

A halsperma mélyhűthetőségének öröklődése

Inherited cryoresistance of fish sperm

PATAKI Bernadett

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
(Hungarian University of Agriculture and Life Sciences)
Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola
(Doctoral School of Animal Biotechnology and Animal Science)
Gödöllő, 2023.

Témavezetők (supervisors): HORVÁTH Ákos DSc és KOLLÁR Tímea PhD

ÖSSZEFOGLALÁS

Az első sikeres ivarsejtmélyhűtés új ajtókat nyitott meg az állattenyésztésben. Egyrészt lehetőség adódott a hímek és a nőstények időbeli, valamint térbeli elkülönítésére olyannyira, hogy az állat halála után is fel lehet használni annak ivartermékeit. Másrészt költségsökkentésről is beszélhetünk, hiszen egy állomány fenntartása helyett elég lehet csupán az ivarsejtek tárolása. Fontos megemlíteni, hogy kihalt félben lévő fajok megmentésére is irányulhatnak a mélyhűtési tevékenységek.

Mivel halaknál egyelőre az embrió és az ikra mélyhűtése nem lehetséges, ezért a legtöbb ilyen kutatás a spermamélyhűtésre fókuszál. A keltetőházakban eddig nem igazán terjedt el a mélyhűtött spermával történő termékenyítés, jelenleg inkább laboratóriumokban használják azt. Mielőtt azonban széleskörűen elterjed, érdemes lenne feltérképezni, hogy milyen hatással járhat az ivarsejtmélyhűtés az utódgenerációra. Ennek egyik szegmense az utódok spermaminőségének, illetve külalakjának vizsgálata.

Kísérleteimben elsősorban a mélyhűtési protokollok tökéletesítésére, később a mélyhűtött spermából született egyedek tulajdonságaira koncentráltam. Két módszert találtam, amellyel a sperma denzitása könnyen és gyorsan meghatározhatóvá válik. A számítógépes spermavizsgáló rendszer épp úgy, mint a spektrofotométer, tökéletesen alkalmas a sejtkoncentráció mérésére. Fontos azonban, hogy a mérések előtt a spermát immobilizáljuk, különben fals eredményeket kaphatunk. Két függvényt (spektrofotométer: $y = 1,363 \times 10^{11}x + 1,576 \times 10^9$, $r^2 = 0,7602$, $p = 0,0022$; CASA: $y = 0,7317x + 8,555 \times 10^8$, $r^2 = 0,8559$, $p < 0,0001$) alkottam, amellyel a kapott adatok standardizálhatóvá váltak.

Teszteltem a koncentráció szerinti mélyhűtést is. Öt különböző koncentrációban ($0,5 \times 10^9$, 1×10^9 , 2×10^9 , 4×10^9 sejt/ml és standard 1:9 arányban) mélyhűtöttem le pontyspermát. Kontrollként az általában használt 1:9 hígítási arányt szolgált. Szignifikáns eltérést találtam a termékenyítésben ($p = 0,0121$) a 4×10^9 sejt/ml ($66 \pm 6\%$) és a standard ($49 \pm 5\%$), 1:9 hígítási arány esetén, továbbá a LIN értéke a $0,5 \times 10^9$ sejt/ml ($0,86 \pm 0,03$) és a kontroll (1:9; $0,74 \pm 0,08$) között tért el szignifikánsan ($p = 0,0056$).

További vizsgálataimhoz létre kellett hozni a generációkat. Ez zebra-dánió esetében három, ponty esetében pedig két generációt jelentett. A mélyhűtött spermából született egyedek spermáját felolvasztás után, a friss spermából származó egyedek

spermáját pedig frissen használtam fel termékenyítéshez. Az első generációk esetében teljes testvér-populációkat hoztam létre, vagyis ugyanazon hím mélyhűtött és friss spermáját használtam a termékenyítéshez. Ponty esetében a második generáció kialakítására is így került sor. Zebradániókat termékenyítve azonban a minimális mennyiségű ivartermékek miatt több egyedről származó, kevert ikrát, illetve spermát (mélyhűtött, friss) használtam fel.

Megvizsgálva a különböző generációk spermájának motilitási paramétereit, zebradánió esetében nem találtam szignifikánsan igazolható ($p > 0,05$) eltérést a két csoport között. Pontynál viszont a felolvasztás utáni progresszív motilitási értékek statisztikailag igazolhatóan eltértek ($p = 0,024$) a friss ($59 \pm 20\%$), illetve a mélyhűtött ($64 \pm 17\%$) spermából született egyedeknél, továbbá a mintavétel időpontja (3 különböző időpont) is befolyásoló tényezőnek bizonyult ($p < 0,001$). A második generációban azonban nem találtam szignifikáns eltérést ($p > 0,05$).

Ponty esetében a második generáció egyedeit morfológiai méréseknek vettem alá, amelyből kiderült, hogy a mélyhűtött spermából született egyedek testalakja statisztikailag igazolhatóan ($p < 0,001$) eltér. A mélyhűtött spermából született egyedek átlagosan kisebb fejjel, alacsonyabb háttal és keskenyebb faroknyéllel rendelkeznek a friss spermából született társaikhoz viszonyítva. Testhossz alapján azonban nem találtam szignifikáns eltérést ($p > 0,05$) a két csoport között.

