

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Anita Bubalo

Krioprezervacija ličinka i sperme
europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* L., 1758.

DIPLOMSKI RAD

Mentori:
prof. dr. sc. Branko Glamuzina
dr. sc. Ákos Horváth

Dubrovnik, listopad 2009.

Ovaj diplomički rad izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Branka Glamuzine i dr. sc. Ákosa Horvátha, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

SAŽETAK

Krioprezervacija bi mogla omogućiti dostupnost kvalitetnih ličinka za mrijestilišta i daljnji uzgoj te osigurati genetičku kvalitetu i sigurnost u slučaju mogućih opasnosti (bolesti, okolišne katastrofe...). Ovaj rad opisuje krioprezervaciju sperme i ličinka europske plosnate kamenice, *O.edulis*. Izvedeno je nekoliko pokusa na različitim embrionalnim razvojnim stadijima. Koncentracija ličinka je bila 800/ml. Korištene su kriocjevčice volumena 0.5 ml te krioprotektanti DMSO i metanol. Rezultati pokazuju mogućnost krioprezervacije i sperme i ličinka. Za pravi uspjeh krioprezervacije sperme potrebno je testirati mogućnost oplodnje što otežava hermafroditizam i unutarnja oplodnja. Stvarni uspjeh krioprezervacije ličinka europske plosnate kamenice bi trebalo valorizirati kroz rezultate preživljavanja i uzgoja krioprezerviranih ličinka do tržišne veličine.

Ključne riječi: krioprezervacija, *Ostrea edulis*, ličinke, sperma, krioprotektanti

ABSTRACT

Cryopreservation can allow the availability of good quality oyster larvae for hatcheries and farms and guarantee the quality and security of genetic material in case of natural or man-made hazards (diseases, natural disasters). This study describe cryopreservation of sperm and larvae of the European flat oyster (*Ostrea edulis*). Several trials were conducted on different stages of embryonic development. The concentration of larvae in these trials was 800 larvae/ml. Larvae were frozen in 0.5-ml straws in the presence of cryoprotectants methanol or dimethyl-sulfoxide (DMSO). Results show that the cryopreservation of sperm and larvae is possible. Fertilization tests with cryopreserved sperm would be necessary, however, this is problematic due to the hermaphroditism and internal fertilization in *O. edulis*. Success of the cryopreservation of oyster larvae would further be strengthened by the culture and growth of frozen and thawed larvae.

Key words: cryopreservation, *Ostrea edulis*, larvae, sperm, cryoprotectants

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PRINCIPI KRIOPREZERVACIJE	1
1.2. HLAĐENJE STANICA, ULOGA MEMBRANA I OSMOTSKIH UVJETA U HLAĐENJU	2
1.3. METODE KRIOPREZERVACIJE	4
1.4. KRIOPREZERVACIJA SPERME I JAJA ŠKOLJKAŠA	7
1.5. MRIJEST I BIOLOGIJA LIČINKA EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, <i>Ostrea edulis L.</i>	10
1.5.1. ULOGA SPERMATOZEGMATA U MRIJESTU EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, <i>Ostrea edulis L.</i>	12
2. MATERIJAL I METODE	14
2.1. POSTUPAK KRIOPREZERVACIJE SPERME EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, <i>Ostrea edulis L.</i>	14
2.2. POSTUPAK KRIOPREZERVACIJE LIČINKA EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, <i>Ostrea edulis L.</i>	16
3. REZULTATI.....	20
3.1. KRIOPREZERVACIJA SPERME EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, <i>Ostrea edulis L.</i>	20
3.2. KRIOPREZERVACIJA LIČINKA EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, <i>Ostrea edulis L.</i>	23
4. RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČAK	29
6. LITERATURA.....	31

1. UVOD

Kriobiologija je biološka grana znanosti koja istražuje preživljavanje i postojanost stanica, tkiva, organa i organizama na niskim temperaturama. Krioprezervacija je tehnologija održavanja stanica, tkiva, organa i organizama živima i njihovog konzerviranja duže vrijeme na niskim temperaturama.

1.1. PRINCIPI KRIOPREZERVACIJE

Za krioprezervaciju se koriste različita sredstva (npr. suhi led), ali tekući dušik je najkorišteniji za pohranu konzerviranih materijala na temperaturu od -196 °C na kojoj su kemijske i fizičke reakcije vrlo ograničene. Smatra se da ovako krioprezervirani uzorci mogu biti pohranjeni neograničeno vrijeme. Principi krioprezervacije su identični principima hlađenja vode i vodenih otopina. Temperatura smrzavanja destilirane vode je 0 °C, ali se može hladiti do temperature od -20 °C, dodavanjem šećera ili soli, pri čemu se snižava točka smrzavanja otopine. Smrzavanje počinje nakon značajnog perioda hlađenja. Tijekom smrzavanja (formiranja ledene kristalne strukture) kristalizacija počinje oko takozvane ledene jezgre (Denniston i sur., 2000). Ta ledena nukleacija se pojavljuje u dva oblika:

- ◎ 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 također može biti inducirana dodirivanjem posude koja sadrži tekućinu tvrdim predmetom. Inducirana ledena nukleacija se naziva "seeding" i to je proces koji se redovno koristi u tehnologiji krioprezervacije. Formiranje ledene kristalne strukture (faza prijelaza iz tekućeg u kruti oblik) je praćeno otpuštanjem energije koja povećava temperaturu otopine i točku smrzavanja (ova otpuštena energija se naziva latentna toplina). Kada ledeni kristali počnu rasti oko ledene jezgre primarno su vodene molekule ugrađene u kristalnu ledenu rešetku, a ne molekule otapala (smrzavajuća otopina postupno postaje sve koncentriranija što se nastavlja do točke kad je sva voda

smrznuta i otopina doseže maksimum koncentracije). Ova točka se naziva "eutentična točka" nakon koje se cijela otopina smrzne (može biti smanjena povećanjem volumena otopljenih tvari u otopini) (Denniston i sur., 2000).

Postoji i drugi način dovođenja vode u kruto stanje (različit od formiranja kristalne ledene strukture): kada se voda ili vodena otopina hlađe veoma brzo vodene molekule nemaju dovoljno vremena za formiranje ledene jezgre i svrstavanje u kristalnu rešetku → tada se otopina transformira u amorfno kruto stanje nalik staklu. Proces se naziva VITRIFIKACIJA i uočen je kao trenutak u postupku hlađenja (Fahy i sur., 1984). Vitrifikacija je moguća jer molekularna gibanja u tekućem stanju zahtijevaju toplinsku energiju koja nije prisutna na dovoljno niskim temperaturama (tj. ne uključuje značajne alternacije molekularnih veza nađenih u tekućem obliku). Vitrificirano stanje nije vrlo stabilno i vitrificirane otopine se moraju držati na vrlo niskim temperaturama ili će doći do devitrifikacije. Devitrifikacija je pojavljivanje ledene jezgre i formacija kristalne strukture u vitrificiranoj otopini. Prema nekim istraživanjima tekućine smrznute ispod -139 °C su sastavljene od mješavine kristalne ledene strukture i vitrificiranog stanja. Kako bi postigli vitrificirano stanje sa sporijim stopama hlađenja potrebne su vrlo velike koncentracije kemikalija poznatih kao KRIOPROTEKTANTI. Prijelaz iz krute natrag u tekuće stanje se naziva otapanje. Rast kristala leda je jako brz na višim temperaturama (naravno još uvijek ispod točke smrzavanja) i intenzivna rekristalizacija vitrificirane ili semi-vitrificirane tvari se može pojaviti tijekom otapanja. Ovo je tipično kod sporih stopa otapanja.

1.2. HLAĐENJE STANICA, ULOGA MEMBRANA I OSMOTSKIH UVJETA U HLAĐENJU

U procesu krioprezervacije živih stanica i tkiva cijela ranije opisana procedura je pod utjecajem stanične membrane koja djeluje kao polupropusna barijera i regulira osmotski proces (uvijek manje koncentrirana otopina pokušava razrijediti onu gušću). U slučaju živih stanica i tkiva stanična membrana radi kao polupropusna barijera i tok vode ili drugog otapala je usmjeren između citoplazme i vanstaničnog prostora. U takvim procesima se može pojaviti nekoliko scenarija:

1) SPORO HLAĐENJE → dokazano je da unutar stanica nema učinkovitih nukleacijskih tvari pa će ledena nukleacija uvijek započeti u vanstaničnom prostoru (ovo je heterogena nukleacija jer u slučaju živih stanica i tkiva neke male čestice će uvijek biti prisutne u otopini) (Mazur, 1970). Voda se počinje smrzavati u izvanstaničnom prostoru i kako se samo vodene molekule ugrađuju u kristalnu rešetku vanstanična otopina će postati više koncentrirana. Stanice reagiraju na ovaj rast osmotskog tlaka otpuštanjem vode kroz staničnu membranu. Kada se uzorci dosta sporo hlađe stanice moraju otpuštati previše vode i to može voditi smrtnosti, nepovratni gubitak vode u stanicama koji se ne može nadoknaditi tijekom otapanja. Također, sa rastom koncentracije vanstaničnog prostora stanice su izložene takozvanim učincima otopljenih tvari (toksični učinci unutar i van stanica).

