

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Denis Bassa

Krioprezervacija spermatozoida običnog trpa, *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791)

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr.sc. Sanja Tomšić

Dubrovnik, 2014.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Sanje Tomšić, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

SAŽETAK

Kriobiologija je biološka grana znanosti koja istražuje preživljavanje i postojanost stanica, tkiva, organa i organizama pri uvjetima niskih temperatura, proučava ponašanja živih tvari izloženih intenzivnom hlađenju. Cilj je izložiti žive stanice niskim temperaturama, a da se sačuvaju morfološka struktura i funkcionalnost stanica, tkiva ili organa, kako bi se oni mogli čuvati na dulji vremenski period. Najvažnije primjene kriobiologije su u očuvanju krvi, leđne moždine, životinjskog i ljudskog sjemena. Ovaj rad opisuje krioprezervaciju spermatozoida običnog trpa, *Holothuria tubulosa*. Izvedeni su brojni pokusi sa promjenjivim uvjetima krioprezervacije spermatozoida, međutim uspješnost oplodnje nakon zamrzavanja nije provjeravana. Korištene su kriocijevčice volumena 0.5 ml te krioprotektanti DMSO i metanol. Rezultati ukazuju da je za uspješnu krioprezervaciju spermatozoida vrste, *H. tubulosa*, krioprotektant DMSO pogodniji od metanola Me(OH) i to u koncentraciji od 10% kada je preživljavanje spermatozoida nakon otapanja iznosilo 50% u odnosu na kontrolnu skupinu. Reproduktivne značajke trpa, *H. Tubulosa* tijekom trajanja eksperimenta, ukazuju na kretanje vrijednosti mase gonada i gonadosomatskog indeksa u okviru referentnih vrijednosti za ovu vrstu u području Mediterana. Tijekom trajanja eksperimenta jedinke su bile u periodu reproduktivnog rasta, ali ne i zrele za mrijest, prema tome zabilježene vrijednosti nisu maksimalne kao u doba mriještenja. Ukupna masa gonada ženka u uzorku iznosila je 93.14 g, te se kretala u rasponu od 1.85 – 14.05 g, a ukupna masa gonada mužjaka iznosila je 31,6 g, te se kretala u rasponu od 1.12 – 5.54 g. Najmanje i najveće zabilježene vrijednosti mase gonada pojedinih trpova kretale su se u rasponu od najmanje, 1.12 g, do najveće 14.05 g.

Ključne riječi: krioprezervacija, *Holothuria tubulosa*, krioprotektanti, pokretljivost spermatozoida

ABSTRACT

Cryobiology is biological branch of science that investigates the survival and stability of cells, tissues, organs and organisms under conditions of low temperatures, studying the behavior of living matter subject to intense cooling. The purpose is to expose living cells to conditions of low temperatures, and to preserve the morphology and function of cells, tissues or organs, so they could be kept for a longer period of time. The most important application of cryobiology

is the preservation of blood, various human and bacterial cell lineages as well as animal and human semen. This paper describes sperm cryopreservation of common sea cucumber, *Holothuria tubulosa*. Cryotubes used, were 0.5 ml in volume and cryoprotectants used were DMSO and methanol Me(OH). Results indicate that the cryopreservation of spermatozoa for the species, *H. tubulosa* is possible, where DMSO is a superior cryoprotectant to methanol Me (OH) and at a concentration of 10% when the survival of sperm cells after thawing was 50% compared to the control group. Reproductive patterns of the specimen, *H. tubulosa* suggest that movement of mass, gonad weight and gonadosomatic index values are within the reference range for this species in the Mediterranean region. Throughout the duration of the experiment, specimens were in the reproductive period of growth, but not mature or spawning, therefore the values recorded are not maximal as would be the case in the time of spawning. The total mass of female gonads in the sample was 93.14 g, and ranged from 1.85 - 14.05 g, and the total mass of the gonads of males was 31.6 g, and ranged 1.12 - 5.54 g. Minimum and maximum recorded values for gonad weight were 1.12 g and 14.05 g.

Key words: cryopreservation, *Holothuria tubulosa*, cryoprotectans, sperm motility

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 KRIOBIOLOGIJA.....	2
1.1.1 ODABIR KRIOPROTEKTANATA I URAVNOTEŽENJE.....	4
1.1.2 OSMOTSKI UVJETI I STOPA HLAĐENJA.....	6
1.1.3 METODE KRIOPREZERVACIJE.....	7
1.2 KRIOPREZERVACIJA SPERMATOZOIDA TRPOVA	9
1.3 BIOLOŠKE ZNAČAJKE TRPOVA.....	11
1.3.1 REPRODUKTIVNA BIOLOGIJA OBIČNOG MORSKOG TRPA, <i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin 1791).....	14
2. MATERIJALI I METODE.....	17
2.1. HIDROGRAFSKI PODACI I PODRUČJE UZORKOVANJA.....	17
2.2. MORFOMETRIJSKE I REPRODUKTIVNE ZNAČAJKE.....	18
2.3. POSTUPAK KRIOPREZERVACIJE SPERMATOZOIDA OBIČNOG MORSKOG TRPA, <i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin 1971).....	19
3. REZULTATI.....	22
3.1. HIDROGRAFSKI PODACI I PODRUČJE UZORKOVANJA.....	22
3.2. MORFOMETRIJSKE I REPRODUKTIVNE ZNAČAJKE.....	22
3.2.1. MORFOMETRIJA GONADA.....	23
3.2.2 GONADOSOMATSKI INDEKS.....	24
3.3. KRIOPREZERVACIJA SPERMATOZOIDA OBIČNOG MORSKOG TRPA, <i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin 1971).....	25
4. RASPRAVA.....	28
5. ZAKLJUČAK.....	31
6. LITERATURA.....	32

1. UVOD

Kriobiologija je grana biologije koja se bavi proučavanjem ponašanja živih tvari izloženih intenzivnom hlađenju. Cilj je izložiti žive stanice niskim temperaturama, a da se sačuvaju morfološka struktura i funkcionalnost stanica, tkiva ili organa, kako bi se oni mogli dulje čuvati. Najvažnije primjene kriobiologije su u očuvanju krvi, leđne moždine, životinjskog i ljudskog sjemena. Poznato je da sušeni omotač trpa, iz perspektive kineske medicine, ima blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje, pa se stoga, na Dalekom istoku tradicionalno trguje sa ovom zdravom namirnicom više tisuća godina (Conand i Byrne, 1993). Kroz biokemijske analize trpova utvrđeno je da sadrže veliki udio probavljivih bjelančevina kao i niski sadržaj masti (Salarzadeh i sur. 2012), uzgoj je relativno jednostavan, stoga čine izvrsnog kandidata za diversifikaciju u akvakulturi. Krioprezervacija spolnih produkata i ranih razvojnih stadija uvelike bi unaprijedila akvakulturalni razvoj ovih organizama te bi omogućila oplodnju i mriještenje u doba godine kad u prirodi nisu za to postojani uvjeti. Početni uspjeh u zamrzavanju spermatozoïda akvatičnih organizama je zabilježen 50 - ih godina prošlog stoljeća, te je od tada posao krioprezervacije sperme izrastao u milijardu dolara vrijednu globalnu industriju. Unatoč velikom eksperimentalnom naporu, kroz približno 200 vrsta s više od 200 objavljenih radova, zamrzavanje spermatozoïda iz akvatičnih organizama je ostala u suštini istraživačka djelatnost s malo komercijalne primjene. Većina istraživanih organizama čine komercijalno važne vrste riba, i mekušaca. Međutim, iako malobrojna, također su važna istraživanja na manje komercijalnim mekušcima bodljikašima i pojedinim ugroženim vrstama, kako kralježnjaka tako i beskralježnjaka (Tiersch i sur., 2007). Prepreke na koje nailazi komercijalna primjena ove tehnologije su raznolike i široko rasprostranjene. Općenito, radi se o tehničkim poteškoćama kao što su; male količine sperme, različitost rezultata, neujednačen pristup tehnologiji, i što je najvažnije, nedostatak standardizacije u praksi i izvješćivanju. Prednosti zamrzavanja uključuju najmanje četiri razine poboljšanja postojećih industrija i stvaranje uvjeta za nove industrije. **Prvo**, zamrzavanje se može koristiti za poboljšanje postojećih mrjestilišta, poboljšanje poslovanja pružajući sjeme na potražnju kao i pojednostavljenje protokola umjetnog induciranih mrijesta. **Drugo**, zamrznuti spermatozoïdi mogu poboljšati učinkovitost korištenja prostora, otvaraju se nove mogućnosti u mrjestilištu eliminirajući potrebu za održavanje živih mužjaka, oslobađaju se potencijalni materijalni resursi. **Treće**, vrijedni se genetski materijali kao na primjer kod pojedinih ugroženih vrsta, mogu pohranjivati putem zaštićene banke spermatozoïda. **Četvrto**, zamrzavanje

spermatozoida otvara vrata za brzo genetsko poboljšanje. Zamrznuti spermatozoidi se mogu koristiti u uzgojnim programima za stvaranje i oblikovanja genetskih resursa dostupnih za akvakulturu i marikulturu. Konačno, pretpostavke su da će zamrznuti spermatozoidi akvatičnih vrsta u nekom trenutku postati sami po sebi posve nova industrija (Mazur, 2004).

Ljudi od davnina love trpove, a to se radi još i danas, i u umjerenom pojusu i u tropskim morima. Ustvari, neki će ih ronioci loviti bez obzira na to što znaju da se mogu povrijediti, pa čak i poginuti. Trpove se najviše lovi za kinesko tržište i druge dijelove Dalekog istoka — baš kao što je to stoljećima bio slučaj. Sušeni trpovi najprije se kuhaju u slanoj vodi, zatim im se vadi utroba, pa se suše na dimu ili suncu te se prodaju. Međutim, ove nezamjetljive i neupadljive životinje nisu korisne samo za jelo. Možemo biti zahvalni što neumorno održavaju, «čiste» i prozračuju morsko dno. Od davnina kožu trpova koriste sportski ribolovci kao mamac.

Zbog svoje kvalitete i velike mogućnosti primjene, trpovi se u svijetu prekomjerno love što vodi k smanjenju njihovih populacija, a u konačnici i do potpunog nestanka pojedinih populacija na područjima izlovljavanja. Zbog toga, u posljednje vrijeme trp je postao predmet proučavanja i u kriobiologiji radi smrzavanja spermatozoida koji se mogu odmrznuti i oploditi jajašće u toku godine kada nisu postojani uvjeti za mrijest.

1.1 KRIOBIOLOGIJA

Znanstvena podupiranja kriobiologije evidentna su od 1950-ih, a razvoj ove grane tehnologije krenuo je nakon otkrića krioprotektanta, tj. sposobnosti glicerola da očuva vijabilnost spermatozoida u uvjetima smrzavanja (Polge i sur., 1949). Krijoprezervacija je proces prezervacije ili čuvanja biološkog materijala, stanica i tkiva hlađenjem na niskim temperaturama, obično -196 °C (tekući dušik), i održavanja vijabilnosti nakon naknadnog zagrijavanja na temperaturi iznad 0°C. Proces zamrzavanja sperme obično uključuje suspenziju tj. otopinu, procjenu kvalitete, dodatak antifrina, uravnoteženje zamrzavanja, odmrzavanje i oplodnju, te rani životni razvoj koji ovisi o uspješnosti samog procesa (Tiersch, 2000). Smrzavanje počinje nakon određenog perioda hlađenja. Tijekom smrzavanja (formiranja ledene kristalne strukture) kristalizacija počinje oko takozvane ledene jezgre, a taj

proces se naziva ledena nukleacija (Denniston i sur., 2000). Ledena nukleacija se može pojaviti u dva oblika, a to su :

- homogena ledena nukleacija** → jako čista otopina malih razlika u koncentraciji djeluje kao ledena jezgra,
- heterogena ledena nukleacija**, više uobičajen oblik → male kontaminirajuće čestice, nečistoće služe kao ledena jezgra.

