ikra kinyerésére a klasszikus fejési technikát alkalmaztuk. A tej kinyerése a here kioperálásával kezdődött, majd azt követte a boncolás.

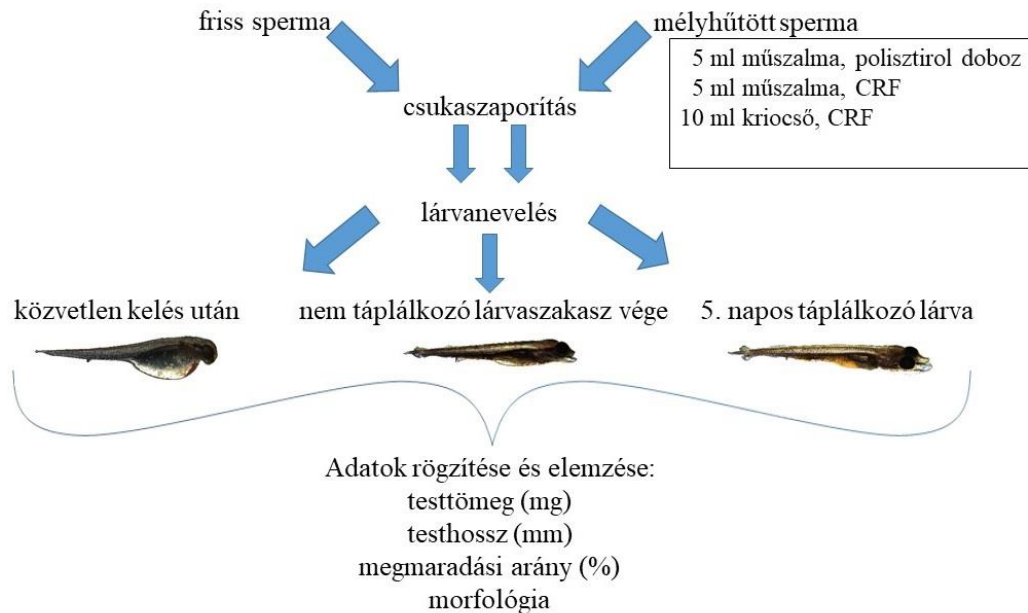
A sperma mélyhűtéséhez specifikusan a csuka fajra kifejlesztett hígítónkat alkalmaztuk (150 mM glükóz, 75 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, és 0.5% BSA, pH: 8 (Bernáth és mtsai, 2017)), majd hozzáadtunk 10% metanolt (sejten belüli védőanyag). A mélyhűtés során $1:9$ sperma-hígító arányt alkalmaztunk. Keltetőházi körülmények között végeztük el a csuka sperma fagyasztását az alábbi három mélyhűtési eljárással: Programozható fagyasztó berendezésben (CRF, Controlled-Rate Freezer) 10 ml-es kriocsövet és 5 ml-es műszalmát (Várkonyi és mtsai, 2019b) valamint polisztirol dobozban 5 ml-es műszalmát mélyhűtöttünk (Bokor és mtsai, 2010).

Üzemi körülmények között hajtottuk végre a csukaszaporítást friss és három különböző módszerrel fagyasztott sperma alkalmazásával (1. ábra). Meghatároztunk egy termékenyítési egységet. A termékenyítés során 250 gramm ikrához a kontroll és a mélyhűtött csoportokban egyaránt 2112 μl mennyiségű spermát adtunk (Lahnsteiner, 2000). A vizsgálat során a termékenyítéshez felhasznált sperma alapján egy friss és a három különböző módszerrel mélyhűtött csoportot alakítottunk ki. Csoportonként 5 tejes mintájával dolgoztunk, melyeket véletlenszerű sorrendben, külön Zuger-üvegbe, helyeztünk el. A termékenyítést rendszervízzel végeztük 20 másodperc aktiválási időt alkalmazva, majd a 10 perces duzzasztás módosított Woynarovich-oldat (15 g karbamid, 20 g konyható/10 l víz) (Woynarovich és Woynarovich, 1980) segítségével történt. Az ikra érlelése során naponta egy alkalommal az ikra penészesedésének megelőzése érdekében Zuger-üvegenként 250 ml mennyiségű DETOX ($4,5\%$ perecetsav és 20% hidrogén-peroxid oldat, 10 ml/10 l rendszervíz) kezelést alkalmaztunk.