2) BRZO HLAĐENJE → stopa hlađenja je prebrza da bi stanice otpustile vodu koja se smrzava unutar stanica. Unutar stanica led oštećuje stanične strukture (kida membrane, Golgijev aparat i endoplazmatski retikulum) uzrokujući mehanička oštećenja (Mazur, 1963; Leibo, 1980).

3) URAVNOTEŽENO HLAĐENJE → optimalna stopa hlađenja koja je dovoljno spora da dopusti potrebnom volumenu vode da napusti stanice kako bi se izbjeglo unutarstanično formiranje leda i destrukcija stanične membrane, a sa druge strane dovoljno brza za stanice da zadrže dovoljno vode kako bi reducirale učinke otapanja i bila sposobna preživjeti reapsorbirajući vodu slijedom otapanja u procesu krioprezervacije. U ovom slučaju smatra se da se preostala voda u stanicama smrzava u jako male ledene kristale koji ne mogu uzrokovati značajna oštećenja ili se vitrificira uopće ne uzrokujući oštećenja. Također neka istraživanja upućuju na mješavinu kristala leda i vitrificiranu vodu u stanicama.

4) ULTRABRZO HLAĐENJE → ovaj proces vodi vitrifikaciji stanica i okolnog medija. Stopa hlađenja je toliko brza da voda nema vremena za smrzavanje u ledene kristale nego se ohladi u nekristaliziranu (amorfnu) masu nalik staklu. Tijekom vitrifikacije nema izmjene vode kroz staničnu membranu. Ovo se u pravilu postiže ubacivanjem posude s biološkim uzorkom direktno u tekući dušik. Vitrifikacija bi bila idealan postupak za krioprezervaciju živih stanica i tkiva.. Postignut je napredak npr. kod vitrifikacije goveđih embrija, no tehnike vitrifikacije se suočavaju sa nekoliko

problema koji ih čine manje ili više neizvedivim. Kao što je ranije spomenuto, postoji nekoliko problema vezanih za upotrebu vitrifikacije živih stanica i tkiva. Dva glavna problema su velik volumen krioprotектаната koji se moraju koristiti da bi se postiglo vitrificirano stanje i devitrifikacija. Učinkovit minimalan vitrificirajući volumen krioprotектаната ovisi o njegovu tipu ali u većini slučajeva je potrebno 30-40% (volumen/volumen) kemikalije što može biti vrlo toksično za stanice. Devitrifikacija (formiranje kristala leda) se može pojaviti ili tijekom kratkotrajnog procesa zagrijavanja ili otapanjem uzorka te se jako brza stopa otapanja mora primijeniti kako bi se izbjegla rekristalizacija vitrificiranog uzorka.

Kod smrzavanja stanica i tkiva, mora se uspostaviti optimalna stopa hlađenja a ona koleba ovisno o nekoliko čimbenika koji uključuju: tip stanice i tkiva, prirodu korištenog krioprotектanta, tip tvari korištene za smrzavanje (npr.suhi led ili tekući dušik) itd. U pravilu, formiranje kristala može biti suzbijeno snižavanjem točke smrzavanja otopine ili korištenjem krioprotектantskih tvari koje imaju jaku tendenciju ka formiranju veza s molekulama vode čineći ih tako teško ugradivim u ledenu kristalnu rešetku. U slučaju sperme, stanice ne sadržavaju velike volumene vode što vodi upotrebi stopa hlađenja u rasponu od 30-70 °C/min.

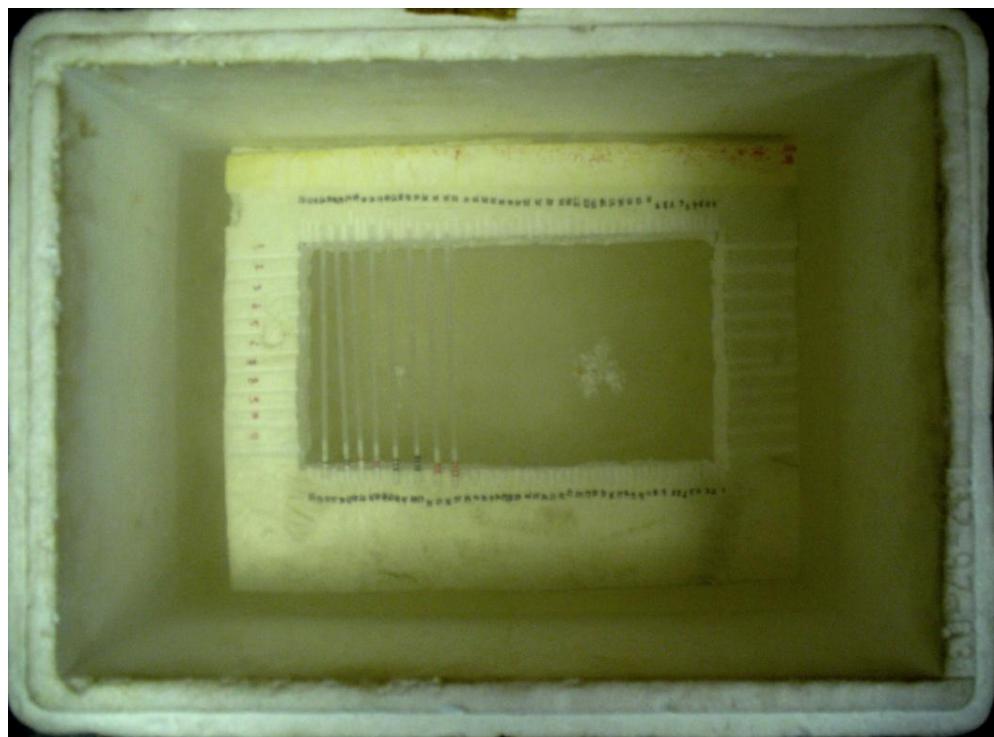
1.3. METODE KRIOPREZERVACIJE

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 različitim kriterijima, kao što su tvar za hlađenje, posude za hlađenje ili oprema za hlađenje.

Prema tvarima korištenim za hlađenje imamo:

- SUHI LED → kruti CO₂. Ugljični dioksid nema tekuću fazu, prelazi direktno iz krute faze 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 stvrdne se na -210 °C. Kontakt s tekućim dušikom može izazvati ozljede

nalik opekotinama na koži pa se njime mora oprezno rukovati. Iako tekući dušik jako brzo isparava može se čuvati na temperaturi vrenja u vakumskom spremniku duple stijenke. 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 1).



Slika 1. Hlađenje uzoraka sperme *Ostrea edulis* u cjevčicama iznad površine tekućeg isparavajućeg dušika prije smrzavanja.

Prema tipu posuda za hlađenje koriste se :

- PELET METODA → u ovom slučaju ne koriste se specifične posude za krioprezervaciju. Utori se rade na površini suhog leda i razrijedene stanice s ekstenderom i krioprotektantom se iz pipete ukapavaju u utore. Kapi se trenutno smrzavaju i mogu se sakupiti s površine suhog leda u male plastične kontejnere koji se zatim skladište u tekućem dušiku. Glavna (i vjerovatno jedina) prednost ove metode je jednostavnost. Sa druge strane, nisu dostupne informacije o stopama hlađenja kada su

peleti smrznuti i posljedično se stope hlađenja ne mogu regulirati. Oblik peleta je ograničen njihovom veličinom i volumenom i ne mogu prijeći određeni volumen kako bi postigli smrzavanje u unutarnjim i vanjskim slojevima. Na kraju, peleti se moraju otapati u posebnoj otopini koja sprječava aktiviranje stanica (Scott i Baynes, 1980; Harvey, 1983).

- CJEVČICE → sperma se najčešće hlađi u plastičnim cjevcicama. Cjevčice su dostupne u različitim veličinama od 0.25 do 5 ml (Lahnsteiner i sur., 1997), a najčešće se koriste one od 0.25 i 0.5 ml. Njihova je konstrukcija slična: na jednom kraju imaju dva pamučna čepa između kojih je polimerski puder koji se u kontaktu s vodom ili vodenom otopinom pretvara u gel. Veće cjevčice se prodaju bez pamučnog čepa, proizvođači nude metalne ili plastične kugle za zatvaranje kraja. Ovisno o tehnikama otvoreni kraj cjevčice (s pamučnim čepom) se može hermetički zatvoriti toplinom ili posebnim puderkom. Prednost smrzavanja u cjevcicama je što su smrznute stanice odvojene od tvari za hlađenje i otapanje stijenkom cjevčica, a adekvatno su izložene hlađenju zbog dužine i malog promjera. Cjevčice se mogu hladiti postavljanjem između dva bloka suhog leda ili stavljanjem u različite držače na isparavajući dušik. Komercijalno se koriste za smrzavanje sperme većine domaćih životinja (Slika 1).
- KRIOTUBE/AMPULE → kriotube su posudice koje se prave od plastike slične kao cjevčice i prodaju se u volumenima od 1 do 4.5 ml. Tube imaju zatvoreno dno i vrh s navojima pa su osigurane vijčanim čepom. Kriotube se obično koriste za krioprezervaciju embrija, tkiva i ljudske sperme.
- VREĆICE ZA KRV → plastične ili vrećice presvučene teflonom različitih volumena, dizajnirane za krioprezervaciju krvi.