Ledena nukleacija je početak formiranja ledene jezgre, tj. početni proces kristalizacije. To je proces u kojem se ioni, atomi ili molekule organiziraju u uzorak najbliži kristalnoj tvari, stvarajući mjesto u kojem se dodatne čestice kristalno deponiraju (rastu). Drugi način dovođenja vode u kruto stanje je hlađenje vode ili vodene otopine veoma brzo, gdje vodene molekule nemaju dovoljno vremena formirati ledenu kristalnu strukturu i oštetiti stanične membrane. Potrebne hlađene temperature su izuzetno visoke za čiste tekućine (npr. 10 milijuna stupnjeva po sekundi za čistu vodu), ali mnogo realnije za otopine. Kod otopina pri ovakovom postupku, stopa hlađenja je 0,1 do 10 °C / s (ugrubo 10 - 1,000 °C / min) gdje nastaje transformiranje u amorfnu strukturu nalik staklu. Taj proces se naziva vitrifikacija, a predstavlja trenutak u postupku hlađenja. Vitrifikacija je revolucionarna tehnika zamrzavanja koja kombinira visoke koncentracije krioprotектanta s vrlo brzim hlađenjem, pri čemu stanica i okolna otopina poprimaju amorfnu strukturu sličnu staklu bez stvaranja kristala leda (Herrero i sur., 2011). Za uspješnu vitrifikaciju potrebni su: krioprotektant, odgovarajuća brzina hlađenja, dovoljno niska temperatura skladištenja, odgovarajuća brzina otapanja, te što manji volumen za bolji postotak vitrifikacije. Vitrificirano stanje nije vrlo stabilno i takve otopine se moraju držati na vrlo niskim temperaturama. Kod devitrifikacije dolazi do pojavljivanja ledene jezgre i formiranja kristalne strukture u vitrificiranoj otopini. Sve tekućine koje su smrznute ispod - 139 °C su sastavljene od mješavine kristalne ledene strukture i vitrificiranog stanja, za uspješno čuvanje živih stanica tehnikom zamrzavanja potrebne su kemikalije koje nazivamo krioprotektanti.

1.1.1. ODABIR KRIOPROTEKTANATA I URAVNOTEŽENJE

Krioprotектanti su kemikalije koje se koriste za zaštitu stanica od oštećenja za vrijeme zamrzavanja i otapanja. Ovakve tvari djeluju poput antifriza - sprječavaju formiranje kristala leda. Najčešći primjeri krioprotектanata su glicerol, koji se koristi u bankama krvi i sperme, etilen glikol - antifriz u automobilima, propilen glikol - sastojak sladoleda, i dimetil sulfoksid (DMSO), važan za krioprezervaciju embrija. Glicerol se koristi u krionici od njezinih najranijih dana. Iako se mehanizmi djelovanja još nisu u potpunosti razjasnili, vjeruje se da dimetil - sulfoksid smanjuje ledište otopine, minimizira osmotski šok izmjenom vode unutar stanice, te smanjenje stvaranje kristala leda unutar stanice (Doebbler, 1966; Rowe, 1966; Leung, 1991). Vjeruje se da šećeri i polimeri stabiliziraju membranu tijekom zamrzavanja (Meryman, 1971), uz optimalnu koncentraciju krioprotектanta (Taylor i sur., 1974), dok previsoke koncentracije istog uzrokuju osmotsku neravnotežu i puknuća stjenke u stanica. Osim toga, krioprotектanti su često toksični za stanice, te su tako izbor krioprotектanta i njihova optimalna koncentracija fokusom brojnih istraživanja. Kod procesa zamrzavanja, stopa hlađenja treba biti dovoljno spora kako bi se smanjila količina unutar - staničnog leda, a ipak dovoljno brza kako bi se smanjila izloženost stanice niskim temperaturama (koncentracija i taloženje otopljenih tvari koje nastaju kada se prelazi granica iz tekućeg u kruto stanje). Općenito, brzo otapanje je poželjno kako bi se smanjila šteta povezana s rekristalizacijom (malih kristala u velike, tijekom odmrzavanja). Brojne studije su posvećene optimizaciji pojedinih komponenata u samom postupku zamrzavanja. Međutim, osim spomenutih, drugi čimbenici, kao što su gustoća uzorka, kontejner za zamrzavanje, početne temperature, završne temperature (prije poniranja u tekući dušik), razrjeđivanje i odstranjivanje krioprotектanta nakon odmrzavanja, također mogu utjecati na rezultate (Leibo , 2000.) stoga postupci zamrzavanja se moraju prilagoditi za svaku vrstu i tip stanica pojedinačno (Mauger i sur., 2006.)

Quick-Reference Chart (To be used as a general guide only)			
Cell Type	No. of Cells	Cryoprotective Agent	Temperature
Bacteria	10 ⁷ /mL	Glycerol (10%)	-60°C*
Bacteriophage	10 ⁸ pfu/mL	Glycerol (10%)	-80°C
Fungi			
Hyphae	†	Glycerol (10%)	-150°C
Spores	10 ⁶ /mL	Glycerol (10%)	-80°C
Yeast	10 ⁷ /mL	Glycerol (10%)	-150°C
Protozoa	10 ⁵ -10 ⁷ /mL	DMSO (5-10%) or Glycerol (10-20%)	-150°C
Algae	10 ⁵ -10 ⁷ /mL	Methanol (5-10%) or DMSO (5-10%)	-150°C
Plant Cells	**	DMSO (5 -10%) + Glycerol (5-10%)	-150°C
Animal Cells	10 ⁶ -10 ⁷ /mL	DMSO (5-10%) or Glycerol (5-10%)	-150°C
Hybridomas	10 ⁷ /mL	DMSO (5-10%) + Serum (20%)	-150°C
Stem Cells	10 ⁵ -10 ⁶ /mL	DMSO (5-10%) + Serum (20-90%)	-150°C
<i>Sub/Non Cellular Materials</i>			
Plant viruses	†	None	-80°C
Animal viruses			
Cell Free	†	None	-80°C
Infected Cells	10 ⁶ /mL	DMSO (7%) + Fetal Bovine Serum (10%)	-150°C
Plasmids	10 ⁶ /mL	Glycerol (10%)	-150°C
Phage Libraries	†	Glycerol (10%)	-150°C
DNA	◊	None	- 80°C
RNA	◊	None	- 80°C
Protein	◊	None	- 80°C
Serum	◊	None	- 80°C
<i>Multicellular</i>			
Embryos	20	1,2-propanediol, glycerol or ethylene glycol	-150°C
Tissues	◊	OCT	- 80°C
Blood	◊	Glycerol	-150°C ^o

Slika 1. Vrsta stanice i krioprotektanti potrebni za njihovo smrzavanje

(Simione, F.P. i J.Z. Karpinsky, 1996)

1.1.2. OSMOTSKI UVJETI I STOPA HLAĐENJA

Brzina hlađenja je glavni čimbenik za opstanak stanice, maksimalne stope preživljavanje su zabilježene u srednjim brzinama, one nisu niti prebrze, a ni prespore. Vijabilnost spermatozoida ovisi o mnogim interakcijama; stopama hlađenja i zamrzavanja, i osmotskoj ravnoteži. Kod živih stanica i tkiva stanične membrane rade kao polupropusne barijere vode i drugih otapala (između citoplazme i izvanstaničnog prostora). S obzirom na funkciju membrane, hlađenje može biti;

Sporo hlađenje: Sporom hlađenjem postupno pada temperatura. Nedostatak sporog hlađenja je taj da ledena nukleacija uvijek počinje u izvanstaničnom prostoru (Mazur, 1970). Kad se voda počne smrzavati u izvanstaničnom prostoru, stanice reagiraju na rast osmotskog tlaka otpuštanjem vode kroz staničnu membranu. Ako se stanice sporo hlađe stanice moraju otpuštati dosta vode, što može rezultirati nepovratnim gubitkom vode unutar stanica što nije više nadoknadivo prilikom otapanja.

Brzo hlađenje: nedostatak je taj da stanice ne otpuštaju dovoljno molekula vode koje ostaju smrznute unutar stanice. Led razara stanične strukture (Golgijev aparat, endoplazmatski retikulum i membrane stanica) uzrokujući nepovratna mehanička oštećenja (Mazur, 1963; Leibo, 1980).

Uravnoteženo hlađenje: Uravnotežena stopa hlađenja omogućava stanicama otpuštanje dovoljno molekula vode da se izbjegne mehaničko oštećenje stanice. S druge strane česti nedostaci su nedovoljno zadržavanje vode kako bi se reducirali učinci otapanja u procesu krioprezervacije.

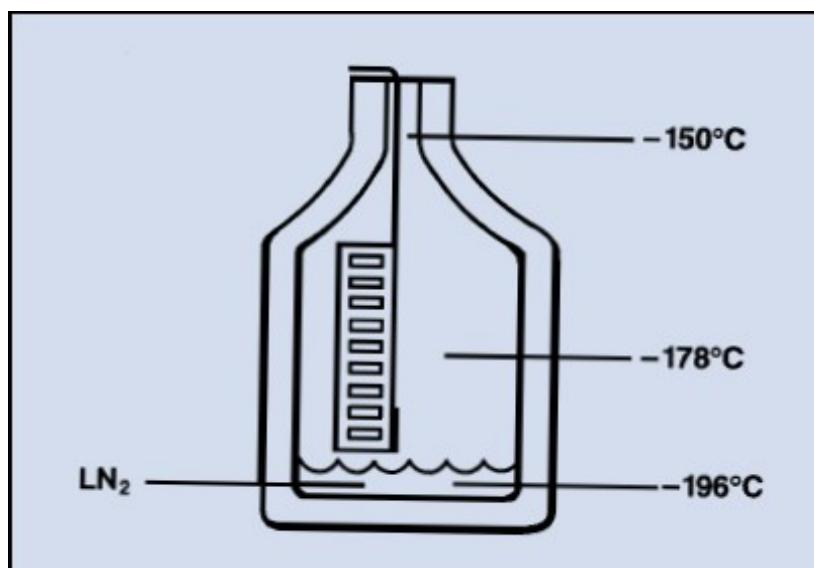
Ultrabrzno hlađenje: kod ovakvog procesa stopa hlađenja je toliko brza da nema dovoljno vremena za formaciju kristala leda već se predmet smrzavanja hlađi u nekristaliziranu amorfnu masu nalik staklu. Tijekom ovakvog procesa nema izmjene vode kroz stanične membrane, a postupak je moguć direktnim ubacivanjem bioloških uzoraka u tekući dušik pri temperaturi od -196 ° C. Kod zamrzavanja bioloških uzoraka potrebno je utvrditi optimalnu stopu hlađenja, a ona koleba ovisno o nekoliko čimbenika koji uključuju; vrstu stanice ili tkiva, prirodu korištenog krioprotektanta, tip tvari za smrzavanje (npr. suhi led ili tekući dušik) itd.

1.1.3. METODE KRIOPREZERVACIJE

Metode krioprezervacije su jako raznolike i ovise o tipu stanica i tkiva, dostupnoj opremi i tehnikama laboratorija. Ipak, mogu se grupirati u nekoliko kategorija prema razlicitim kriterijima, kao sto su tvar za hlađenje, posude za hlađenje ili oprema za hlađenje.

Prema tvarima za hlađenje imamo:

- Suhi led → kruti CO₂. Ugljični dioksid nema tekuću fazu, prelazi direktno krutog u plinovito stanje procesom koji se naziva sublimacija. Temperatura sublimacije CO₂ je -79 °C. Suhi led se koristi u mnogim slučajevima jer je hladniji od vodenog leda i ne ostavlja mokre tragove. Uglavnom se koristi za hlađenje i transport, a rijetko za skladištenje uzoraka.
- Tekući dušik → tekući oblik molekularnog dušika N₂. Točka vrenja tekućeg dušika je -196 °C, a prelazi u kruto stanje na temperaturi od -210 °C. Kontakt s tekućim dušikom može izazvati ozljede nalik opekontinama pa se njime mora oprezno rukovati. Iako tekući dušik jako brzo isparava može se čuvati na temperaturi vrenja u vakumskom spremniku duplih stijenka na određeno vrijeme. Kako je temperatura vrenja tekućeg dušika dovoljno hladna da održi čak i vitrificirano stanje stabilnim najčešće se koristi za krioprezervaciju. Hlađenje uzoraka smrzavanjem se provodi na isparavajućem tekućem dušiku, a vitrifikacija i skladištenje uranjanjem u tekući dušik.



Slika 2: Skica posude za čuvanje uzoraka koristeći tekući dušik

(Simione, F.P. i J.Z. Karpinsky, 1996)

POSUDE ZA HLAĐENJE:

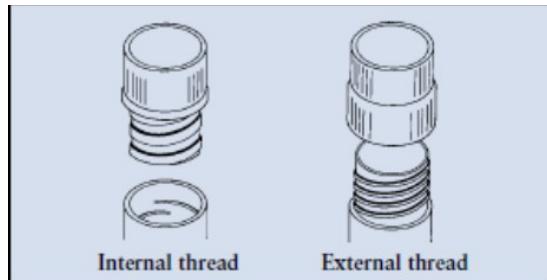
Pelet metoda → kod ove metode ne koriste se specifične posude za krioprezervaciju, nego sama struktura suhog leda pri temperaturi od -78°C. Utori se rade na površini suhog leda i razrijedene stanice s ekstenderom i krioprotektantom se iz pipete ukapavaju u utore. Otopine se spermatozoida, čim dotaknu površinu suhog leda smrzavaju sakupljaju s površine te pohranjuju u male plastične kontejnere koji se zatim skladište u tekućem dušiku. Jedina prednost ove metode je jednostavnost. Nedostaci ove metode su nedostupnost podataka o stopama hlađenja te se stoga ne mogu niti regulirati. Oblik peleta suhog leda je ograničava veličinu i volumen smrznute tvari (Scott i Baynes, 1980; Harvey, 1983).