Keltetést követően a négy csoport egyedeit átfolyóvízes anyahaltartó medencékbe épített ketrecekbe helyeztük ki két ismétlésben, véletlenszerű elrendezésben 1100 db lárva/ketrec mennyiségben. Összesen 8800 db lárvaival végeztük kísérletünket. A vizsgálat során rövidtávú, 10 napos lárvanevelési kísérletet végeztünk a kelés időpontjától az 5 napos táplálkozó lárvaszakaszig. A kísérlet ideje alatt három különböző lárvafejlődési stádiumban (közvetlen kelés után, majd a nem táplálkozó lárvaszakasz végén, illetve a táplálkozó lárvaszakasz 5 . napján) elvégzett mintavételek során feljegyeztük mind a nyolc lárvanevelési egységben 50 egyed testhosszát és nedves testtömegét, valamint 50 lárva morfológiai vizsgálatát végeztünk el. A kísérlet végén feljegyeztük a lárva megmaradást. A testhosszt milliméter, a nedves testtömeget analitikai mérlegen (AB204-S, Mettler-Toledo Kft., Budapest, Magyarország) $0,1$ mg pontossággal jegyeztük fel. A lárvákat sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk és fényképeztük (Leica M205 FA sztereomikroszkóp Biomarker

Kft., Gödöllő, Magyarország; Leica DFC 425C kamera, Bright Field 15*-30* Biomarker Kft., Gödöllő, Magyarország). A lárvák fejlődési rendellenességeinek vizsgálatát az alábbi főbb kategóriák megfigyelésével végeztük: test görbülése, faroktorzulás (hiány, rövidülés), szem deformitás (alak, lencse), eltérés a szik alakjában, kraniofaciális deformitás, ödéma (szik és szív), szomita eltérés (alak, szám) és hematóma.

1. ábra: A kutatás során alkalmazott kísérleti terv.