Kada se krioprezervacija provodi u isparavajućem tekućem dušiku nekoliko se metoda koristi za poboljšanje kontrole procesa smrzavanja. Najjednostavniji način je smjestiti uzorke (u cjevcicama ili kriotubama) na određeni nivo iznad površine tekućeg dušika i nakon eksperimentalnog perioda vremena uroniti ih u dušik. Ovo se najčešće provodi u odvojenim stiropornim kutijama i uzorci su zaustavljeni iznad tekućeg dušika na okviru od stiropora (Slika 1). Proces se može kontrolirati upotrebom kompjuterski kontroliranih zamrzivača. Jednostavniji tipovi zamrzivača mjere samo temperaturu iznad razine dušika i reguliraju poziciju platforme na kojoj su smješteni uzorci kako bi se

osiguralo odgovarajuće smrzavanje. Sofisticirani zamrzivači se sastoje od 3 dijela: hermetički tank tekućeg dušika, komora za hlađenje i kompjuter koji regulira temperaturu unutar komore za hlađenje (prema prije zadanim naredbama) dopuštajući tok isparavajućeg tekućeg dušika iz hermetičkog tanka u komoru preko ventila.

1.4. KRIOPREZERVACIJA SPERME I JAJA ŠKOLJKAŠA

Krioprezervacija gameta i embrija školjkaša je postignuta kod nekoliko vrsta, premda je većina istraživanja koncentrirana na vrste od ekonomske važnosti. Većina metoda je razvijena na spermii pacifičke kamenice, *Crassostrea gigas* (He i sur., 2004; Dong i sur., 2005a; Dong i sur 2005b; Dong i sur, 2007; Ieropoli i sur, 2004; Adams i sur., 2004), i diploidima i triploididima i istočne kamenice, *Crassostrea virginica* (Paniagua-Chavez i Tiersch, 2001).

Spermatozoe kamenica ostaju pokretne satima, a nekad i daniма nakon aktivacije morskom vodom. Krioprezervacija sperme kamenica se u pravilu obavlja uz prisutstvo krioprotectora dimetil-sulfoksida (DMSO), etilen-glikola (EG) ili propilen-glikola (PG), međutim nedavna istraživanja krioprezervacije sperme pacifičke kamenice na komercijalnoj razini pokazuju da metanol sam ili u kombinaciji sa PG rezultira većim stopama oplodnje od drugih. Istraživanja izvještavaju korištenje 0.5 ml ili 5 ml cjevčica ili 2 ml krioposudica. Sperma je razrijeđena u Hankovoj uravnoteženoj solnoj otopini (HBSS) ili jednostavno u morskoj vodi jer ona održava pokretljivost nekoliko sati. Stope hlađenja testirane na spermii kamenica također pokazuju veliku varijabilnost. Iako se ovi detalji uvelike podudaraju s iskustvima krioprezervacije sperme riba postoji nekoliko razlika između krioprezervacije ovih dviju taksonomskih skupina :

- Sperma školjkaša pokazuje uvelike smanjenu pokretljivost nakon otapanja. Ovo je primjećeno kod puža kao što je mala puzlatka (*Haliotis diversicolor supertexta*) (Gwo i sur., 2002) i kućice (*Meretrix lusoria*) (Chao i sur., 1997). To znači da se 20% pokretljivosti sperme nakon otapanja smatra visokim i zadovoljavajućim kod gotovo svih vrsta školjkaša.
- Kao rezultat smanjenja pokretljivosti postotci oplodnje dobiveni s krioprezerviranom spermom su niži nego sa svježom spermom. Iako su stope oplodnje podjednake kao i sa svježom spermom to su bili većinom izolirani slučajevi i ne mogu se smatrati općim

fenomenom. Stope oplodnje od 40-50% (naspram 90% sa svježom spermom) se smatraju izvrsnima.

- Tijekom krioprezrvacije sperme školjkaša nekoliko važnih detalja ima utjecaj na uspjeh, kao što su osmolalnost ekstendera ili koncentracija spermatozoa. Osmolalnost ekstendera bi trebala biti oko 1000 mOsmol/kg jer manje vrijednosti smanjuju uspjeh oplodnje. Koncentracija sperme bi trebala biti oko 10^9 spermatozoa/ml jer manja koncentracija rezultira neželjenim sljepljivanjem spermatozoa što također smanjuje uspjeh oplodnje (Dong i sur., 2007).

Kod školjkaša, naročito kod kamenica moguća je krioprezervacija jaja, embrija i ličinka. Krioprezervaciju jaja pacifičke kamenice opisuju Smith i sur., 2001., a preživljavanje i stope oplodnje su bile niske (do 20%). Opisana metodologija krioprezrvacije jaja je vrlo slična kao kod smrzavanja sperme. Unatoč niskim stopama oplodnje ovi rezultati su ohrabrujući naročito ako se uzme u obzir činjenica da je broj jaja koji se kod školjkaša može sakupiti od jedne jedinke u rasponu od nekoliko stotina tisuća do nekoliko desetaka milijuna.

Nedavni napredak u krioprezervaciji embrija školjkaša je unaprijedio tehniku za uspostavljanje benke gena i programa manipulacijama mrijestom (Lin i sur., 1999). Početni pokusi (Chao i sur., 1994, Gwo, 1995 i Lin i sur., 1999) na embrijima pacifičke kamenice su analizirali toksičnost krioprotектаната, utjecaj hlađenja i razvoj protokola smrzavanja s ciljem razvoja dugoročnih tehnika očuvanja za primjenu u mrijestilištima, a kasnije su uslijedila istraživanja Paniagua-Chavez i Tiersch (2001) u SAD-u na ličinkama istočne kamenice. Chao i sur. (1994) upućuju da je početna kvaliteta embrija važan čimbenik za uspjeh krioprezervacije. Korištenje embrija dobre kvalitete bi trebalo unaprijediti perspektive dobivanja korisnih informacija i rezultirati većim stopama preživljavanja bez obzira na postupak smrzavanja (vitrifikacija ili postupno smrzavanje). Utvrđeno je da se najbolji rezultati mogu postići kada su trohofore (ili embriji) objekt krioprezervacije. Krioprezervacija ličinka se obično provodi u kompjuterski kontroliranim programirajućim zamrzivačima s vrlo niskim stopama hlađenja ($2.5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$). Cjevčice se dostižući temperaturu od $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ uranjaju direktno u tekući dušik. Čini se da koncentracija ličinka u cjevčicama od 5 ml ima ključnu važnost u ličinačkom preživljavanju krioprezervacije – najveći postotak održivih ličinka je nađen kada je samo

125 ličinka smrznuto u jednoj cjevčici, ali najveći broj preživjelih je nađen kada je 50 000 trohofora krioprezervirano – iako je njihov postotak bio znatno manji nego u manje koncentriranim uzorcima (8% : 90%). Najbolji rezultati su dobiveni kad je razvijen i optimiziran postupak smrzavanja u dva koraka. U tom postupku, uzorci su hlađeni do temperature blizu temperature smrzavanja (oko -10 °C), zatim su podlegli „seeding“ procesu, obično kratki dodir pincetom kako bi se potakla ledena nukleacija unutar uzorka, i zatim su uzorci smrznuti na -196 °C. Ispitivani su utjecaji stope hlađenja, izbora krioprotektanata i „seeding“ temperature na preživljavanje kasnih stadija embrija kamenica. Visoke stope preživljavanja (pokretni embriji) od 78% i 83% su postignute korištenjem 2M DMSO ili glicerola kao krioprotektanta.

Ovo područje istraživanja raste zbog potencijalnih primjena u industriji školjkaša kao što su poboljšanje managementa i proizvodnje nasada, rast dostupnosti i distribucije selektiranih linija (npr. linija otpornih na bolesti) i razvoj i održavanje genetski modificiranih stokova (Paniagua-Chavez i Tiersch, 2001). Štoviše, to bi omogućilo dostupnost ličinka visoke kvalitete tokom cijele godine. Uspješna krioprezervacija ličinka istočne kamenice, *Crassostrea virginica*, je prvi put postignuta radom Paniagua-Chavez i sur. (1998 i 2001) s rezultatom od ~100% pokretnih trohofora odmah nakon otapanja koristeći 10 i 15% propilen glikol kao krioprotektant i smrzavajući mali broj embrija (koncentracija od 125 ličinka po makrotubi). Preživljavanje otopljenih ličinka je opadalo s rastom broja ličinka po makrotubi, i manje od 10% preživljavanja je postignuto kada je 50 000 ličinka napunjeno u istu makrotubu. Za svrhe proizvodnje trebalo bi postići veće stope preživljavanja i analizirati preživljavanje u dalnjim ličinačkim razvojnim stadijima.