Cjevčice → U procesu zamrzavanja, pakiranja i skladištenja važno je uskladiti stope hlađenja i otapanja, te osigurati laku identifikacija uzorka. Često je slučaj da se zbog malog raspoloživog volumena uzorka, npr. spermatozoida, koriste staklene kapilarne cjevčice ili kriobočice (0,25 ml) (Lahnsteiner i sur., 1997).

Čuvanje uzorka - Ampule i bočice

Niz malih spremnika poput plamenom zataljenih staklenih ampula i plastičnih bočica mogu se koristiti za spremanje stanica na ultra niskim temperaturama. Najčešće se koriste kriobočice veličine 1.2 - 2.0 mL, zbog jednostavnosti rukovanja tijekom preuzimanja. Općenito, 0,5-1,0 ml stanične suspenzije se stavi u svaku kriobočicu ili ampulu. Nekoliko čimbenika se mora uzeti u obzir za temperature iznad -100°C, gdje niske temperature uzrokuju blaža mehanička naprezanja, međutim kada se pohranjuje na temperature tekućeg dušika, spremnici su posebno dizajnirani da izdrže niske temperature. Različite posude su posebno dizajnirane za korištenje kriogena. Plastične bočice imaju vijak na zatvaračima s vanjskim i unutarnjim navojem (Sl. 4) Ostali spremnici se mogu koristiti za pohranu zamrznutih materijala uključujući slamke koje se tradicionalno koriste za embrije.

Staklene ampule mogu biti zapečaćene plamenom, no mora se voditi računa da se brtvljenje obavlja kako treba, jer nepropisno zapečaćene staklene ampule mogu imati microrupice i do $15\mu\text{m}$ koje omogućavaju prođor tekućine u unutrašnjost.



Slika 3. Vanjski i unutarnji navoj na boćicama za krioprezervaciju

(Greiff i sur., 1975)

1.2. KRIOPREZERVACIJA SPERMATOZOIDA TRPOVA

Zamrzavanje spolnih stanica je sastavni dio u potpomognutoj oplodnji mnogih vrsta. Glavne varijable kriobiologije proizlaze iz studije životinjskih spolnih stanica, a one su: stope hlađenja i zagrijavanja, razvojna faza i tip, unutarstanični led, volumen stanica tijekom hlađenja, osmotski odgovori, temperatura i oštećenja stanica tijekom hlađenja (Leibo, 2002; Mazur i sur., 1972, 1984). Stanice mogu biti oštećene kad djeluje osmotski šok na njih. Takav šok se može dogoditi kada su stanice suspendirane u hipertoničnom mediju koji se naglo razrijedi izotoničnom otopinom. Spermatozoidi su kroz razne studije, pokazali posebnu osjetljivost na osmotski šok (Leibo i Bradley , 1999). Opća svojstva spermatozoida ukazuju na pretpostavke uspješnog zamrzavanja. To su male stanice s visokom propusljivošću vode i antifriza, sa niskim sadržajem vode (Rall, 2001). Međutim, praktično iskustvo pokazuje da se spermiji mnogih vrsta posebno teško kriočuvaju (Holt, 2000b). Razlika u njihovoj toleranciji na glicerol i ostale krioprotектante može biti značajna i dodatno komplificira stvar (Holt, 2000 a,b). Varijacije svojstava često su prisutna među vrstama, pa čak i među pojedincima unutar jedne vrste (Rall, 2001).

Krioprezervacija spermatozoida trpa je postignuta kod nekoliko vrsta zastupljenih u svjetskim morima, a s obzirom da ekonomska važnost diktira smjer kretanja, nedostaju istraživanja za one vrste koje su ugrožene. Stoga su dostupni objavljeni podaci vezani isključivo za ekonomski najvažniju vrstu, a to je, *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Mingyu Shao i sur. 2006).

Nakon aktivacije sa 100% SFW (sea fresh water), spermatozoidi ostaju aktivni satima, a ponekad i danima. Najčešće primjenjivani krioprotektanti su dimetil-sulfoksid (DMSO) i metanol MeOH u koncentracijama između 5-20% volumena. Koriste se cjevčice 0.25-0.5 ml volumena, a spolne stanice se razrjeđuju u Hank-ovoju uravnoteženoj solnoj otopini ili u morskoj vodi. Nakon dodavanja krioprotektanta, slamčice se stavljuju u zatvorenu stiropornu kutiju u kojoj se nalazi tekući dušik N₂. U eksperimentalnim uvjetima, zamrzavanje uzoraka se prakticira na visinama; 2, 4, 6 i 8 cm iznad površine tekućeg dušika i različitim vremenskim periodima, nakon čega se uzorci uranjaju u tekući dušik na nekoliko minuta te pritom vade. Stope hlađenja, izbor krioprotektanata i vremenski period izlaganja hladnim temperaturama, bitno utječu na preživljavanje spermatozoida. U posljednje vrijeme, istraživanja su u porastu zbog potencijalnih primjena kao npr., poboljšanje rukovođenja i proizvodnja nasada, dostupnosti i distribucije selektiranih linija (npr. linija otpornih na bolesti) i razvoja i održavanja genetski modificiranih stokova (Paniagua-Chavez i Tiersch, 2001). Unatoč velikim istraživačkim naporima, stope preživljavanja nakon otapanja još uvijek ne pokazuju dobre rezultate i mogućnosti, te su potrebna daljnja optimizacija protokola smrzavanja i procedure standardizacija.

Izrada protokola

Općenito, zamrzavanje spermatozoida obuhvaća niz koraka, uključujući: (1) prikupljanje sperme; (2) raspršivanje u razrjeđivaču ili ekstenderu, (3) dodavanje krioprotektanta, (4) pakiranje uzoraka spermatozoida; (5) zamrzavanje, (6) otapanje, i (7) procjena plodnosti (Tiersch, 2000). Uspostavljanje protokola uključuje procjenu i optimizaciju više čimbenika (npr., vrsta i koncentracija za svaki krioprotektant), kao i interakcije između samih čimbenika (npr. između krioprotektanta i brzine hlađenja).

Prikupljanje uzoraka i razrjeđivanje

Uobičajeno skupljanje sperme uključuje ekstrakciju i mehaničku maceraciju gonadnog tkiva. Da bi se povećao volumen raspoložive sperme, maceracija izrezanih testisa je od velike važnosti (Huang i sur., 2004 a, b i c ;Yang i sur., 2006). Razrjeđivanje otopine spermatozoida nakon skupljanja je nužno kako bi se uskladila optimizacija čimbenika u krioprezervaciji. Međutim, ekstremnim razrjeđivanjem uzoraka spermatozoida smanjuje se njihova pokretljivost (Paniagua - Chavez i sur., 1998).

Procjena vremena aktivno pokretnih spermatozoida

Produciranje vremena aktivno pokretnih spermatozoida odnosi se na otopinu soli, koja sadrži organske spojeve kao šećere koji potpomažu održivosti spermatozoida prije i tijekom postupka zamrzavanja (npr. Hanks uravnotežena otopina soli). Uporaba punila se temelji na kontroli pH i osmolarnosti kao i opskrbi energijom, a može produžiti život i funkcionalnu sposobnost čuvane sperme. U većine organizama s vanjskom oplodnjom, pokretljivost spermatozoida može se aktivirati hipotoničnim (za slatkovodne organizme) ili hipertoničnim medijem (za morske organizme). Nakon postupka aktivacije spermatozoidi mogu biti pokretni danima ovisno u kojem hipoosmotskom mediju se drže (Morisawa i Suzuki, 1980; Morisawa i sur., 1983). Dakle, spermatozoidi se obično održavaju u razrijeđenoj otopini, ekstenderu, koja povećava volumen, omogućuje zaštitu od temperaturnih varijacija, sadrži nutrijente te ima odgovarajući osmolaritet (gotovo izotoničan s plazmom) važan zbog inhibicije neželjene aktivacije (Bates i Tiersch , 1996).

1.3. BIOLOŠKE ZNAČAJKE TRPOVA

Trpovi imaju uzdužnu os tijela mnogo dulju od postrane osi, pa je zbog toga njihovo tijelo produljeno. Oni se ne drže dna usnom stranom kao ostali slobodno - bodljikaši, nego su na njemu polegnuti po duljini. Ona strana tijela koja leži na dnu često je drugačije razvijena, sploštena, pa su mnogi trpovi vanjštinom postali opet bilateralni. S donje su strane obično razvijena tri ambulakra. U njima su čvrste prionjive nožice koje s donje strane čine trivij. Ostala dva ambulakra s gornje strane čine bivij, a ambulakralne nožice u njima su pipala (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Oko usta na prednjem dijelu tijela trpovi imaju vijenac od 10-30 ticala koji su različita oblika: štitasta, granata, prstasta, perasta, pa se po njihovu obliku trpovi i svrstavaju. Ticala su iznad vapnenastog prstena koji je izgrađen od 10 ili više većih pločica koje oblažu početak crijeva. Kožni je skelet trpova slabo razvijen. Kod nekih se zadržao samo u tom vapnenastom prstenu, a ima trpova i bez njega. U debeloj koži trpova razvijena je jaka kožno-mišićna mješina od uzdužnih i kružnih mišića pomoću kojih se tijelo može savijati. Osim toga, uzduž tijela zrakasto se proteže još pet snažnih dvojnih mišićnih vrpcia za stezanje tijela. U koži trpova uložene su mnogobrojne malene vapnene pločice, osikule, koje su različita oblika: nježna

šupljikava kolašca, pločice sidra i sl., ali su one u koži poslagane po nekom simetričnom redu (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Crni pigment stijenke tijela je melanin koji nastaje od kuglica celomocita smještenih u stjenci tijela. Celomociti sadrže enzim tirozinazu, koji aminokiselinu tirozin pretvaraju u melanin. Prisutnost masnog žutog pigmenta kod mnogih trpova tipično je za skupinu karotenoida, uključujući ksantofile. U vodenim plućima, mazenteriju, probavilu i gonadama kod vrste, *Holothuria tubulosa*, *H. forskali* i *H. polii* nađene su lipoidne tvari, uključujući karotenoide. Lipoidne tvari sadrže 8-15% suhe mase. Spektroskopskim je ispitivanjem otkrivena prisutnost beta-karotena, ksantofila i astacina. Općenito veći postotak lipoidnih tvari u ženke nego u mužjaka, osobito u gonadama. Karotenoidi se dobivaju većinom hranom i moraju proći kroz stjenku probavila da dospiju u druge organe. U trpova postoji arginin, ali nema kreatina (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Unutrašnja tjelesna stjenka celoma je trepetljikavi peritoninski epitel koji pomaže optoku celomske tekućine. Dulje crijevo trpova smotano je udesno, a u tjelesnoj ga šupljini pridržava mazenterij (Matoničkin, I. i sur., 1999).

U vodožilnom sustavu trpova kod većine se kamena cjevčica ne otvara na površini kože sitastom pločicom, nego se otvara u tjelesnoj šupljini, a neki imaju i više kamenih cjevčica. Na prstenastoj cjevčici s donje strane tijela je jedan ili više Polijevih mjehurića. Iz nje izlazi i 5 zrakastih, ambulakralnih cjevčica. One se ispod vapnenastog prstenka svijaju najprije prema ustima te se njihovi izdanci izbočuju u ticala koja imaju i svoje mješinice, a onda se u luku okrenu prema natrag i protežu duž tijela sve do crijevnog otvora. No ima trpova kod kojih ticala izlaze izravno iz prstenaste cjevčice, a ambulakralne nožice su im nestale, pa i nemaju nikakvih nožica (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Krvožilni sustav čini prstenasta krvna žila iz koje izlaze krvne žile u probavilo i plodilo, a izlazi i pet uzdužnih krvnih žila koje se pružaju duž ambulakralnih cjevčica. Crijevne krvne žile na lijevom plućnom krilu čine još gustu kapilarnu mrežu (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Živčani sustav trpova prati peterozrakastu simetriju – živčani prsten oko usta od kojeg ide pet zrakastih živaca. Difuzna živčana mreža je na mjestima kondenzirana u živčana vlakna ali bez mozga (stupanj koordinacije sličan žarnjacima s time da grupe živčanih stanica postaju privremeni koordinacijski centri) (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Trpovi borave na dnu mora, gdje polagano pužu, pokretanjem kožno-mišiće mještine, a prionjive im nožice drže tijelo pričvršćeno za podlogu da se mogu bolje svijati. Trpovi kratkih ticala gutaju pjesak i mulj i probavljaju organske tvari koje se tu nađu. Trpovi sa velikim ticalima pružaju iste u vodu te ih od vremena do vremena guraju u usta da obližu hranu koja se na njima uhvatila. Kad se trpovi uz nemire mogu uvući čitav prednji kraj tijela. Pri tome im ticala dođu u usta (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Neki trpovi pri jakim podražajima, kad se čvrsto uhvate ili izvade iz mora, mogu tako snažno raskinuti kožno-mišićnu mješinu da im se mezenterij raskine i utroba kroz crijevni otvor izleti van. Zbog velike sposobnosti obnavljanja izgubljeni organi se brzo nadoknade.