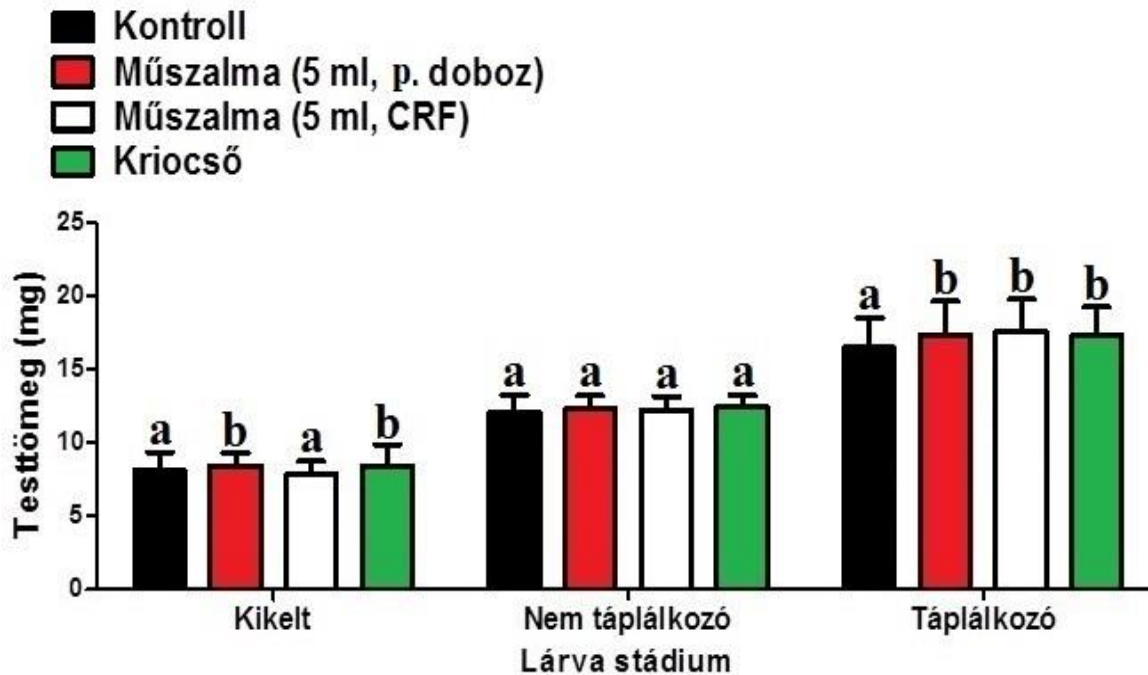


Az adatok rögzítéséhez és kiértékeléséhez Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052, Egyesült Államok) szoftvert alkalmaztunk. Az adatokat GraphPad Prism 5.0 for windows (GraphPad Software, La Jolla, California, Egyesült Államok) és SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Egyesült Államok) statisztikai programmal elemeztük. A normál eloszlás vizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov teszttel végeztük, ahol a nem normál eloszlású adatsorokat arkusz-színusz négyzetgyök és logaritmus függvényekkel transzformáltuk. A testtömeg és testhossz adatok elemzése és összehasonlítása kétszemponos varianciaanalízissel (two-way ANOVA) és páronkénti összehasonlítás Bonferroni „post hoc” teszttel történt. A megmaradás kiértékelését a csoportok esélyhányadosának („Odds ratio”) összehasonlításával végeztük. A morfológiai adatokat Kruskal-Wallis nem paraméteres próba (páronkénti összehasonlítás Dunn „post hoc” teszt), valamint egyszemponos varianciaanalízis (one-way ANOVA, páronkénti összehasonlítás Tukey „post hoc” teszt) módszerével értékeltük ki. Minden teszt esetében $p < 0,05$ szignifikancia szintet alkalmaztunk (Reiczigel és mtsai, 2007).

Eredmények és értékelésük

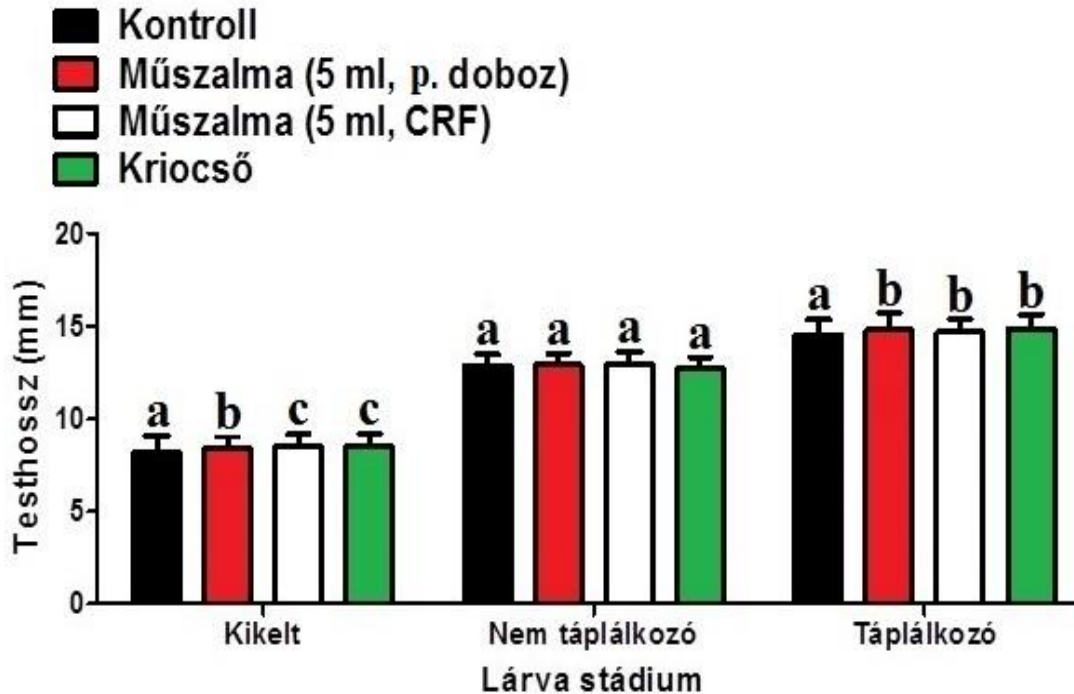
A kontroll csoport közvetlen kelés után (továbbiakban: kikelt) ($8,11 \pm 1,26$ mg) és a táplálkozó lárvaszakasz esetén ($16,48 \pm 2,04$ mg) statisztikailag igazolhatóan alacsonyabb értéket tapasztaltunk a p. dobozhoz (5 ml, kikelt lárva: $8,45 \pm 0,89$ mg, táplálkozó lárva: $17,38 \pm 2,25$ mg) és a kriocsőhöz (kikelt lárva: $8,39 \pm 1,49$ mg, táplálkozó lárva: $17,28 \pm 1,95$ mg) képest. A testtömeg adatok elemzése során a CRF (5 ml) csoportban a kikelt lárvastádiumban szignifikánsan alacsonyabb értékeket rögzítettünk ($7,87 \pm 0,85$ mg) a p. dobozhoz (5 ml) és a kriocsőhöz viszonyítva. A testtömeg szignifikánsan magasabb volt a CRF (5 ml) táplálkozó lárvastádiumban ($17,58 \pm 2,18$ mg), mint a kontroll csoportban *2. ábra*).