Istraživane su i druge vrste kamenica, kao što su mangrovska kamenica, *Crassostrea rhizophorae* i biserna kamenica, *Pinctada fucata martensii*. Nascimento i sur.,(2005) su testirali toksične učinke krioprotektanata na trohofore mangrovske kamenice i postigli dobre rezultate s metanolom i DMSO, dok Choi i Chang (2003) izvještavaju stope preživljavanja biserne kamenice nakon smrzavanja/otapanja od 43.1% za trohofore i 91% za D-ličinke koristeći šećere kao krioprotektante (0.2M glukoze ili saharoze) i stopu smrzavanja od 1 °C/min.

Sve ove studije dokazuju mogućnost krioprezervacije embrija i ličinka kod većine analiziranih vrsta. Međutim, preživljavanje nakon otapanja ne osigurava dobre razvojne

mogućnosti embrija ili ličinka, te je potrebna daljnja optimizacija protokola smrzavanja i standardizacija procedura.

1.5. MRIJEŠĆENJE I BIOLOGIJA LIČINKA EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE,

Ostrea edulis L.

Europska plosnata kamenica (Slika 2) je hermafrodit s ritmičnom izmjenom spola. Promjena spola može nastupiti više puta unutar godišnje sezone mrijesta, ali bez mogućnosti samooplodnje (Coe, 1943). Općenito kamenicu možemo definirati kao protoandričnog hermafrodita, spolno sazrijeva najprije kao mužjak. Stvaranje muških gameta nastupa već početkom sljedeće godine, nakon prelaska na sesilni način života. U tom periodu spermatozoidi nisu u potpunosti izgrađeni i sposobni za oplodnju. Nakon toga slijedi inverzija spola i pojavljuje se razvojna faza ženke, vremenski u drugoj godini. Promjena spola iz mužjaka u ženku teče mnogo sporije nego obratno, jer stvaranje jajnih stanica više iscrpljuje organizam kamenice nego proizvodnja spermija. Inverzija spola se nastavlja dalje tijekom život, a može nastupiti u vrlo kratkom vremenu od nekoliko dana (Korringa, 1940). Ritam izmjene spola ovisi o više čimbenika, prema Marteiliu (1976), najvažniji su temperatura i količina raspoloživih hranjivih tvari u moru.

Ispuštanje muških spolnih stanica, spermatozoida, odvija se najprije u vanjski dio plaštane šupljine, a ubrzo zatim izvan organizma, djelovanjem kloake, bez kontrakcije mišića aduktora. Jajne stanice također se izbacuju u vanjski dio plaštane šupljine, koja se onda zatvara i zadržava ih između unutarnjih listića plaštanog ruba.

Jaja kamenice su oko $150 \mu\text{m}$ promjera u trenutku oslobađanja iz gonadnog tkiva (Korringa, 1940; Yonge, 1960). Oplodnja se obavlja u plaštanoj šupljini ženke nakon unosa spermija ulaznom strujom vode. Spolno zrela ženka proizvede oko 1 do 3,5 milijun jaja, ovisno o njezinoj veličini.

Budući da su rani embrionalni razvojni stadiji kamenice zaštićeni u organizmu majke praćenje njihova razvoja je otežano, iako se smatra da su embriogeneza, organogeneza i procesi mineralizacije ljuštura u svih školjkaša slični (Moor, 1983). Prema Korringa (1947), inkubacija oplođenih jaja unutar ženke traje 8 do 10 dana, ovisno o temperaturi vode ili 8 do 14 dana pri temeperaturi od 18 do 20 °C (Martin i sur., 1995). U završnoj fazi razvoja izbacuju se iz plaštane šupljine i nastavljaju živjeti kao

plankton. Otpuštene su ličinke veličine između 160 i 200 µm (Martin i sur., 1995). Kamenicu, kao i druge školjkaše, karakterizira kombinacija pelagičnog (planktonske ličinke) i bentoskog (odrasle jedinke) načina života. Pelagični način života školjkaša obuhvaća ličinačku fazu, prihvati zrelih ličinka i njihovu metamorfozu, čime ujedno završava ličinački razvoj u planktonu te počinje pridneni način života jedinke u bentoskim zajednicama.

U embrionalnoj fazi nastupa najprije brazdanje, zatim gastrulacija i embriogeneza do razvoja trohofore, malene ličinke obavijene izrazito tankim trepetljikama uz pomoć kojih se kreće. Trohofora zatim dobiva izduženi vrh s čupercima bičastih stanica i ličinku zbog njezina oblika u tom razdoblju nazivamo D-ličinkom ili stadijem veliger ličinke, kada nastupa stvaranje prve ljuštture. Kod trohofore razvija se velum, organ odgovoran za plivanje, izmjenu plinova i apsorpciju otopljenih organskih tvari, koji ima oblik diska, a okružen je s 3 do 4 reda trepetljika. U toj su fazi kroz poluprozirnu ljušturu dobro uočljivi unutrašnji organi (Erdmann, 1935; Manahan, 1983; Strathmann, 1987). Sljedeći razvojni stadij jest pediveliger ličinka, jedinka spremna za metamorfozu i stvaranje ljuštture (Erdmann, 1935; Raven, 1964). To je ujedno stadij kada ličinka može i plivati i puzati po podlozi. Sposobnost disanja, hranjenja, probava i izlučivanje metabolita ne razlikuje se bitno od razvijene veliger ličinke. Važne značajke ličinke tijekom ovoga procesa jesu razvoj dugačkog stopala za puzanje i pigmentirane očne pjege, vidljive kroz ljušturu. U trenutku sjedinjenja ovih čimbenika, uključujući i odgovarajuću veličinu jedinke, oko 300 µm, jedinka je postigla sve preduvjete za sesilni način života (Hrs-Brenko, 1980; Héral , 1989). Zrele ličinke kamenice negativno su fototaktične pa u procesu prelaska na bentoski život pužu po podlozi tražeći povoljno mjesto za prihvatu. Tijekom metamorfoze dolazi do nestanka stopala, veluma, pigmentirane očne pjege, lažnog plašta koji se resorbira ili odbacuje, te se jedinka prihvata na podlogu (Cranfield, 1973; Harper, 1991).

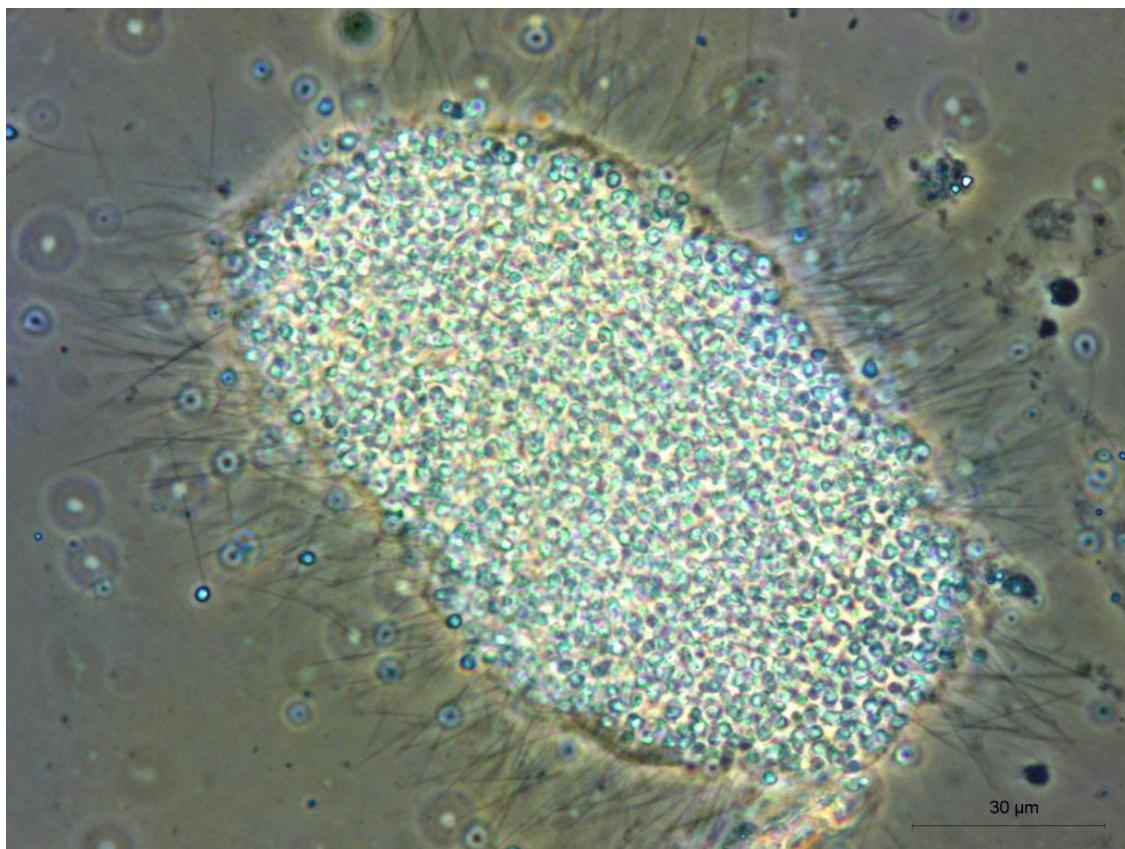


Slika 2. Europska plosnata kamenica, *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758.