Drugi se pak trpovi od podražaja poprečno utegnu i raskinu na više komada koji se obnove u potpune životinje, pa se tako i nespolno razmnožavaju (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Stražnje crijevo je obično prošireno u prostranu nečisnicu koja služi za disanje. Za disanje kod mnogih trpova služi i velika slijepa izbočina koja se obično razdvoji u dva mnogostruko razgranjena ogranka. To su vodena pluća trpova. Lijevi je ogranač gustom kapilarnom mrežom povezan s krvožilnim sustavom. Osim za disanje, ona vjerojatno služe i za izlučivanje izmeta. U vodena pluća trpovi kroz nečisnicu uvlače vodu i tuda je opet ispuštaju. Kod mnogih trpova u početak jednog ogranka vodenih pluća ulaze blizu nečisnice prstasti ili grozdasti žljezdani organi, Cuvierove mješinice. One se mogu izbacivati van, a njihov sadržaj se izvlači u rastezljive ljepljive niti, a vjerojatno služe za obranu od napadača. Probavilo sadrži žućastu tekućinu koja je vrlo aromatična. Kod vrste, *H. tubulosa* pH u želucu iznosi 7.4-7.8 i 7.0-7.6 na početku crijeva (Matoničkin, I. i sur., 1999).

Spolni organi u trpova su samo u jednoj međuzraci, obično kao jednostavno plodilo s prstastim ograncima od kojeg vodi izvodna cjevčica do spolnog otvora. Otvor je sa leđne strane blizu usta, na uzdignutoj krvžici, ili na vrhu jednog ticala. Trpovi su obično razdvojenog spola, a neki su i dvospolci. Ličinka trpova je aurikularija, koja se kasnije preobrazi u bačvastu ličinku. Ženke mogu čuvati jajašca u posebnim vrećicama na površini tijela, ili među naborima kože, ili se pak jajašca razvijaju u ženkinu tijelu u spolnim cjevčicama, ili u tjelesnoj šupljini (Matoničkin, I. i sur., 1999).

1.3.1. REPRODUKTIVNA BIOLOGIJA OBIČNOG TRPA, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791)

Obični trp, *Holothuria tubulosa* (Slika 4.) je organizam koji se može razmnožavati spolno i nespolno (mnogi su hermafrođiti), iako je mnogo češće spolno razmnožavanje. Nespolno razmnožavanje podrazumijeva podjelu tijela na dva ili više dijelova što je poznato kao fisija.

Spolno razmnožavanje podrazumijeva oplodnju spolnih produkata u vodenom stupcu. Spolni organi trpova izrasli su u samo jednoj međuzraci, kao jednostavno plodilo s prastastim ograncima od kojeg ide izvodna cjevčica do spolnog otvora. Razdvojena su spola, međutim ima i dvospolaca. Ličinka im je auricularia, koja se često preobrazi u bačvastu ličinku, doliolariju. U prirodi im je na prvi pogled teško odrediti spol, pa je jedini način određivanja njihovo seciranje (Pérez-Ruzafa, 1984).

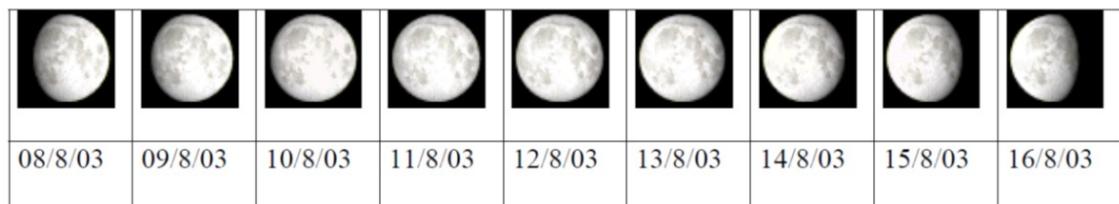


(Slika 4) Obični trp, *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791), na pjeskovito-muljevitom

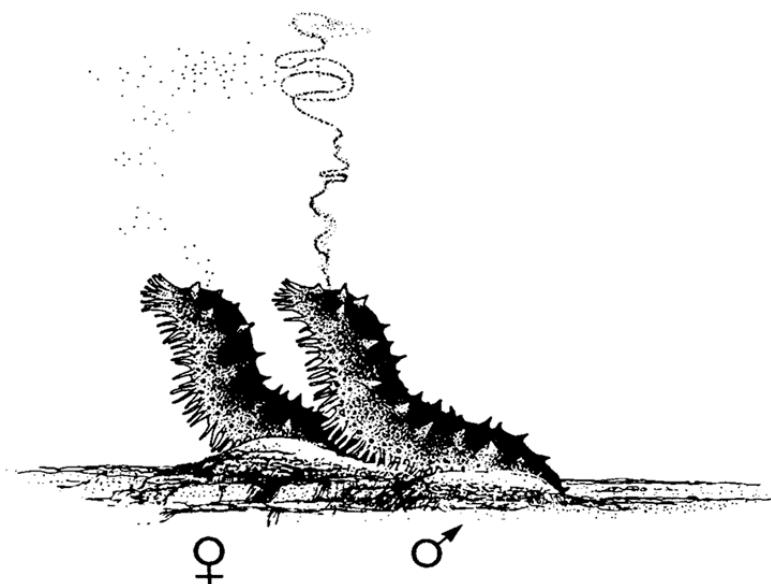
dnu (Paulay, G., 2010)

Iz dosadašnjih istraživanja, objavljeni rezultati za vrstu, *H. tubulosa* ukazuju na početak mriješta u kolovozu (Slika 5.). Tijekom mriješta trpovi podižu anteriorni dio tijela prema morskoj pridnenoj struji, pri čemu oba spola zauzimaju tzv. "kobra" položaj kao što je prikazano na slici (Slika 6), gdje samo trećina posteriornog dijela tijela ostaje u kontaktu s morskim dnem. Otvaraju svoj genitalni otvor koji se nalazi tik ispod usta, te ispuštaju spolni

produkt u smjeru morske struje. Prvo mužjaci emitiraju bjelkastu tekućinu koja se postupno raspršuje u vodenom stupcu. Zatim ženke emitiraju viskoznu smjesu kao odgovor na oslobođanje muških gameta (Asha i Muthiah, 2002). Mrijest uobičajeno traje oko 30 minuta, a potrebni uvjeti za mrijest su puni mjesec (Slika 5.) i čitav niz odgovarajućih okolišnih čimbenika, od kojih je najvažnija temperatura mora, a u Jadranu zabilježeni podaci ukazuju na vrijednosti od 25 ± 3 °C. Spajanjem gameta u vodenom stupcu dolazi do oplodnje. Ličinke žive planktonskim životom od 7 do 13 tjedana (Despalatović i sur., 2004).



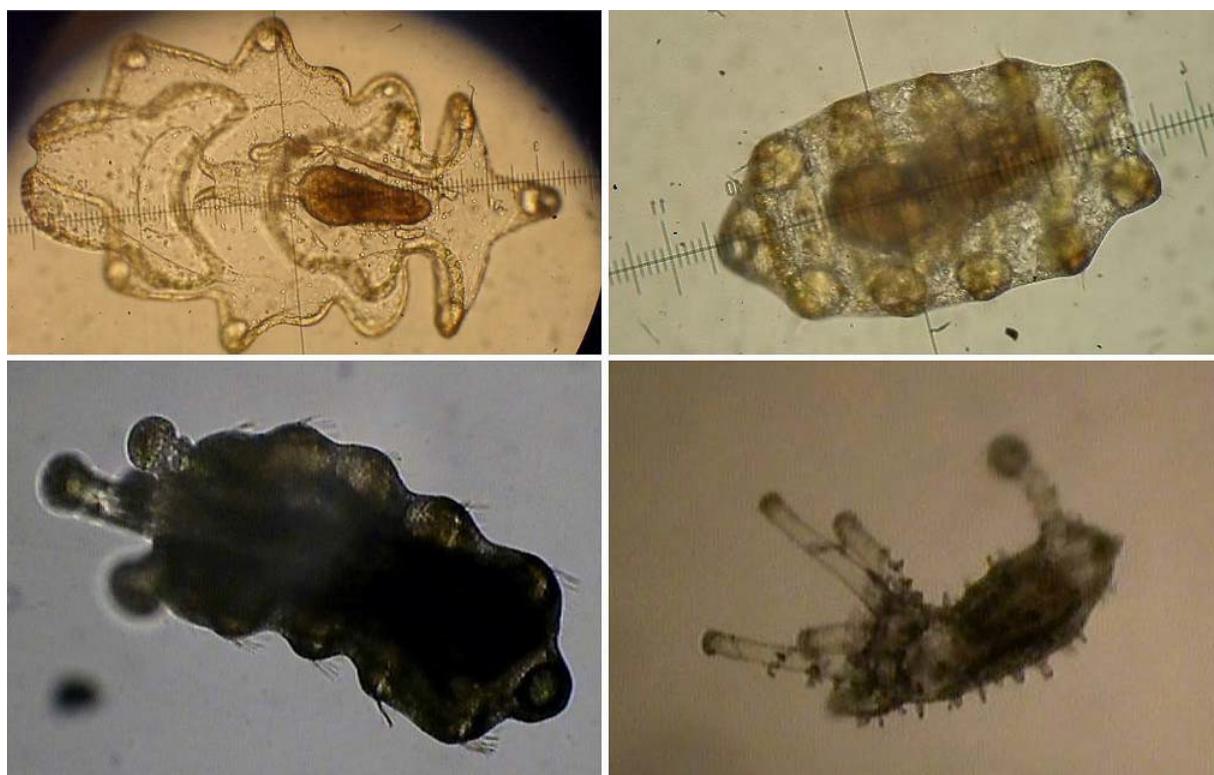
Slika 5: Razdoblje mriješćenja, *Holothuria tubulosa* u mjesecu kolovozu (Ocana, A. i L. Sanchez Tocino, 2005)



Slika 6: Položaj "kobra" skica trpa iz porodice *Holothuriidae* prilikom mrijesta (Cameron i Fankboner, 1986)

Veličina, tj. promjer zrelih jajnih stanica koleba i to od ~100 do 250 μm , a oplodnja, kako je već spomenuto, je uglavnom vanjska. Jaja se izbacuju navečer ili noću, među zajedničkim litoralnim vrstama. Spolno zrela ženka proizvede oko milijun jaja, ovisno o veličini jedinke. Od oplođenog jajašca se najčešće razvija pelagična ličinka nazvana auricularia, čije je tijelo prozirno i duguljasto duž kojeg se raspoređuje serija cilija koja im omogućuje kretanje; skelet nije vidljiv i može imati dimenzije od 350 do 450 μm .

Auricularia se brzo preobražava u drugi ličinački stadij, odnosno u doliolariju, koja ima oblik bačve, a obavijena je s 3-5 cilijatnih prstenova, kojima pripisuje rotacijsko okretanje oko svoje osi i duga je oko 650 μm . Od doliolarie, nizom preobražaja, nastaje sitna holothuria (pentakula) veličine oko 3 mm prilagođena na bentoski način života (Slika 7.) (Bell i sur., 2007; Battaglene i sur., 1999; Hair i sur., 2011; James, 2004; Lavitra i sur., 2009; Morgan 2001; Pitt, 2004).