2. ábra: Friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárvák testtömeg adatai három lárvafejlődési stádiumban. A különböző betűk a lárvastádiumon belüli szignifikáns eltéréseket jelölik ($P < 0,05$). Az ábra az átlagértékeket és a hozzájuk tartozó szórásokat mutatja ($N=1200$).



Az elemzés során a mélyhűtött csoportokban a kikelt és táplálkozó lárvastádiumban szignifikánsan magasabb értékeket tapasztaltunk (p. doboz 5 ml-kikelt lárva: $8,37 \pm 0,68$ mm, táplálkozó lárva: $14,83 \pm 0,88$ mm, CRF 5 ml-kikelt lárva: $8,49 \pm 0,67$ mm, táplálkozó lárva: $14,71 \pm 0,69$ mm, kriocső-kikelt lárva: $8,54 \pm 0,66$ mm, táplálkozó lárva: $14,86 \pm 0,79$ mm) a kontroll csoporthoz (kikelt lárva: $8,22 \pm 0,86$ mm, táplálkozó lárva: $14,52 \pm 0,82$ mm) képest (*3. ábra*).

3. ábra: Friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárvák testhossz adatai három lárvafejlődési stádiumban. A különböző betűk a lárvastádiumon belüli szignifikáns eltéréseket jelölik ($P < 0,05$). Az ábra az átlagértékeket és a hozzájuk tartozó szórásokat mutatja ($N=1200$).



A kikelt lárvastádiumban szignifikánsan alacsonyabb volt az egyedek testhossza a p. doboz (5 ml) csoportban a CRF (5 ml) és kriocső alkalmazásához képest. A nem táplálkozó lárvaszakasz végén nem találtunk statisztikailag igazolható eltérést a testtömeg és testhossz adatokra vonatkozóan.

A lárva megmaradás vizsgálata során nem rögzítettünk szignifikáns eltérést a kontroll (69%) és a mélyhűtött csoportok (CRF 5 ml: 74%, kriocső 74%, p. doboz 5 ml: 80%) között.

A morfológiai vizsgálat során a kontroll és három mélyhűtött csoport között nem tapasztaltunk statisztikailag igazolható eltérést a különböző lárvastádiumokban. A közvetlen kelés utáni lárvastádium eredményei szignifikánsan magasabbak voltak a nem táplálkozó és az 5 napos táplálkozó lárvaszakaszánál, ahol számottevően kevesebb torz lárva-t fedeztünk fel. Közvetlen kelés után a táplálkozni nem képes és egyéb morfológiai rendellenességgel rendelkező egyedek többsége feltételezhetően elhullott, így csökkent a torz halak aránya. Új torzulás csekély mértékben alakult ki a p. doboz, CRF (5 ml) és kriocső kezelési csoportban (1. táblázat).

1. táblázat: Friss és három különböző módszerrel fagyasztott spermából származó lárvák morfológiai vizsgálata (N=1151)

2.