1.5.1. ULOGA SPERMATOZEUGMATA U MRIJESTU EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, *Ostrea edulis* L.

Ostrea edulis mrijesti spermatozeugmate (Slika 3), „paketice“ sperme, svaku sastavljenu od radijalno grupiranih stanica sperme pričvršćenih pomoću vanstanične matrice (VSM) za jezgru vanstaničnih vezikula. Vanstanične vezikule se formiraju od viška jezgrinih i plazmatskih membrana proizvedenih tijekom zgušnjavanja spermatida, a VSM je ograničena na prostor između vanstaničnih vezikula i glava sperme, odsutna sa površine oko repova koji su slobodni.

O. edulis ima tipične „primitivne“ spermatozoide koja se sastoje od apikalne akrosomalne vezikule, male, okrugle jezgre, dva mitohondrija i dugog repa. Nakon ispuštanja u morsku vodu, spermatozeugmate zadržavaju strukturalni integritet varirajuće periode vremena (i do 24 h u temperaturama ambijentalne morske vode) i postaju demerzalno distribuirana u mirnoj vodi (Ó Foighil, 1989). U početku se repovi pokreću neravnomjerno i tromo, no tempo i amplituda pokretanja postupno rastu do postizanja tipičnog pokretanja „primitivne“ sperme nakon otpuštanja stanica iz spermatozeugmata. Ovaj rast aktivnosti repova i naknadno otpuštanje gameta se podudaraju sa erozijom VSM tako da bi VSM mogla podešavati pokretljivost sperme uz pridržavanje stanica u spermatozeugmatama. Mrežna formacija spermatozeugmata kod europske plosnate kamenice služi očuvanju održive sperme u visokim koncentracijama u stupcu vode duži period nakon mrijesta. Spermatozoe uz pomoć filtrirajućih struja ulaze u plaštanu šupljinu ženki gdje se odvija oplođnja.



Slika 3. Spermatozeugmata europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis*, povećanje 400x.

2. MATERIJAL I METODE

Spolno zrele jedinke europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* L., su dobivene iz Razvojno-istraživačkog centra za akvakulturu, Bistrina, Dubrovnik tijekom sezone mriješćenja u travnju i svibnju 2009.

2.1. POSTUPAK KRIOPREZERVACIJE SPERME EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, *Ostrea edulis* L.

Ukupno 4 gonade (Slika 4) spolno zrelih jedinki su disecirane i gamete su prikupljene pipetom u Eppendorf tube od 1.5 ml (Slika 5), prethodno napunjene s pripremljenim ekstenderom HBSS (Hanks' balanced salt solution, bez kalcija). Zatim je mikroskopski promatrana pokretljivost sperme u HBSS-u te nakon dodavanja morske vode. Osmolalnost pripremljenog ekstendera (HBSS) je iznosila 915 mOsmol/kg.



Slika 4. Gonada spolno zrele europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis*.

Pokretljivost (postotak pokretnih spermatozoa) sakupljenih uzoraka sperme je procijenjena pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju 200x. Pokretljivost sperme je karakterizirana kao progresivna (kretanje prema naprijed) ili statična (vibriranje u jednom mjestu).



Slika 5. Prikupljanje sperme europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis*.

Krioprotektanti dimetil-sulfoksid (DMSO) ili methanol (MeOH) su dodani otopini sperme u koncentracijama od 5% ili 10%. Uzorci sperme su potom punjeni u kriocjevčice volumena 0.5 ml i smrznuti u tekućem isparavajućem dušiku. Kriocjevčice su smještene na 3 cm visok stiroporni okvir smješten na površinu tekućeg isparavajućeg dušika u stiropornoj kutiji. Vrijeme hlađenja svih uzoraka je iznosilo 3 minute nakon kojih su uzorci uronjeni u tekući dušik. Nakon 10 min u tekućem dušiku uzorci su otapani u vodi zagrijanoj na 40 °C 13 sekundi. Nakon otapanja je otkidan začepljeni kraj kriocjevčica i sadržaj je pražnen u centrifugalne tube volumena 1.5 ml. Pokretljivost sperme nakon otapanja je procijenjena kao što je prethodno opisano za procjene svježe sperme, a promatrana je i aktivacija dodavanjem umjetne morske vode. Preživljavanje spermatozoa je također utvrđeno uz pomoć "live-dead" fluorescentnog bojanja. Ova tehnika upotrebljava dvojno bojanje koristeći membranski propustljivu fluorescentnu

boju (SYBR zelena) koja boja DNK u stanicama s neoštećenom membranom fluorescentno zeleno i membranski nepropustljivu boju (propidij-jodid, PI) koja može prodrijeti samo kroz oštećene membrane i boja DNA fluorescentno crveno. Zeleno fluorescentne stanice (one s neoštećenom membranom) su smatrane živima, a crveno fluorescentne stanice (s oštećenom membranom) su smatrane mrtvima (Slika 10). Osnovna otopina SYBR zelene otopljene u DMSO-u je razrijeđena 50x u HBSS-u. 5 µl ove otopine je dodano u 1000 µl uzorka sperme i držano u mraku 10 min. Nakon toga, 5 µl PI je dodano uzorku i držano u mraku 10 min. Promatranja su rađena fluorescentnim mikroskopom na povećanju 400x koristeći plavi filter s valnom duljinom pobude od 470 nm i valnom duljinom emisije 515 nm. Snimljene su višestruke fotografije obojanih suspenzija sperme digitalnim fotoaparatom i preživljavanje sperme je izraženo kao %-tak zeleno obojanih stanica.

2.2. POSTUPAK KRIOPREZERVACIJE LIČINKA EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, *Ostrea edulis L.*

Izvedeno je nekoliko pokusa na različitim embrionalnim razvojnim stadijima. Koncentracija ličinka je bila 800/cjevčici. Korištene su kriocjevčice volumena 0.5 ml.

U prvom pokusu koncentracija trohofora (rani embrionalni stadij razvoja, tzv. „bijelo sjeme“ (Slika 8)) po cjevčici je iznosila 400 i 800 jedinka/cjevčici, a krioprezervacija obje koncentracije izvođena i s 10% DMSO i s 10% MeOH kao krioprotektantima. Postupak hlađenja je trajao 3 minute na stiropornom okviru od 3 cm (-56 °C/min) nad tekućim isparavajućim dušikom, potom smrzavanje u tekućem dušiku 10 min i otapanje u vodi zagrijanoj na 40°C 13 sec.

Drugi pokus s „bijelim sjemenom“ se odvijao uz hlađenje od 3, 5, 7 ili 9 min na visini od 8 cm iznad tekućeg isparavajućeg dušika uz koncentraciju od 800 ličinka po cjevčici i smrzavanje i otapanje kao u prethodnom pokusu. Pokus je duplicitan za dva krioprotektanta, 10% DMSO i 10% MeOH.

Treći pokus je zadržao istu koncentraciju ličinka i krioprotektanata te isto vrijeme hlađenja uz rast visine hlađenja na 10 cm iznad tekućeg isparavajućeg dušika. Smrzavanje i otapanje su ostali također isti.

U 4. pokusu koncentracija ličinka je iznosila 800 jedinka/cjevčici, visina stiropornog okvira je povećana na 13 cm a vrijeme hlađenja na 9, 12, 15 i 18 min. Krioprotektant je bio 10%-tni DMSO, a smrzavanje i otapanje kao i u prethodnim pokusima.

Peti pokus uz istu koncentraciju ličinka i 10% DMSO kao krioprotektantom je slijedio postupak hlađenja u dva koraka. Cjevčice su 10 min hlađene na visini od 13 cm a zatim na visini od 10 cm 9, 12, 15 i 18 min prije smrzavanja/otapanja.

U šestom pokusu je zadržana koncentracija ličinka, vrijeme i visine hlađenja u dva koraka kao u pokusu prije. Krioprotektant je ostao DMSO a pokus je duplicitan za različite koncentracije krioprotektanta (10% i 15%).

Sedmi pokus se razlikovao od prethodnog samo u koncentraciji krioprotektanta koja je iznosila 5% i 10%.