Slika 7. Ličinački stadiji morskog trpa a) Auricularia, b) Doliolaria, c) Pentaktula d) rani juvenilni stadij

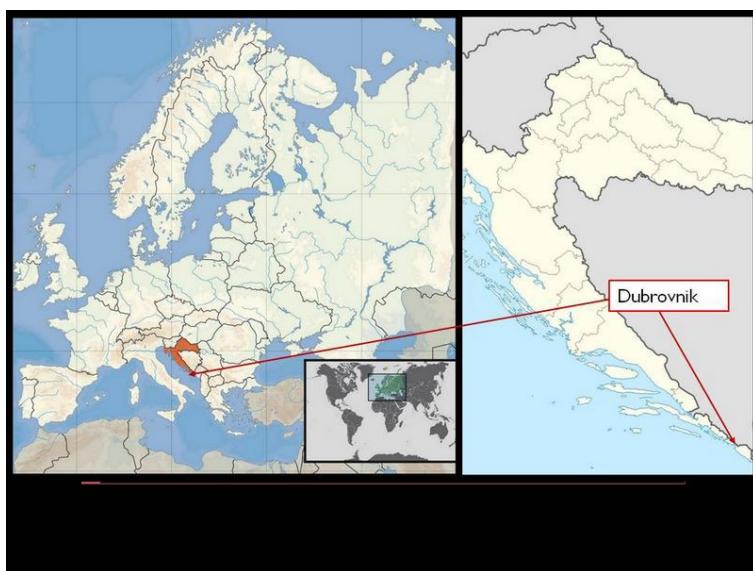
2. MATERIJALI I METODE

2.1. HIDROGRAFSKI PODACI I PODRUČJE UZORKOVANJA

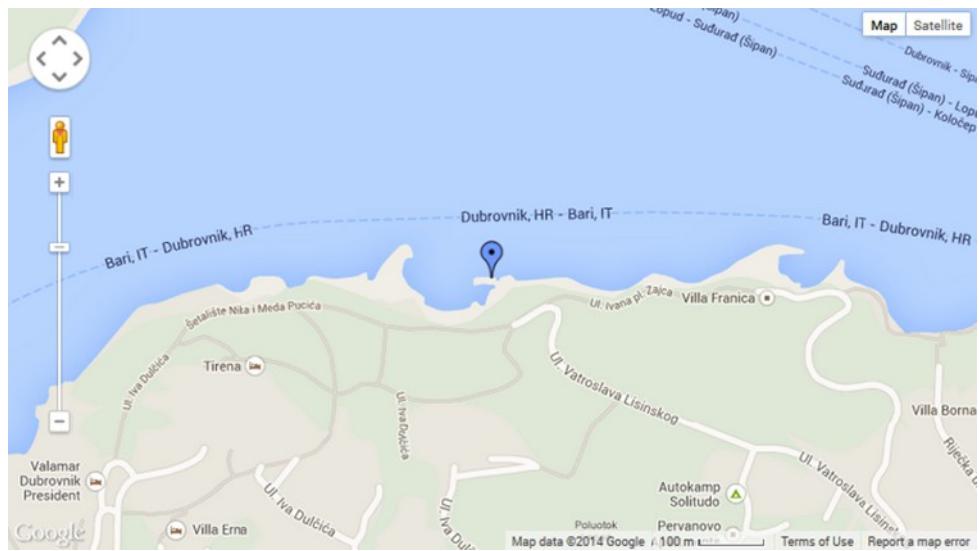
Tijekom trajanja eksperimenta praćeni su hidrografske podaci na mjestu uzorkovanja. Obradivani su sljedeći parametri; temperatura, slanost, otopljeni kisik te pH vrijednost. Za određivanje vrijednosti hidrografskih parametara korištena je WTW multiline hidrografska sonda

Opis područja i metoda uzorkovanja

Trpovi su sakupljeni u Dubrovačkom akvatoriju, na području kupališta Kopakabana ($2^{\circ}39'50''N$ $18^{\circ}03'52''E$) tijekom svibnja, 2013. godine (Slika 8a i b). Uzorkovano je po 30 jedinka, po terenskom izlasku. Ukupno je obavljeno 3 zarona (terenskih izlazaka). Trpovi su transportirani u 10 litarskom prijenosnom tanku u kemijski laboratorij Sveučilišta u Dubrovniku. U laboratoriju, trpovi su čuvani u 60 L tanku na temperaturi od 23 ± 3 °C uz odgovarajuće prozračivanje.



Slika 8a. Područje uzorkovanja. Dubrovački akvatorij



Slika 8b. Područje uzorkovanja. Dubrovački akvatorij – kupalište Kopakabana

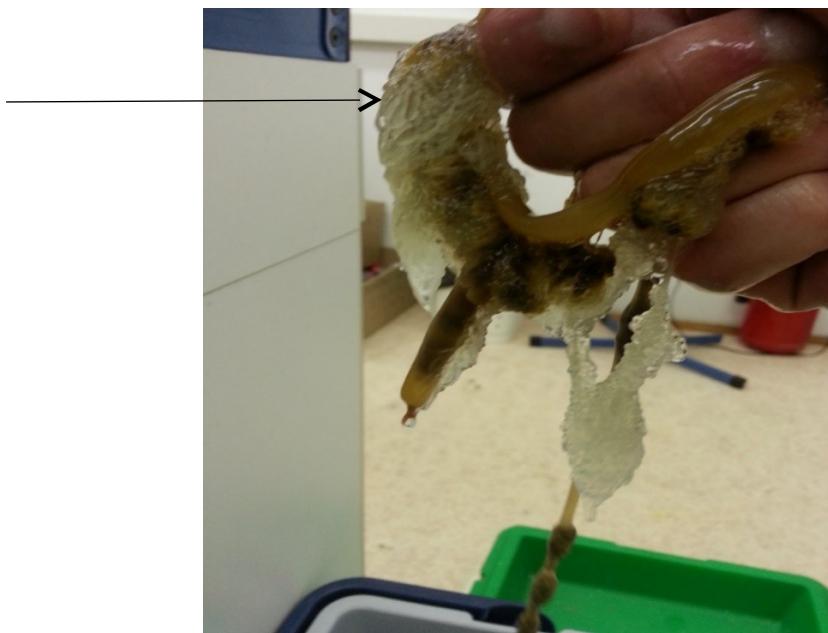
42°39'50"N 18°03'52"E

2.2. MORFOMETRIJSKE I REPRODUKTIVNE ZNAČAJKE

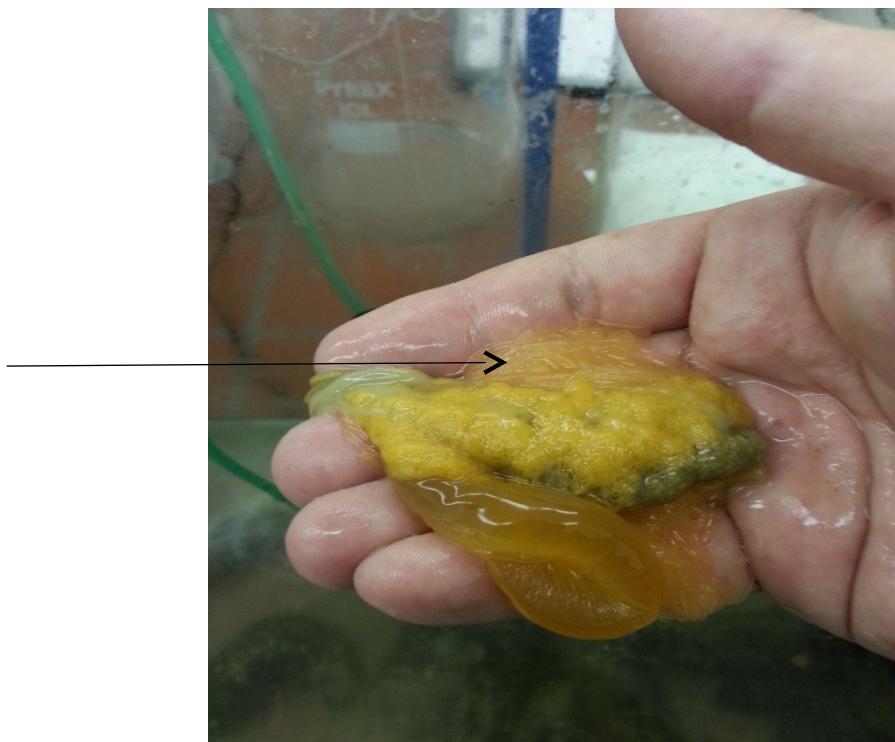
Na svježim uzorcima obavljena su osnovna morfometrijska mjerena, te su analizirani, ukupna masa i ukupna dužina trpova. Gonade su ekstrahirane seciranjem, izmjerena je ocijedena masa, te je određen spol jedinki. 10 Mužjaka jedinki i 10 ženka odvajalo se za mikroskopsku analizu gonadnog tkiva. Morfološke značajke citološke strukture analizirale su se invertnim svjetlosnim mikroskopom marke Olympus IX71, pritom upotrebljavajući softverski program DP Soft. Mjereni su ukupna dužina i promjer gonadnih cjevčica, kao i promjer oocita. Gonadosomatski indeks izračunat je po formuli: $GSI = \text{masa gonada}/\text{ukupna masa} \times 100$.

2.3. POSTUPAK KRIOPREZERVACIJE SPERMATOZOIDA OBIČNOG TRPA, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1971)

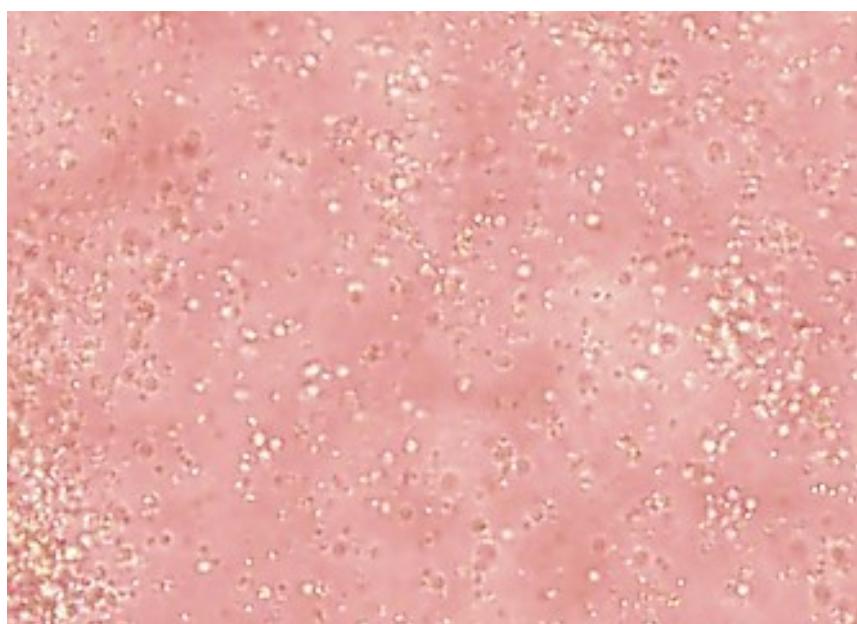
Eksperimentalni postupak obavljen je u triplikatu. U svakom eksperimentu žrtvovano je 30 jedinki. Prosječan omjer spolova u eksperimentalnom postupku bio je 1:1. Nakon seciranja, gonade su ekstrahirane, a testisi macerirani u mužaru za daljnji postupak krioprezervacije. Nakon dodavanja filtrirane morske vode (aktivacija), mikroskopski je promatrana pokretljivost spermatozoida (Slika 11.)



Slika 9. Spolni organ mužjaka, obični trp, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791)



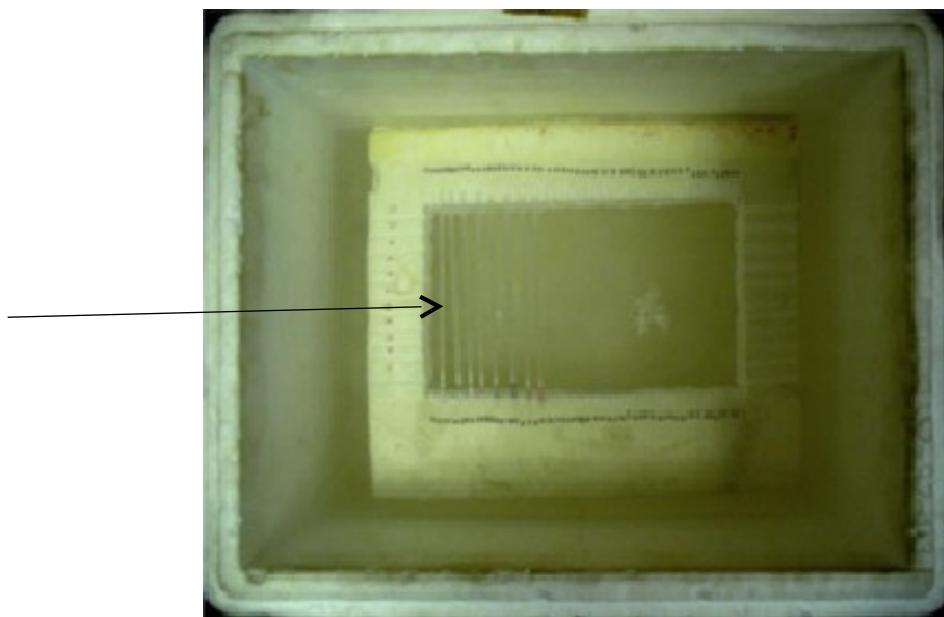
Slika 10. Spolni organ ženke, obični trp, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791)



Slika 11. Pokretljivost spermatozoida nakon dodavanja FSW (filtrirane morske vode)

Pokretljivost spermatozoida je procijenjena pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju od 100x. Pokretljivost je okarakterizirana kao progresivna (kretanje prema naprijed) ili statična (vibriranje u jednom mjestu).