Eredményeim egyrészt azt támasztják alá, hogy nagyon fontos a megfelelő mélyhűtési protokoll kidolgozása, mert a mélyhűtés során fellépő változások nagyban befolyásolhatják a mélyhűtés sikerességét, a spermiumok életképességét. Másrészt a spermamélyhűtés hatással lehet az utódok külalakjára, amely nem feltétlenül jelenik meg a testhosszban. További vizsgálatok szükségesek annak feltérképezésére, hogy ezek a külalakbeli eltérések hatással vannak-e pl. a belső szervekre, a csontalakulásra és egyéb paraméterekre.

SUMMARY

Cryopreservation of sperm has long been recognized as an effective means of preserving genetic resources of wild and domestic animal species. Sperm cryopreservation methods have also been developed for freshwater and marine fish. Although the importance of these methods has widely been acknowledged, very few of them have seen actual application to aquaculture practice. In most cases fish sperm cryopreservation is restricted to the creation of gene banks maintained by research institutions without concrete commercial application.

In order to overcome these problems, standardization of cryopreservation protocols has been initiated by several laboratories working with fish sperm. However these studies focus mainly on the composition of the extender, type and concentration of cryoprotectants and conditions of freezing and thawing and not on the cryopreservation effects on the generations.

In this study I focused on the standardization of cryopreservation protocols and the effects on the next generations. I found two methods to fastly and easily identify the number of spermatozoa. I found the CASA as well as the spectrophotometer suitable for measurements. However these engines give reliable readings of sperm counts only if the cells are immotile. A significant positive linear relationship was detected between absorbance measured in the plate spectrophotometer and sperm

concentration assessed using a hemocytometer ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.8289$) resulting in the equation $y = 1.720 \times 10^{11}x + 3.851 \times 10^9$. The concentration values measured with CASA were also in a significant linear relationship ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.8559$, $y = 0.7317x + 8.555 \times 10^8$) with sperm concentration counted in a hemocytometer.

In the case of cryopreservation after sperm counting, there was no significant main effect of sperm concentration on any of the parameters measured by CASA. The only exception was LIN ($p = 0.0112$) where the post-hoc test found a significant difference ($p = 0.0056$) between linearity value for the sperm concentration of 0.5×10^9 spermatozoa mL^{-1} (0.86 ± 0.03) and that for the dilution ratio of 1:9 (0.74 ± 0.08).

A significant main effect ($p = 0.0156$) of cell concentration on the fertilizing capacity of cryopreserved common carp sperm was found. The post-hoc test detected a significant difference ($p = 0.0121$), between the fertilization percentage of batches fertilized with sperm frozen at a cell concentration of 4×10^9 spermatozoa mL^{-1} ($66 \pm 6\%$) and the positive control (sperm diluted at a ratio of 1:9, $49 \pm 5\%$). The control fertilization rate was $95 \pm 5\%$ confirming satisfactory egg quality.

For further experiments I had to create 3 generations of zebrafish and 2 generations of carps. One male from each group was chosen. Batches of eggs of females were fertilized either with cryopreserved sperm for creating the "cryopreserved" group, or with fresh sperm creating the "fresh" group. For fertilization I cryopreserved the sperm of the individuals born from cryopreserved sperm and I used fresh sperm of the fish born from fresh sperm. For creating the first generations I used the same male's cryopreserved and fresh sperm, creating full-sib populations.

I found no significant ($p > 0,05$) difference in motility parameters between the groups of zebrafish. In the case of carps I found no significant difference ($P = 0.86$, $N = 4$) between the fertilizing capacity of cryopreserved ($87 \pm 5\%$) and fresh sperm ($86 \pm 13\%$) of F1 males used to establish the F2 generation. On the progressive motility of cryopreserved carp sperm both the sampling date ($P < 0.001$) and the origin of males (fresh or cryopreserved sperm) had a significant effect ($P = 0.024$, $N = 46$ for cryopreserved, $N = 63$ for fresh) although the family of fish had no effects on the results. The origin of the males neither affected the other motility parameters (VCL, VAP, VSL, STR or LIN).

Morphometry studies of F2 carp individuals revealed that fish can be classified according to their origin (fertilization with cryopreserved or fresh sperm) with $81.09 \pm 3.57\%$ accuracy across all tested families, based on DFA. A transformation grid for visualizing a shape change was taken where the group originating from cryopreserved sperm differed from that originating from fresh sperm at 9 measured points. Generally, fish originating from fertilization with cryopreserved sperm had a smaller head, lower back and narrower caudal peduncle than those originating from fresh sperm. However, I found no significant difference ($p > 0.05$) between the length or the weight of the individuals.

My researches raise attention to the importance of the suitable cryopreservation protocol and also to the effects of the sperm cryopreservation on the next generations. The cryopreservation might have an effect on the morphometry on the fish which can not be identified by measuring them. This topic requires more researches before place this method in concrete commercial application.

Forrás (source): <https://doktori.hu/index.php?menuid=193&lang=HU&v id=27507>