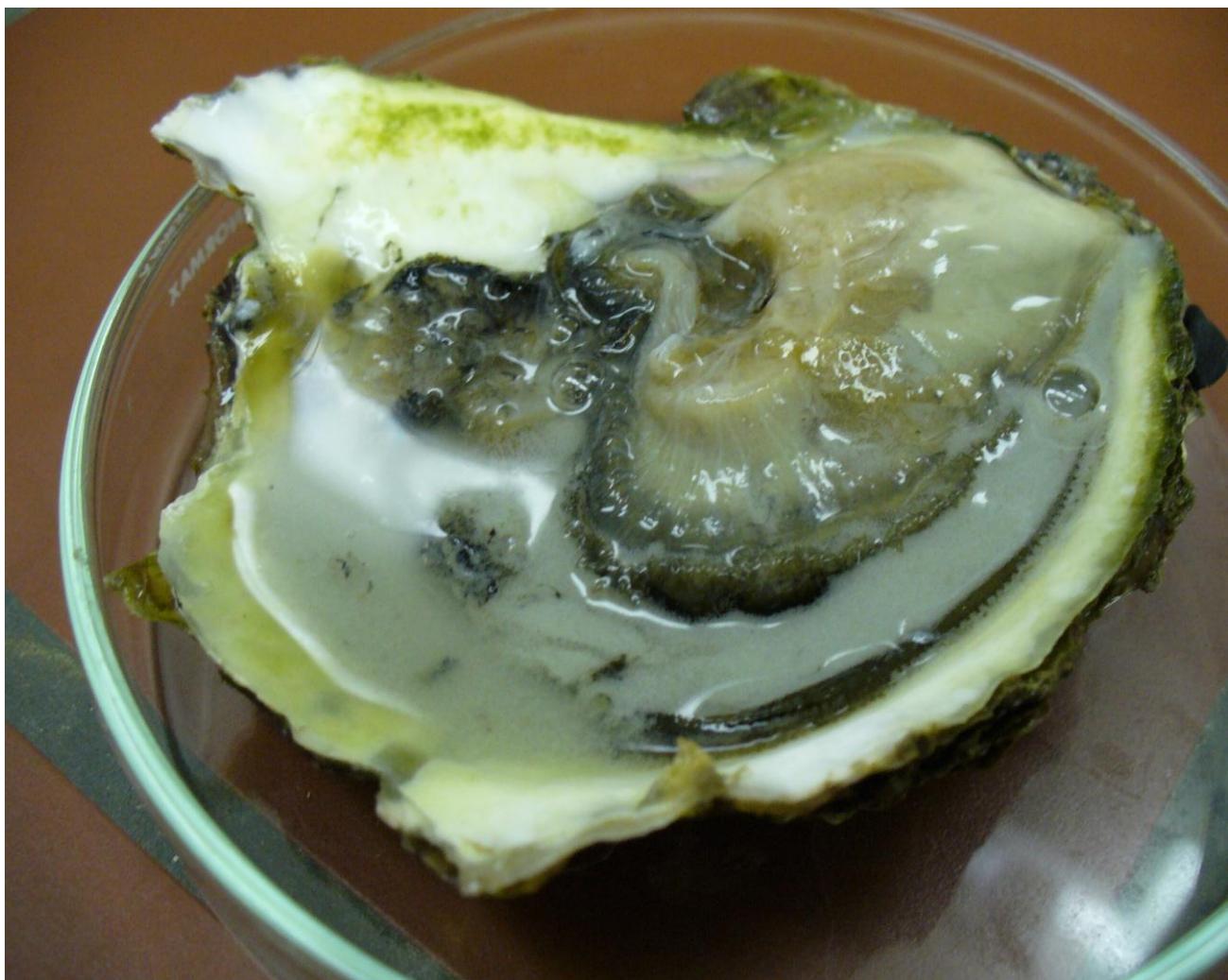
Nakon pokusa s trohoforama žrtvovano je još 15 jedinki među kojima je pronađeno šest u raznim embrionalnim stadijima razvoja (od tzv. „bijelog“ do „crnog“ sjemena)(Slike 6, 7, 8 i 9).



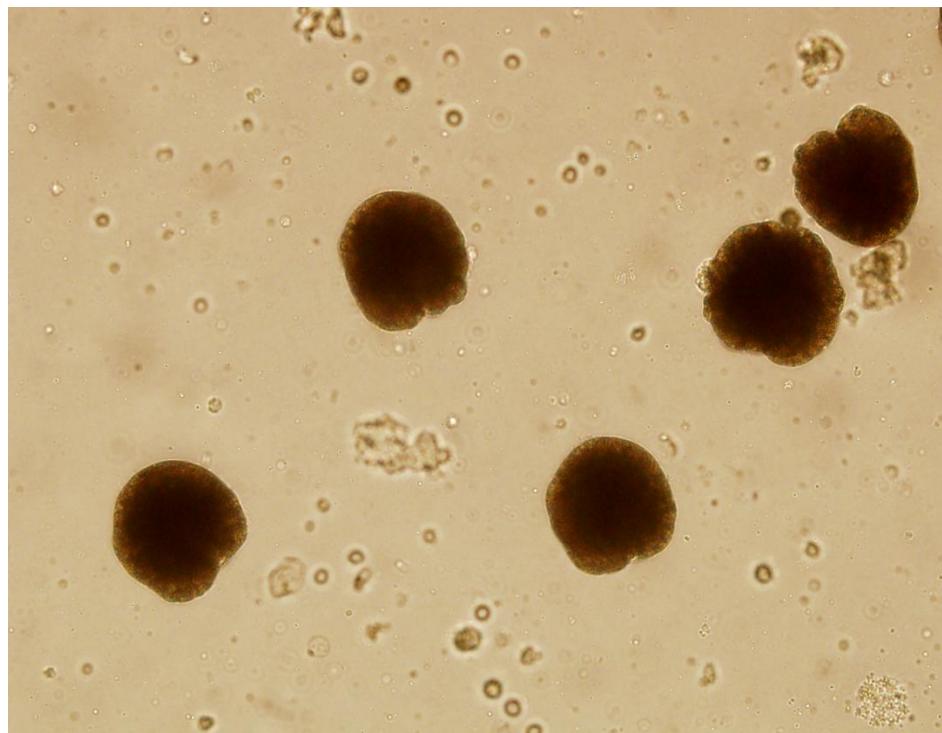
Slika 6. Embrionalni stadiji europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* L. (embrij, trohofora, D-ličinka (veliger), pediveliger).

Svaki stadij je podvrgnut tretmanu krioprotектantom DMSO-om s koncentracijama od 5, 10, 15 i 20% u trajanju od 30 min. Poslije tretmana krioprotектantom ličinke su isprane i držane u morskoj vodi 1 h nakon čega je promatrano preživljavanje.

Nakon promatranja utjecaja krioprotектanata na preživljavanje, 3 različita embrionalna stadija su krioprezervirana s 5%-tним i 10%-tним DMSO-om kao krioprotектantom svaki. Hlađenje se odvijalo 13 cm nad tekućim isparavajućim dušikom 10 min, te 12 i 23 min na 10 cm nakon čega je uslijedilo smrzavanje u tekućem dušiku, otapanje (u vodi zagrijanoj na 40 °C 13 sec) i procjena preživljavanja.



Slika 7. Europska plosnata kamenica, *Ostrea edulis* u stadiju s D- veliger ličinkama.



Slika 8. Stadij trohofore kod europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis*.

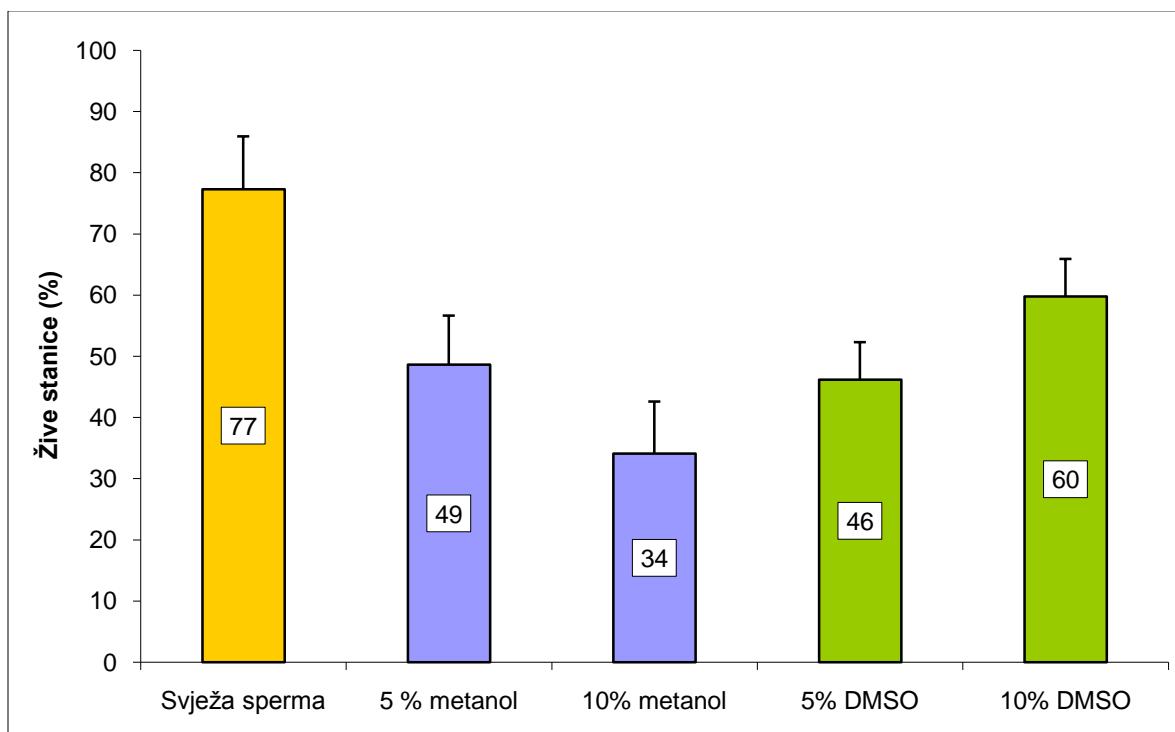


Slika 9. Stadij D-veliger kod europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis*.