U eksperimentu su se upotrebjavali krioprotektanti dimetil-sulfoksid (DMSO) i methanol (MeOH) u koncentracijama od 10% i 15%. Kriocjevčice volumena 0.5 ml su potom punjene pripremljenom otopinom spermatozoida i smrzavane u tekućem isparavajućem dušiku. Kriocjevčice su bile smještene na stiroporni okvir udaljen 3 i 6 cm (dva odvojena pokusa) od površine tekućeg isparavajućeg dušika u stiropornoj kutiji (slika 12). Vremenski period hlađenja je također bio podijeljen je u dva zasebna postupka u trajanju od 3 i 8 minuta. Nakon uspješnog zamrzavanja, uzorci su uronjeni u vodenu kupelj zagrijanu na 37 - 40 °C, u trajanju od 13 sekundi. Nakon otapanja, otkidati su začepljeni krajevi kriocjevčica te je njihov sadržaj promatran na mikroskopu. Pokretljivost spermatozoida nakon otapanja je procijenjena kao što je prethodno opisano, a promatrana je i aktivacija dodavanjem filtrirane morske vode.



Slika 12. Postupak hlađenja spermatozooida običnog trpa, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791), u kriocjevčicama iznad površine tekućeg isparavajućeg dušika

3. REZULTATI

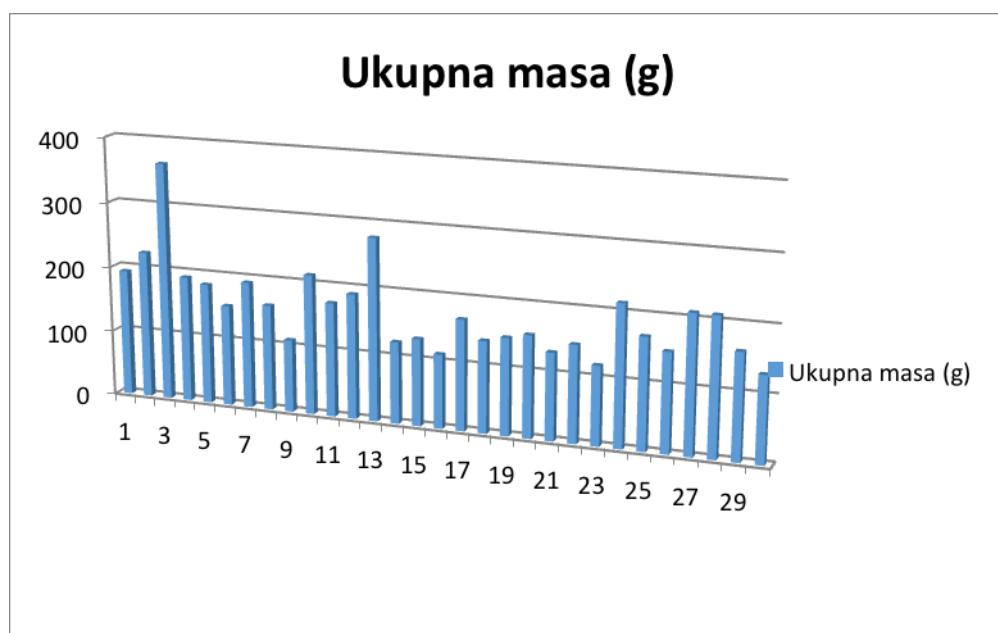
3.1. HIDROGRAFSKI PODACI I PODRUČJE UZORKOVANJA

Prosječne zabilježene srednje vrijednosti hidrografskih parametara iznosile su: temperatura mora, 16°C, slanost, 24.3 ‰, kisik, 13.2 ppm mg/L, te pH vrijednost, 8.33.

3.2. MORFOMETRIJSKE I REPRODUKTIVNE ZNAČAJKE

Prosječan odnos spolova u uzorku od 30 jedinki (po eksperimentalnom postupku) bio je 1:1.

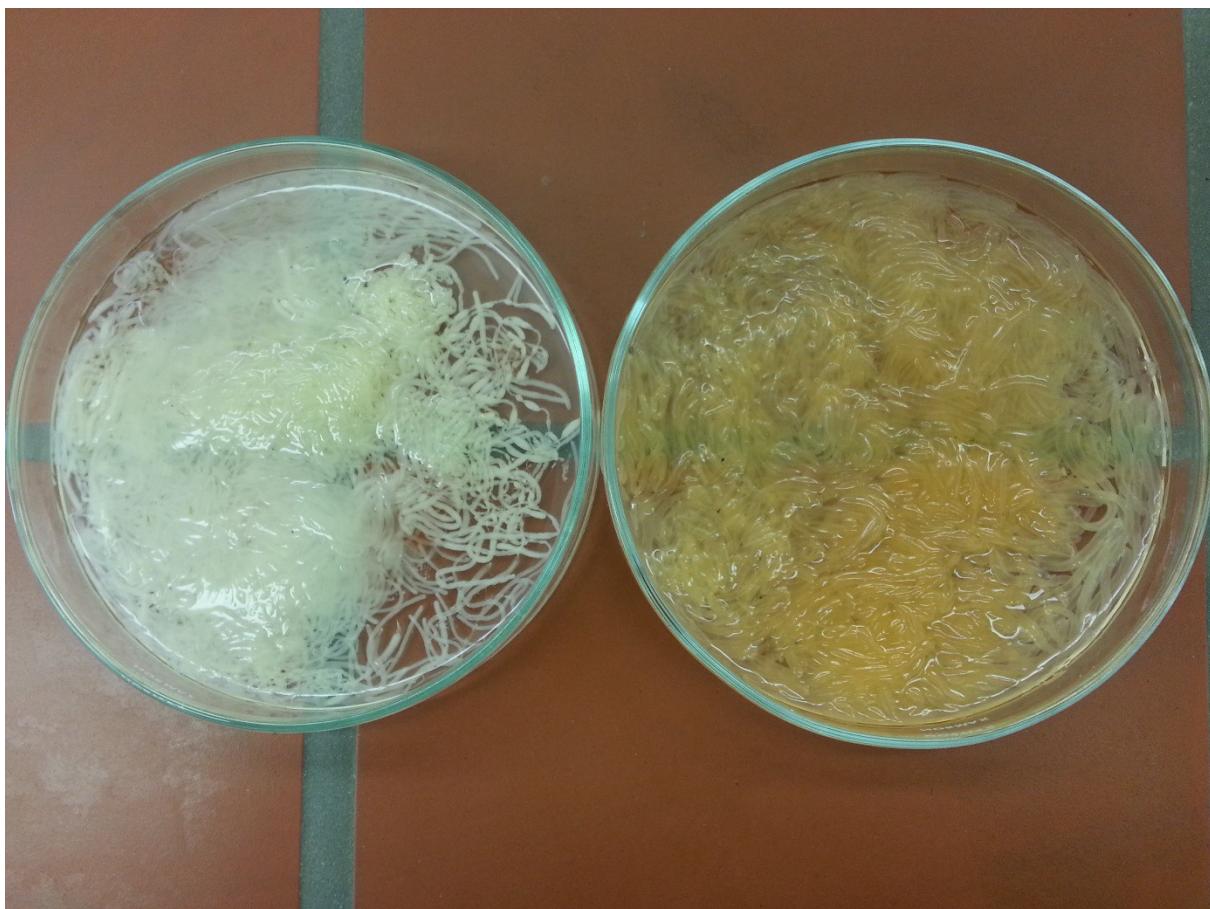
Prosječna ukupna masa cijelokupnog uzorka iznosila je $5098,74 \pm 5$ g, gdje je prosječna ukupna masa ženka iznosila $3037,98 \pm 4$ g, a mužjaka $2060,76$ g. Najmanje i najveće zabilježene vrijednosti mase pojedinih trpova kretale su se u rasponu od 110 g, do 363g sa prosječnom vrijednosti mase od 175,12 g (Slika 13).



Slika 13. Prosječna ukupna iscijedena masa uzorka tijekom Svibnja, 2013. Obični trp, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791)

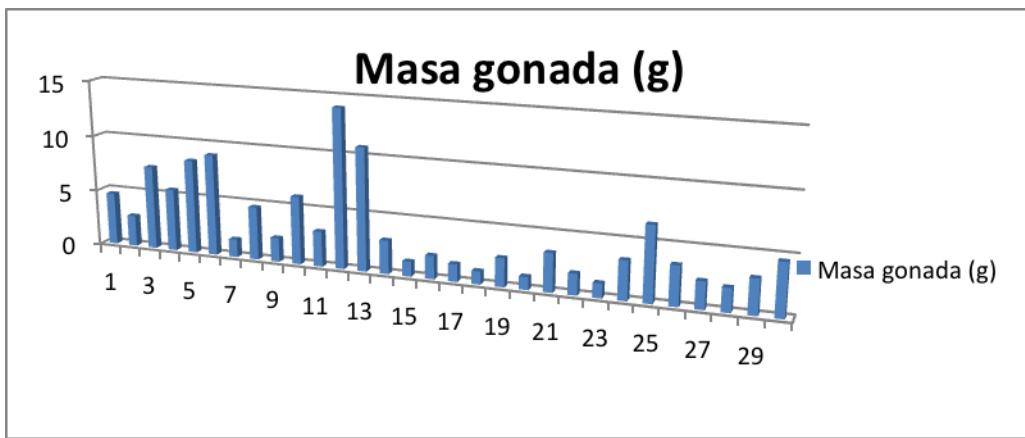
3.2.1. MORFOMETRIJA GONADA

Makroskopskom analizom utvrđen je unutarnji dimorfizam između spolova. Razlike gonada mužjaka i ženka bile su jednostavno uočljive po dvjema osobinama. Bojom su se bitno razlikovale ženke koje su bile u nijansama žuto-narančaste a mužjaci u nijansama bijele boje. Također, razlika u promjeru gonadnih cjevčica je bila uočljiva makroskopski. Gonade mužjaka su sačinjavale tanke nitaste strukture dok su kod ženka ukupni volumen kao i promjer cjevčice bili znatno veći. (Slika 14.)

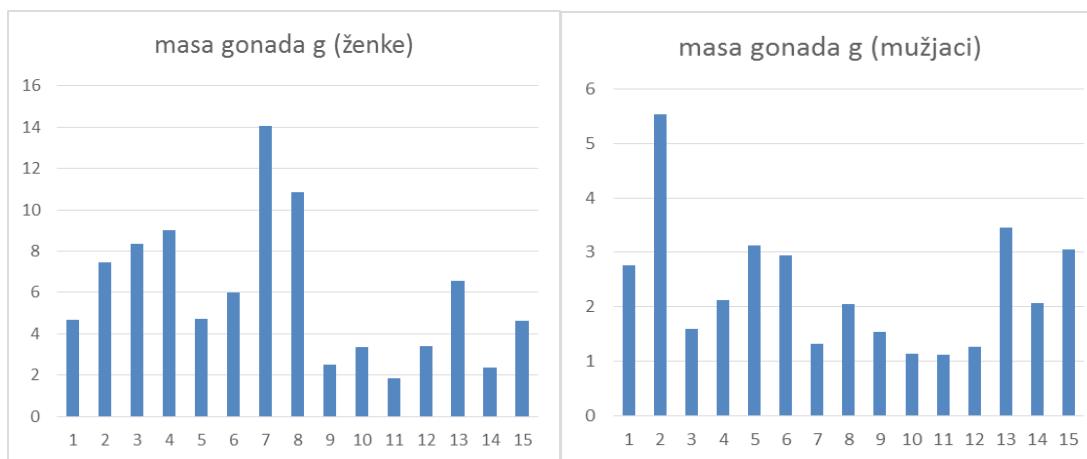


Slika 14. Gonade mužjaka (lijevo), gonade ženke (desno)

Prosječna ukupna masa gonada cjelokupnog uzorka iznosila je 124.74 g, gdje je prosječna ukupna masa gonada ženka iznosila 93.14 g, (raspon od 1.85 – 14.05 g), a ukupna masa gonada mužjaka iznosila je 31,6 g, (raspon od 1.12 – 5.54 g). Najmanje i najveće zabilježene vrijednosti mase gonada pojedinih trpova kretale su se u rasponu od najmanje, 1.12 g, do najveće 14.05 g (Slika 15. i 16.)