		Kontroll	5 ml műszalma, p. doboz	5 ml műszalma, CRF	10 ml kriocső
kikelt:	összes egyed (db)	101	102	99	99
	torzult egyedek száma (db)	27	19	13	10
	torz egyedek aránya (%)	26,73	18,63	13,13	10,10
nem táplálkozó lárvaszakasz vége:	összes egyed (db)	100	100	100	100
	torzult egyedek száma (db)	5	4	5	5
	torz egyedek aránya	5	4	5	5
5 napos táplálkozó lárva:	összes egyed (db)	50	100	100	100
	torzult egyedek száma (db)	3	4	7	6
	torz egyedek aránya (%)	6	4	7	6
10 napos lárva összesen:	összes egyed (db)	251	302	299	299
	torzult egyedek száma (db)	35	27	25	21
	torz egyedek aránya (%)	13,94	8,94	8,36	7,02

Bokor és mtsai (2019) harcán (*Silurus glanis*) végzett nagy mennyiségű mélyhűtött spermával történő termékenyítési módszere alkalmazhatónak bizonyult a csuka mesterséges szaporítása esetében is. A kísérletünkben használt fagyasztási módszerek és hígító eredményes alkalmazhatóságáról már *Várkonyi és mtsai (2019a)* is beszámoltak ponty (*Cyprinus carpio*) spermamélyhűtési vizsgálataikban.

Az általunk vizsgált 10 napos lárvafejlődési periódusban *Bokor és mtsai (2015)* harcán végzett kísérletéhez (CRF, 5 ml-es műszalma; polisztirol doboz, 5 ml-es műszalma) hasonlóan a friss és mélyhűtésből származó lárvák növekedés és megmaradás eredményeiben nem tapasztaltunk a sperma fagyasztására visszavezethető negatív hatást. A lárva deformitás tekintetében *Horváth és Urbányi (2000)*, valamint *Miskolczi és mtsai (2005)* afrikai harcán végzett (*Clarias gariepinus*) vizsgálataik során friss és mélyhűtött spermából származó, kikelt lárvák deformitási aránya szignifikánsan magasabb volt a mélyhűtött csoportokban, míg *Bernáth és mtsai (2018)* jász keszegen (*Leuciscus idus*) és *Horváth és mtsai (2007)* pontyon végzett kísérletében nem.

Következtetések és javaslatok

Friss és különböző technikával fagyasztott spermából származó csukalárvák rövidtávú lárwanevelése során az általunk vizsgált lárvafejlődési periódusban a nevelt lárvák növekedése, morfológiai elváltozásai és megmaradása tekintetében nem tapasztaltunk a fagyasztásra visszavezethető negatív hatást. Mélyhűtött sperma keltetőházi alkalmazása hozzájárulhat a csukasziporítás fejlesztéséhez és az eredményesebb termeléshez. Javasoljuk a hosszútávú lárwanevelési vizsgálatok elvégzését is.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat az Európai Halászati Alap, Halászati Operatív Program III. tengelye (“Európai Halászati Alap: a megújuló halászatért”- az Európai Unió és Magyarország támogatásával), a GINOP-2.1.1-15-2015-00645 pályázat, Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-4 és ÚNKP-19-2-II-SZIE-20 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült, valamint Bernáth Gergely Bolyai János Kutatási (BO/00508/18/4) Ösztöndíja támogatta.

Irodalomjegyzék

- Alavi S. M. H., Rodina M., Viveiros A. T. M., Cosson J., Gela D., Boryshpolets S., Linhart O. (2009): Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology*, 72. 32-43.
- Ashwood-Smith, M. J. (1980): Low temperature preservation of cells, tissues and organs. [In: Ashwood-Smith and Farrant (eds.) *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*.] Pitman Medical Ltd. Tunbridge Wells. Kent. England. 19–44.
- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M. J., Kucharczky D., Luczynski M. (1995): Cryopreservation of the milt of the northern pike. *Journal of Fish Biology*, 46. 819-828.
- Bernáth, G., Bokor, Z., Žarski, D., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Staszny, Á., Urbányi, B., Ifj. Radóczy, 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*, Dubrovnik, Croatia, 17-20 in October, 2017. Abstract book 101-102.
- Bernáth G., Csenki, Zs., Bokor, Z., Várkonyi L., Molnár, J., Szabó, T., Staszny, Á., Ferincz, Á., Szabó, K., Urbányi, B., Pap, L. O., Csorbai, B. (2018): The effects of different preservation methods on ide (*Leuciscus idus*) sperm and the longevity of sperm movement. *Cryobiology*, 81. 125–131.
- 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., Levente, V., Molnár, J., Láng, L. Z., Tarnai-Király, Zs., 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.
- Bobe, J., Labbé, C. (2009): Chilled storage of sperm and eggs, in: E. Cabrita, V. Robles, P. Herráez (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*, CRC Press, New York, USA, 219–231.
- Bobe, J., Labbé, C. (2010): Egg and sperm quality in fish, *General and Comparative Endocrinology*, 165. 3. 535–548.