3. REZULTATI

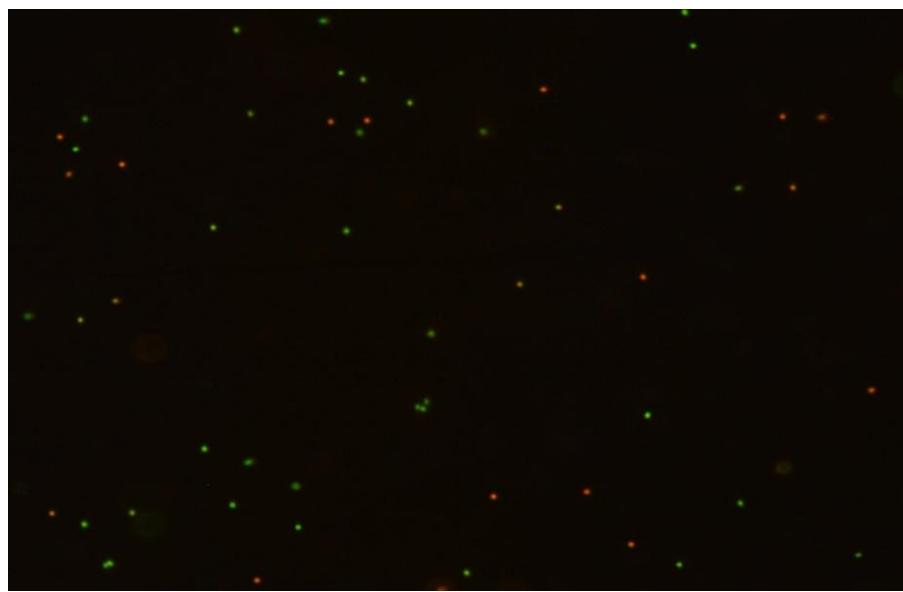
3.1. KRIOPREZERVACIJA SPERME EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, *Ostrea edulis L.*

Slika 10 prikazuje preživljavanje stanica sperme nakon tretmana krioprezervacije sa 5 i 10%-tnim krioprotектантима DMSO i metanolom u usporedbi sa svježom spermom. Preživljavanje je procijenjeno nakon bojanja uzorka sperme na predmetnom stakalcu „live-dead“ fluorescentnim bojilom. Nakon bojanja pod mikroskopom su zeleno obojane žive stanice, a crveno uginule (Slika 11).

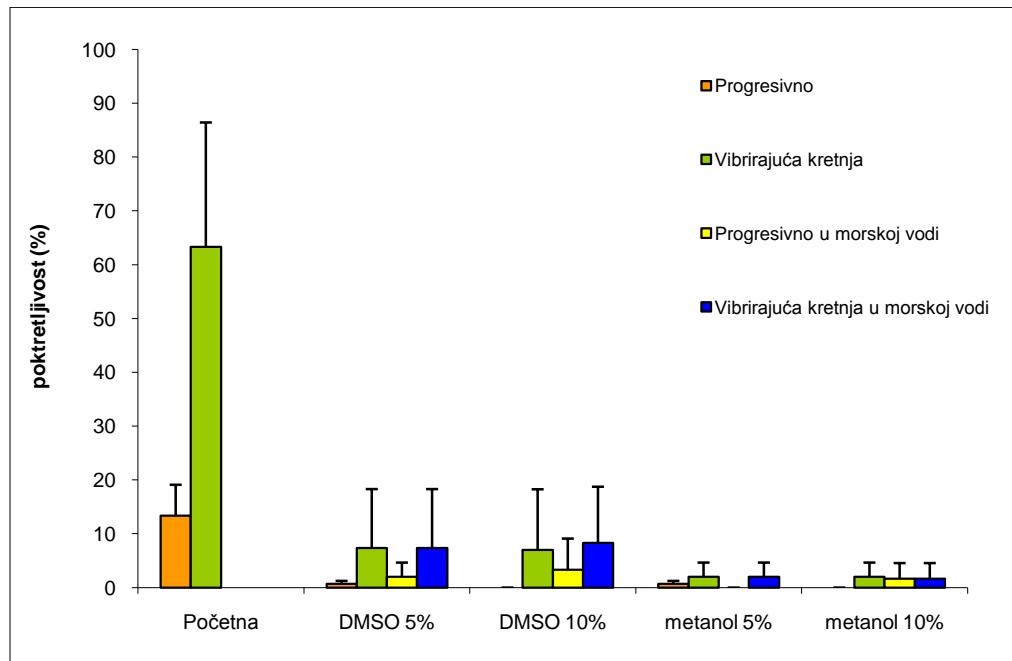


Slika 10. Preživljavanje stanica sperme europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* nakon krioprezervacije u usporedbi s preživljavanjem svježe sperme dobiveno bojanjem fluorescentnim „live-dead“ bojilom.

Istraživanje je pokazalo (Slika 10) da je za krioprezervaciju sperme *O. edulis* DMSO pogodniji krioprotектант и то у концентraciji od 10% kada je preživljavanje iznosilo 60% u odnosu na 77% kontrolne, svježe sperme.



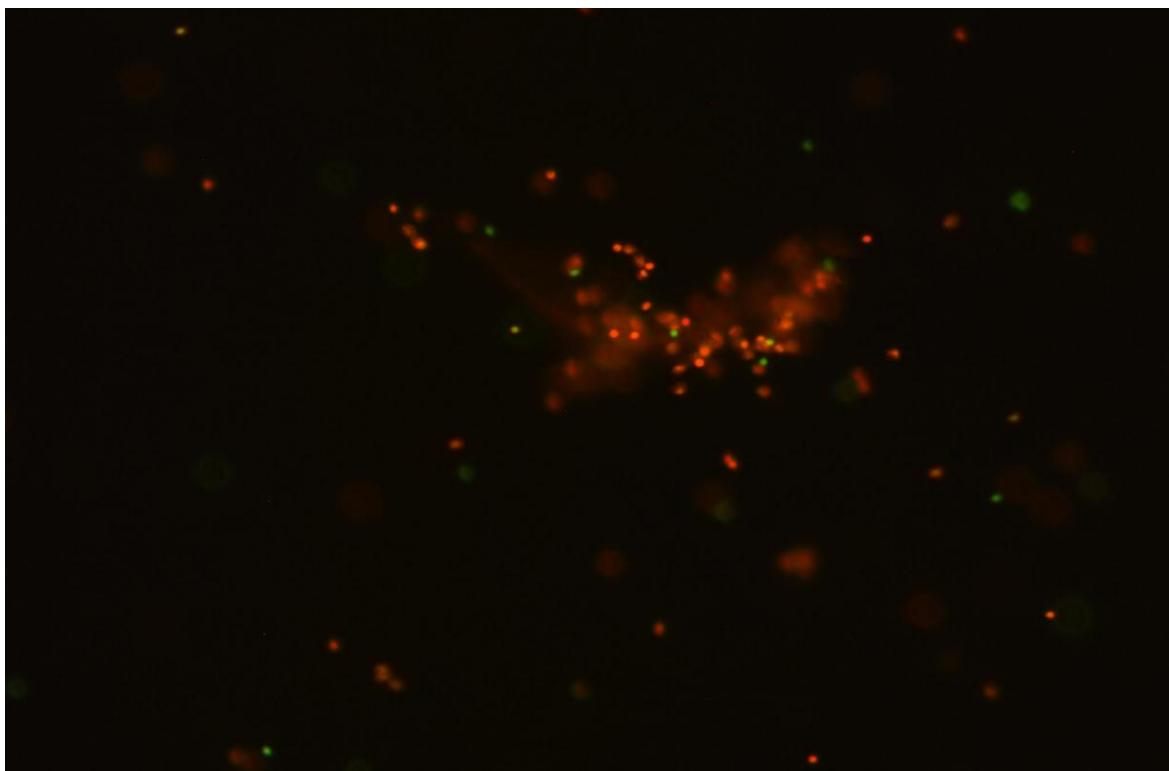
Slika 11. Stanice sperme europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* nakon krioprezervacije s 10%-tnim DMSO-om kao krioprotektantom bojane „live-dead“ fluorescentnim bojilom. Žive stanice su obojene zelenom, a uginule crvenom bojom.