Slika 15. Prosječna ukupna iscijedena masa gonada uzorka tijekom Svibnja, 2013. Obični trp, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791)

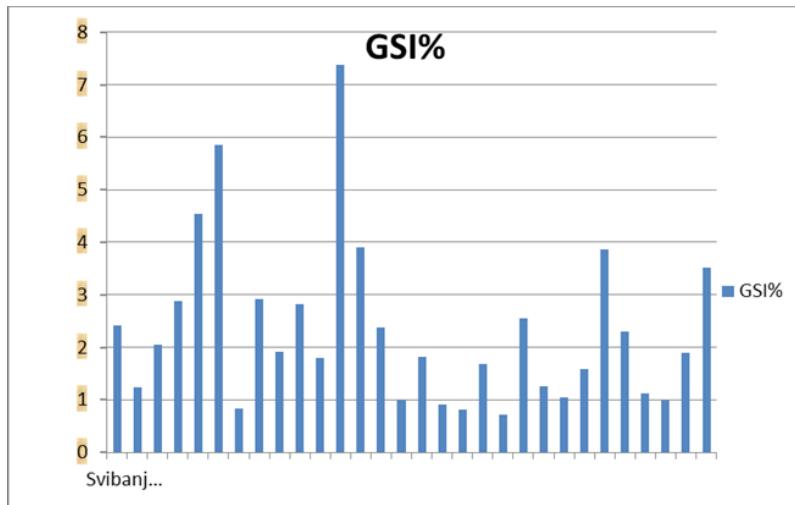


Slika 16. a) masa gonada ženka, b) masa gonada mužjaka, tijekom Svibnja, 2013., obični trp, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791)

3.2.2. GONADOSOMATSKI INDEKS

Pošto su jedinke običnog trpa uzete iz prirode u doba kad reproduktivno rastu, ali nisu i zrele za mrijest, zabilježene vrijednosti nisu maksimalne kao u doba mriještenja. Mrijest običnog morskog trpa u Jadranu, prema zabilježenim podacima, odvija se od početka kolovoza do rujna, i to pri uvjetima temperature mora puno većim od zabilježenih u ovom radu (Despalatović i sur., 2004).

Na temelju gore navedenog odnosa ukupne iscijedene mase i iscijedene mase gonada, GSI se kretao u rasponu od maksimalnog 7.39% do minimalnog 0.72% sa prosječnom vrijednošću od 2.34% (Slika 17.).



Slika 17. Gonodasomatski indeks običnog trpa, *Holothuri tubulosa* (Gmelin 1791) u svibnju 2013.

3.3. KRIOPREZERVACIJA SPERMATOZOIDA OBIČNOG TRPA, *Holothuria tubulosa* (Gmelin 1791)

Hlađenje se odvijalo na visini od 3 i 6 cm iznad tekućeg isparavajućeg dušika u različitim vremenskim intervalima (od 3 do 8 min). Uzorci su nakon završetka eksperimenta iznad tekućeg dušika uronjeni u vodenu kupelj, zagrijanu na temperaturi od 37°C tijekom 13 sekundi, gdje su spermatozoidi ponovno aktivirani.

Konzekventno su izvedene varijacije promjenjivih parametara pokusa gdje je primjenjivano hlađenje u 2 koraka, 3 minute na visini od 3 cm iznad isparavajućeg tekućeg dušika. Kao krioprotektanti korišteni su metanol Me(OH) i DMSO pri koncentracijama od 10 i 15%.

Rezultati u pokusu pri 3 minute na visini od 3 cm iznad isparavajućeg tekućeg dušika pokazuju da pri koncentracijama krioprotektanta metanola MeOH od 10 i 15%, nije

postignuta pokretljivost spermatozoida, dok kod krioprotektanta DMSO, koncentracija od 10% nije omogućila pokretljivost, a kod 15% zabilježene su samo vibracije (Slika 18).

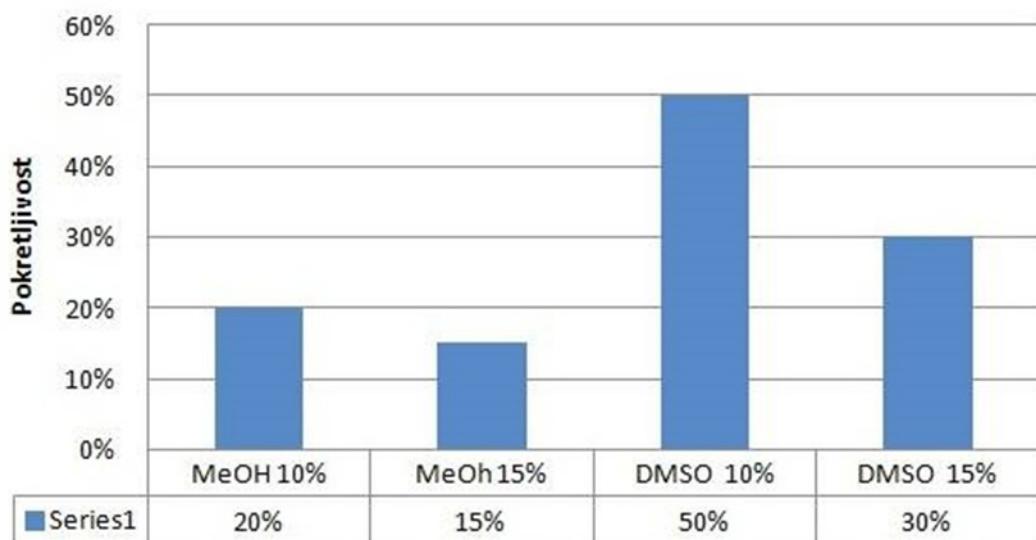


Slika 18. Pokretljivost spermatozoida (%) pri krioprotektantima MeOH i DMSO 3 minuta na 3 cm visine

U sljedeće dvije izvedbe pokusa primjenjivano je hlađenje u 2 koraka, 8 minuta na visini od 6 cm iznad isparavajućeg tekućeg dušika. Kao krioprotektanti korišteni su metanol Me(OH) i DMSO pri koncentracijama od 10 i 15%.

Rezultati u pokusu pri 8 minuta na visini od 6 cm iznad isparavajućeg tekućeg dušika pokazuju da je pri koncentracijama krioprotektanta metanola MeOH od 10%, pokretljivost spermatozoida iznosi 20%, dok je pri uvjetima MeOH od 15%, pokretljivost manja i iznosi 5%. Kod krioprotektanta DMSO, koncentracije od 10% omogućava pokretljivost spermatozoida i do 50%, dok je pri koncentraciji DMSO od 15%, zabilježena pokretljivost od 30% (Slika 19).

8 minuta na 6cm visine



Slika 19. Pokretljivost spermatozoida (%) pri krioprotektantima MeOH i DMSO 8 minuta na 6 cm visine

Rezultati pokazuju da pri uvjetima hlađenja u trajanju od 3 minuta na visini od 3 cm iznad isparavajućeg tekućeg dušika nije zabilježena pokretljivosti bez obzira na odabir i koncentraciju krioprotektanta. Pri uvjetima hlađenja u trajanju od 8 minuta na 6 cm udaljenosti od isparavajućeg tekućeg dušika rezultati ukazuju na postignutu pokretljivost spermatozoida i to najveća pokretljivost od 50% je zabilježena kod krioprotektanta DMSO u koncentraciji od 10%.

4. RASPRAVA

Suvremeni koncepti očuvanja vrste i reprodukcije stvorili su potrebu za očuvanjem spermatozoida kao strateškog resursa za veće mogućnosti u oplodnji. Trajno čuvanje spermatozoida kroz desetljeća danas je moguće jedino pomoću tekućeg dušika. I pored brojnih prednosti, tehnika krioprezervacije ima i svoje nedostatke, a glavni nedostatak je neizbjegno oštećenje spermatozoida koje nastaje pri odmrzavanju. Spermatozoidi različitih vrsta su različito osjetljivi na proces zamrzavanja i odmrzavanja, te se protokoli razlikuju, u zavisnosti od vrste. Kvaliteta odmrznutih spermatozoida zavisi o njihovoj kvaliteti prije zamrzavanja a i varira u okviru iste jedinke. Neke morfološke promjene kao što je gubitak mitohondrija, natečene stanične membrane i slomljeni repovi spermatozoida se događaju nakon odmrzavanja. Iako učinkovite tehnike umjetnog osjemenjivanja se danas uspješno primjenjuju u masovnoj proizvodnji trpova, malo je dostupnih informacija o građi kao i morfološkim promjenama spermatozoida koje nastaju uslijed naglog hlađenja i zagrijavanja. U ovom radu proučavana su obilježja pokretljivosti spermatozoida običnog trpa kroz razne koncentracije i opće uvjete krioreagenata. Osmolalnost je središnji faktor određivanja pokretljivosti sperme, međutim, druge moguće čimbenike, primjerice ionski sastav, pH i plazmu sjemena, treba uzeti u obzir pri inhibiciji i aktivaciji samih spermatozoida. Dostupni radovi su sporadični i nedostaje sistematizacija. Krioprotektori djeluju uglavnom, tako što snižavaju točku zamrzavanja intracelularne vode ili stabiliziraju membrane. Jedna od mogućnosti krioprezervacije je i istovremena desikacija.

Pošto do sada nema objavljenih podataka za običnog trpa *H. tubulosa*, rezultati u ovom radu se mogu uspoređivati sa dostupnim podatcima ekonomski najvažnije vrste trpa, *Apostichopus japonicus* (Selenka), a ujedno i jedine na kojoj su rađena slična istraživanja.) (Ming Yu Shao i sur., 2006).

U ovom radu provjeravana je sposobnost krioprezervacije spermatozoida običnog trpa, ali nije testirana sposobnost oplodnje nakon postupka krioprezervacije - otapanja spermatozoida. Postupak istraživanja krioprezervacije obuhvaćao je dva eksperimenta. U prvom eksperimentu korišteni su krioprotektanti; 10%, 15% Me(OH) i 10%, 15% DMSO u vremenskom intervalu 3 minute trajanja držanja na stiroporu pri visini od 3 cm iznad tekućeg dušika. U drugom eksperimentu korišten je 10%, 15% metanol Me(OH) i 10%, 15% DMSO, 8 minuta na stiroporu 6 cm iznad isparavajućeg tekućeg dušika. Kod istraživanja japanskog trpa, *A.*

japonicus (Selenka) (Ming Yu Shao i sur., 2006) obavljena su 4 eksperimenta sa krioprotектантима, DMSO 15% и 20% и глицерол 10% и 15% на стиroporu 2, 4, 6 и 8 cm iznad isparavajućeg dušika. Rezultati su pokazali da kod upotrebe krioprotектанта глицерола, покретливост сперматозоида на свим висинским удаљеностима од isparavajućeg tekućeg dušika je bila <5% ili su zabilježene samo vibracije сперматозоида. Kod upotrebe krioptotектанта DMSO најбољи rezultati su postignuti pri koncentraciji od 15% na visini od 6 cm iznad tekućeg dušika (60%), a na 20% i visini od 6 cm iznad tekućeg dušika pokretljivost je iznosila 50%.

Rezultati krioprezervације сперматозоида трпа, *H. tubulosa* и *A. japonicus* pokazuju veliku sličnost što ukazuje na то да је најбољи krioprotектант DMSO u usporedbi sa istraživanim rezultatima gdje su korišteni метанол Me(OH) i глицерол. U ovom radu, zabilježeno je најбоље preživljavanje сперматозоида при uvjetima koncentracije od 10% DMSO nakon otapanja (50% u odnosu na kontrolnu skupinu), a za vrstu, *A. japonicus* најбоље zabilježeno preživljavanje je u uvjetima koncentracije od 15% DMSO nakon otapanja (60%). Spermatozoidi različitih mužjaka pokazuju varijacije pokretljivosti/preživljavanja kao odgovor na smrzavanje i otapanje. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se provjerila mogućnost i sposobnost oplodnje otopljene sperme kao stvarnog pokazatelja uspješnosti krioprezervacije.