- Bondarenko, V., Blecha M., Policar T. (2018): Changes of sperm morphology, volume, density, and motility parameters in northern pike during the spawning period. *Fish Physiology Biochemistry*, 44. 2.
- Cabrera E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cereales 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
- Dietrich G. J., Nynca J., Szepekowski M., Dobosz S., Szczepkowska B., Ciereszko A. (2016): The effect of cryopreservation of semen from whitefish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability. *Aquaculture*, 464. 60-64.
- Fauvel C., Suquet, M., and Cosson, J. (2010): Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26. 636–643.
- Hoar W., Randall D., Donaldson, E.M. (1983): *Fish physiology*, Volume IX B, Academic press, 477.
- Horváth, Á., Urbányi, B. (2000): The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm, *Aquaculture Research*, 31. 317–324.
- Horváth, Á., Miskolczi, E., Urbányi, B. (2003): Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, 16. 457–460.
- Horváth, Á., Miskolczi, E., Mihálffy, Sz., Ósz, K., Szabó, K., Urbányi, B. (2007): Cryopreservation of common carp (*Ciprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54. 241-257.
- Hulak M., Rodina M., Otomar L. (2008): Characteristics of stripped and testicular Northern pike (*Esox lucius*) sperm: spermatozoa motility and velocity. *Aquatic Living Resources*, 21. 207-212.
- Lahnsteiner, F. (2000): Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research* 31. 245–258.
- Martínez-Páramo S., Horváth Á., Labbé C., Zhang T., Robles V., Herráez P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T. R., Cabrera E. (2017): Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472. 156-177.
- Migaud, H., Fontaine, P., Sulistyó, I., Kestemont, P., Gardeur, J. N. (2002): Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch *Perca fluviatilis*: Effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. *Aquaculture*, 205. 253–267.
- Miskolczi, E., Mihálffy, Sz., Patakiné Várkonyi, E., Urbányi, B., Horváth, Á. (2005): Examination of larval malformation in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 247. 119-125.
- Szabó, T. (2016): A csuka biológiája és tenyésztése. Szent István Egyetem Kiadó. Gödöllő. 188.
- Stoss, J. (1983): Fish gamete preservation and spermatozoan physiology 9. [In: Hoar et al. (eds.) *Fish Physiology*.] Academic Press. New York. New York. USA. 305–350.
- Reiczigel, J. Harnos, A., Solymosi, N. (2007): *Biostatistika: nem statisztikusoknak*. Pars Kft. Nagykovácsi. 455.
- Várkonyi, L., Bokor, Z., Molnár, J., Fodor, F., Szári, Z., Ferincz, Á., Staszny, Á., Láng, L.Z., Csorbai, B., Urbányi, B., Bernáth, G. (2019a): The comparison of two different extenders

for the improvement of large-scale sperm cryopreservation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Reproduction Domestic Animals*, 54. 639–645.

Várkonyi, L., Bokor, Z., Ferincz, Á., Staszny, Á., Fodor, F., Szári, Zs., Urbányi, B., Molnár, J., Bernáth G. (2019b): The applicability of 10 ml cryotubes for sperm cryopreservation in a Hungarian carp landrace (*Cyprinus carpio carpio morpha accuminatus*), *Agrártudományi Közlemények/Acta Agraria Debreceniensis*, 2018/75. 5. 93-97.

Woynarovich, E., Woynarovich, A. (1980): Modified technology for elimination of stickiness of common carp *Cyprinus carpio* eggs. *Aquaculture Hungarica*, 2. 19-21.

Zhang J. J., Li S. Z., Tulake K., Yan, Q. P., Li, W. J. (2011): The effects of extenders and sperm-egg ratios on fertilizing ability of cryopreserved testicular sperm of northern pike (*Esox lucius* L.). *Applied Ichthyology*, 2. 1037-1040.