Ukupna masa gonada ženka u uzorku iznosila je 93.14 g, te se kretala u rasponu od 1.85 – 14.05 g, a ukupna masa gonada mužjaka iznosila je 31,6 g, te se kretala u rasponu od 1.12 – 5.54 g. Najmanje i najveće zabilježene vrijednosti mase gonada pojedinih trpova kretale su se u rasponu od najmanje, 1.12 g, do najveće 14.05 g. Despalatović je u svom radu opisala, aktivnost u gonadama tijekom svibnja, te je okarakterizirala ovaj stadij kao fazu rasta (growing stage), međutim nedostaju podaci o gonadosomatskom indeksu, masi gonada i ukupnoj masi organizama (Despalatovic i sur., 2004).

Reproducтивне značajke običnog trpa iz jugoistočnog Jadrana ukazuju na kretanje vrijednosti mase gonada i gonadosomatskog indeksa u okviru referentnih vrijednosti za ovu vrstu u području Mediterana (Bulteel i sur., 1992. ; Despalatovic i sur., 2004 ; Georgios i sur. 2010). Tijekom trajanja eksperimenta jedinke su bile u periodu reproducтивnog rasta, ali ne i zrele za mrijest, prema tome zabilježene vrijednosti nisu maksimalne kao u doba mriještenja. Odnos spolova u eksperimentalnom uzorku iznosio je 1:1 a što je i u skladu sa već objavljenim podacima (Despalatovic et al., 2004), dok je u ranijem istraživanju u srednjem Jadranu (Šimunovic & Grubelic, 1998) zabilježena povećana brojnost ženka. S obzirom da

objavljeni podaci u Jadranu ne obuhvaćaju čitav reproduktivni ciklus potrebna su daljnja istraživanja reproduktivnih osobina običnog trpa *Holothuria tubulosa* u ovom akvatoriju.

5. ZAKLJUČAK

Kriobiologija spermija na globalnoj razini je našla primjenu u poljoprivrednoj proizvodnji, znanstvenim istraživanjima na životinjama i u humanim kliničkim istraživanjima. Novo i dinamično područje koje otvara široki prostor za nova istraživanja, empirijska i temeljna, u svim područjima, uključujući i profinjenosti matematičkih modela je optimizacija dodavanja krioprotektanata u mnogih vrsta. Sa nedavnim progresima u genetskoj manipulaciji i stvaranju tisuća mutiranih sojeva, temeljito razumijevanje kriobiologije spermija je važno kako bi se smanjili troškovi skladištenja, pomoći u fleksibilnosti translokacije sojeva i osiguranja skupih istraživačkih ulaganja. U ovo doba genomike, dokumentiranje i manipuliranje genetskih osobina spermatozoida da prežive zamrzavanje može igrati značajnu ulogu u bliskoj budućnosti kriobioloških istraživanja.

Krioprezervacija spolnih produkata i ranih razvojnih stadija uvelike bi unaprijedila akvakulturni razvoj te bi omogućila oplodnju i mriješćenje u doba godine kad u prirodi nisu za to postojani uvjeti.

Preživljavanje na osnovu procjena pokretljivosti najbolje rezultate prikazuje sa 10% DMSO-om kao krioprotектантом, a iznosi 50%.

Krioprezervacija spermatozoida običnog morskog trpa je moguća, no potrebno je napraviti optimizaciju krioprezervacijskog protokola kako bi se u budućnosti dobili bolji rezultati preživljavanja, a pritom i oplodnje. Također su potrebna daljnja istraživanja kako bi se provjerila mogućnost i sposobnost oplodnje otopljene sperme kao stvarnog pokazatelja uspješnosti krioprezervacije.

6. LITERATURA:

- Asha, P.S., Muthiah, P. 2002. Spawning and larval rearing of the sea cucumber *Holothuria (Theelothuria) spinifera* Theel. SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 16, 11 – 15.
- Bates, M. C., W. R. Wayman, and T. R. Tiersch. 1996. Effect of osmotic pressure on the activation and storage of channel catfish sperm. Transactions of the American Fisheries Society 125:798–802.
- Battaglene, S.C., Seymour J.E. and Ramofafia C. 1999. Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra*. Aquaculture 178:293–322.
- Barnes, Robert D. 1982. Invertebrate Zoology. Philadelphia, PA: Holt-Saunders International. pp. 981–997. ISBN 0-03-056747-5.
- Bulteel, P., Jangoux, M. & Coulon, P. 1992. Biometry, bathymetric distribution, and reproductive cycle of the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in Mediterranean seagrass beds. P.S.Z.N. I: Marine Ecology, 13, 53-62
- Bell, J., Agudo N., Purcell S., Blazer P., Simutoga M., Phamb D. and Della Patron L. 2007. Grow-out of sandfish *Holothuria scabra* in ponds shows that co-culture with shrimp Litopenaeus stylirostris not viable. Aquaculture 273:509–519.
- Bratton, R., Foote R, Cruthers J. 1955. Preliminary Fertility Results with Frozen Bovine Spermatozoa. J Dairy Sci 1955;38: 40-6.
- Cameron, J. & Peter Fankboner 1986. Canadian Journal of Zoology, 1986, 64(1): 168-175,
- Conand, C. and M. Byrne. 1993. A review of recent developments in the world of sea cucumber fisheries. Marine Fisheries Review 55:1-13.
- Despalotović, M.; Grubelić, I.; Šimunović, A.; Antolić, B. & Žuljević, A. 2004. Reproductive biology of the holothurian *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in the Adriatic Sea. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 84: 409-414.
- Denniston, R.S, Michelet S & Godke R.A. 2000. Principles of Cryopreservation. In: Tiersch T.R & Mazik P.M (Eds.). Cryopreservation in aquatic species. Morgantown, The World Aquaculture Society. p. 59-74.
- Georgios, K., Chryssanthi antoniadou, Alexios P. Lolas, Nikos Neofitou, Dimitris Vafidis, Chariton Chintiroglou and Christos Neofitou 2010. Population dynamics and reproduction of *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea: Echinodermata) in the Aegean Sea. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom , 90(5), 895–901.
- Greiff, D., H. Melton and T.W. Rowe. 1975. On the sealing of gas-filled glass ampoules. Cryobiology 12: 1-14.
- Hair, C., Pickering T., Meo S., Vereivalu T., Hunter J. and Cavakiqali L. 2011. Sandfish culture in Fiji Islands. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 31:3–11.

- Harvey, B. 1983 Cryopreservation of *Sharoherodon mossambicus* spermatozoa, Aquaculture. 32: 313-320
- Herrero L, Martínez M, Garcia-Velasco J.A. 2011. Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology 2011; 23(4):245-50.
- Holt, W.V. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 3-22.
- Holt, W.V. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53: 47-58.
- Huang, C. Dong Q, Tiersch T.R. 2004a. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. Theriogenology. 2004a; 62: 971–989.
- Huang, C., Dong Q, Walter RB, Tiersch T.R. 2004b. Initial studies on sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. Theriogenology. 2004b; 62: 179–194.
- Huang, C., Dong Q, Walter RB, Tiersch T.R. 2004c. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. Cryobiology. 2004c; 48: 295–308.
- Ingram, Jocie 2006. "Knowing Nature... Cool as a Sea Cucumber". Retrieved 2007-10-03.
- James, D.B. 2004. Captive breeding of the sea cucumber, *Holothuria scabra*, from India. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper 463:385–395.
- Lahnsteiner, F., Berger B, Weismann T, Patzner R.A. 1997 Sperm motilityand seminal composition in the turbot, *Lota lota*. J Appl Ichthyol 1997 ;13:113-9.
- Lavitra, T., Rasolofonirina R., Jangoux M. and Eeckhaut I. 2009. Problems related to the farming of *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). SPC Bechede-mer Information Bulletin 29:20–29.
- Leibo, S.P. 1980. "Water Permeability and Its Activation Energy of Fertilized and Unfertilized Mouse Ova." Journal of Membrane Biology, 53:179-188. 16.
- Leibo, S.P. 2000. "Sources of variation in cryopreservation. In: Cryopreservation in Aquatic Species". World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana: 75–83.
- Leibo, S.P. 2002. Principles of cryobiology derived from animal models. Am. Soc. Reprod. Med. Syllabus. Course No. 10.
- Leibo, S.P. and L. Bradley 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: The Male Gamete. C. Gagnon, Ed. Cache River Press, Vienna, IL. pp. 502-515.
- Leopold, A.C. 1986. Membranes, Metabolism and Dry Organisms, Cornell Univ. Press, NY
- Matoničkin, I., Habdija, I., Primc-Habdija, B. 1999. Beskralješnjaci. Biologija viših avertebrata. Školska knjiga d.d., Zagreb, pp. 609;
- Mazur, P. 1963. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intercellular Freezing of Biological Systems. Science. Cryobiology: Vol, 168, 939-949

- Mazur, P. 1970. Cryobiology - freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949
- Mazur, P., W.F. Rall, and S.P. Leibo. 1984. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys.* 6:197-213.
- Mazur P., 2004. In: Principles of cryobiology. Fuller BJ, Lane N, Benson EE, editors. Boca Raton: Academic Press; 2004. pp. 3–65.
- Mauger, P.E., Le Bail, P.Y., Labb  , C. 2006. Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. *Comp. Biochem. Physiol.*, B144: 29-37
- Meryman, 1971. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*. 1971 Oct;8(5):489-500.
- Ming Yu Shao, Zhi Feng Zhang, LiYu, JingJieHu, Kyoung Ho Kang 2006. Aquaculture Research, 2006, 37, 1450-1457
- Morgan, A.D. 2001. The effect of food availability on early growth, development and survival of the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: *Holothuroidea*). SPC Beche-de-mer Information Bulletin 14 : 6–12.
- Morisawa, M. & Suzuki, K. 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, N.Y. 210, 1145-1147.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. & Yasuda, K. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. exp. Biol.* 107, 95-103.
- Ocana, A. & L. Sanchez Tocino 2005. "Spawning of *Holothuria tubulosa* (*Holothurioidea*, *Echinodermata*) in the Alboran Sea (Mediterranean Sea)". *Zool. baetica* 16: 147–150.
- Paniagua-Chavez, C.G., Buchanan J.T, Tiersch T.R. 1998. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of Eastern oyster sperm. *J Shellfish Res.* 1998; 17: 231–237.
- Paniagua-Chavez, C.G., J. T. Buchanan & T. R. Tiersch. 1998a. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. *J. Shellfish Res.* 17:231-237.
- Paniagua-Chavez, C.G., J. T. Buchanan, J. E. Supan & T. R. Tiersch. 1998b. Settlement and growth of eastern oyster produced from cryopreserved larvae. *Cryo Letters* 19: 283-292.
- Paniagua-Chavez, C.G. & T. R. Tiersch. 2001. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trophophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology* 43: 211-223.
- Paulay, Gustav 2010. "*Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791". World Register of Marine Species. Retrieved 2012-01-15.
- P  rez-Ruzafa, A. 1984. Estudio sistem  tico, ecol  gico y biogeogr  fico de la Clase Holothuroidea en las Islas Canarias. PhD dissertation, Universidad de La Laguna, Tenerife.

Pitt, R. and Duy N.D.Q. 2004. Breeding and rearing of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Viet Nam. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper 463:333–346.

Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 166.

Rall, W.F. 2001. Cryopreservation of mammalian embryos, gametes, and ovarian tissues: current issues and progress. In: Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals. D.P. Wolf and M. Zelinski-Wooten, Eds. Humana Press, Totowa, NJ. Ch. 10. pp. 173-187.

Salarzadeh, A., Afkhami M., Bastami D.K., Ehsanpour M., Khazaali A., and Mokhlesi A. 2012. Proximate composition of two sea cucumber species *Holothuria pavra* and *Holothuria arenicola* in Persian Gulf. Annals of Biological Research 3, 1305–1311.

Simione, F.P. and J.Z. Karpinsky 1996. Points to Consider Before Validating a Liquid Nitrogen Freezer, In: Validation Practices for Biotechnology Products, ASTM STP 1260, J.K. Shillenn, Ed., American Society for Testing and Materials, 1996, pgs. 24-30.

Scott, & Baynes 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J. Fish Biology. Volume 17, Issue 6, pages 707–739, December 1980

Taylor, R.; Adams, G.D.J., Boardman, C.F. and Wallis, R.G. 1974. "Cryoprotection permeant vs nonpermeant additives". *Cryobiology* 11: 430–438.

Tiersch, T.R. 2001. "Cryopreservation in aquarium fishes". *Marine Biotechnology* 3: S212–S223.

Tiersch, T.R, Yang H, Jenkins JA, Dong Q. 2007. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. Society of Reproduction and Fertility supplement 2007;65: 493-508.

Yang, H., Hazelwood L, Walter R.B, Tiersch T.R. 2006. Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Cryobiology*. 2006; 52: 209–218.