Slika 12. Preživljavanje stanica sperme europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* nakon krioprezervacije sa 5 i 10%-tnim metanolom i DMSO-om kao krioprotektantima, sa i bez dodavanja morske vode u usporedbi sa početnom pokretljivošću sperme prije krioprezervacijskog tretmana.

Procjena pokretljivosti sperme *O. edulis* nakon krioprezervacije pokazuje najveće preživljavanje sa 10%-tним DMSO-om kao krioprotektantom (Slika 12) što potvrđuje prethodne rezultate preživljavanja (Slika 10). Početna pokretljivost prije tretmana krioprezervacije je procijenjena na 13% progresivnog gibanja i 63% vibrirajućih kretnji. Bez dodatka morske vode progresivno gibanje nije vidljivo u tretmanu 10% DMSO, a vibrirajuće kretnje iznose 7%. Nakon dodatka morske vode progresivno gibanje iznosi 3%, a vibrirajuće kretnje sperme 8%. Tretman sa 5% DMSO pokazuje bez dodatka morske vode 1% progresivnog gibanja i 7% vibrirajućih kretnji, što nakon dodavanja morske vode ostaje gotovo isto, uz mali rast progresivnog gibanja od 1%. Oba tretmana metanolom kao krioprotektantom nisu prešla 2% preživljavanja.

Bojanje "live-dead" je pokazalo da su tijekom procesa krioprezervacije spermatozeugmata ("paketici" sperme) oštećene (preživljavanje i struktura)(Slika 13).

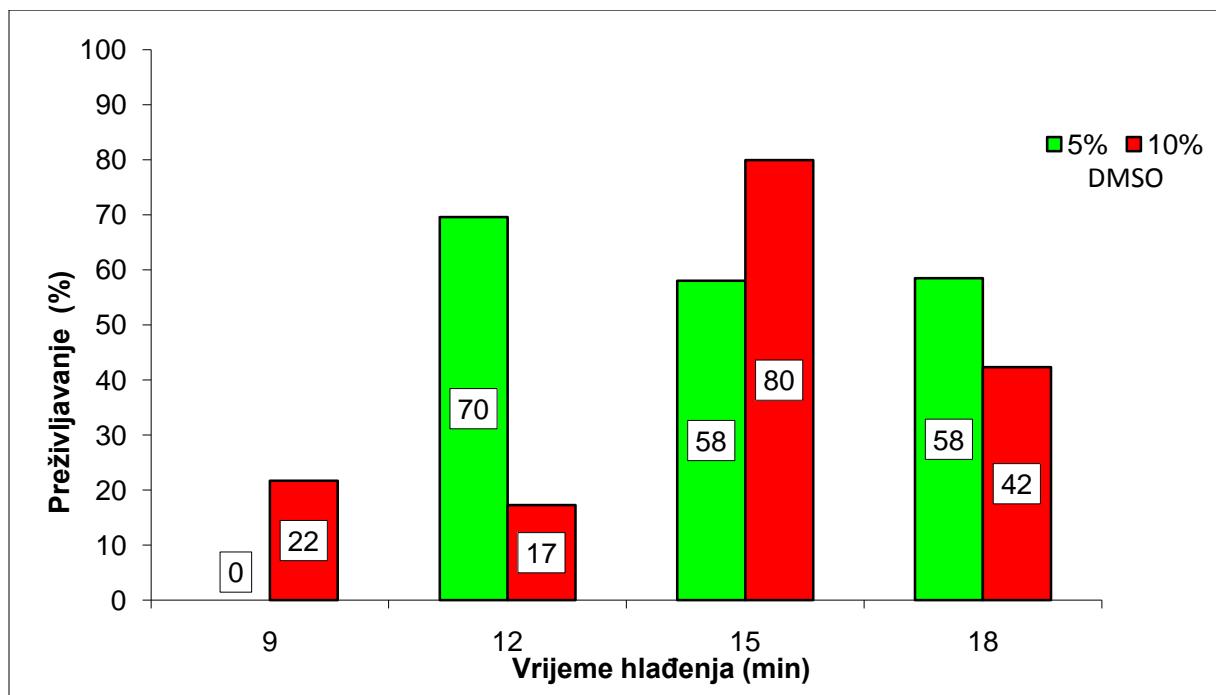


Slika 13. Spermatozeugmata europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* nakon krioprezervacije i "live-dead" fluorescentnog bojanja.

3.2. KRIOPREZERVACIJA LIČINKA EUROPSKE PLOSNATE KAMENICE, *Ostrea edulis L.*

Prva četiri pokušaja krioprezervacije na trohoforama *O. edulis* nisu rezultirala preživljavanjem. Hlađenje se odvijalo na 3, 8, 10 i 13 cm iznad tekućeg isparavajućeg dušika u različitim vremenskim intervalima (od 3 do 18 min). Testirana su dva krioprotektanta, metanol i DMSO, i iako nije bilo prisutno preživljavanje DMSO se pokazao kao pogodniji krioprotektant za krioprezervaciju ličinka *O. edulis* jer su stanice nakon otapanja pokazale znatno manju oštećenost u odnosu na one krioprezervirane metanolom.

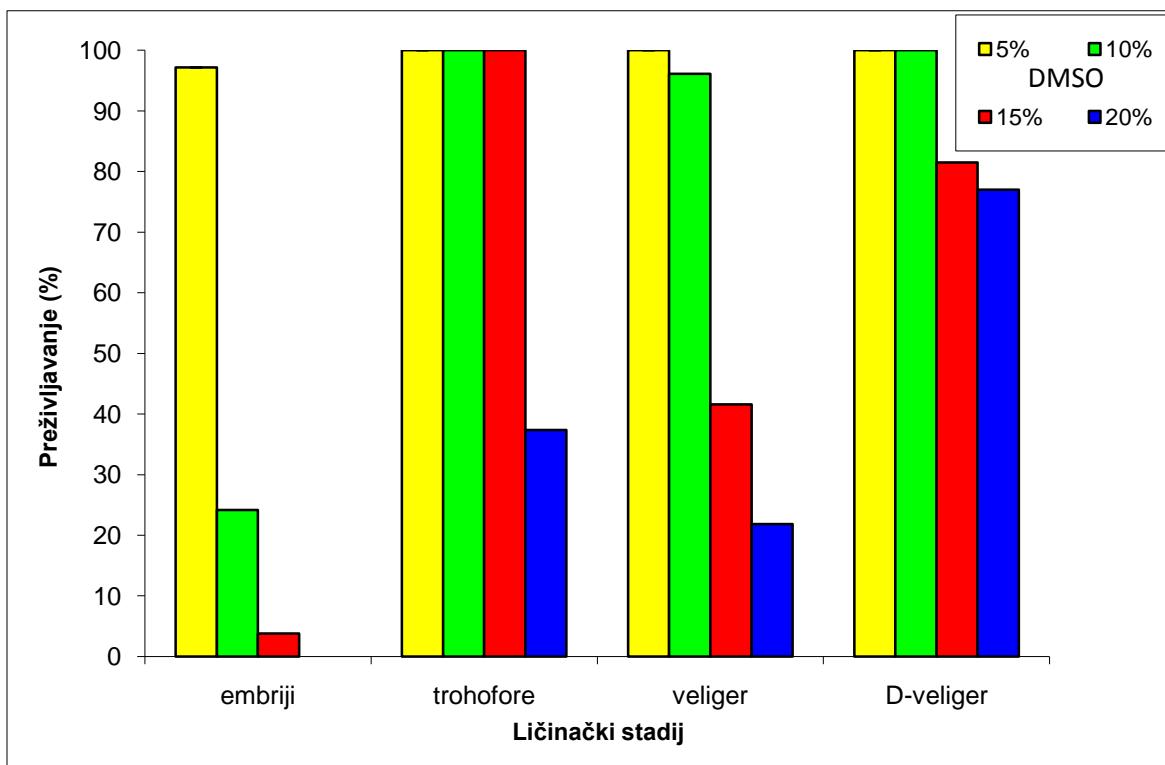
U sljedeća 3 (5.-7.) pokusa je primijenjeno hlađenje u 2 koraka, 10 min na 13 cm i zatim na 10 cm 9, 12, 15 i 18 min. Kao krioprotektant je korišten DMSO u koncentracijama od 5 i 10%. Slika 14 prikazuje preživljavanje trohofora u ovisnosti o vremenu hlađenja za peti i sedmi pokus, jer šesti pokus nije rezultirao preživljavanjem.



Slika 14. Preživljavanje ličinka europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* nakon krioprezervacije sa 5 i 10% DMSO-om kao krioprotektantom, uz hlađenje u 2 koraka (10 min na 13 cm pa na 10 cm 9, 12, 15 i 18 min).

Rezultati pokazuju da je pri koncentraciji krioprotектanta DMSO od 10% preživljavanje prisutno u sva četiri vremena hlađenja, sa najvećim postotkom preživljavanja od 80% kada se hlađenje odvijalo 10 min na 13 cm i zatim 15 min na 10 cm. Koncentracija DMSO od 5% rezultirala je najvećim preživljavanjem (70%) kada se hlađenje odvijalo 10 min na 13 cm i potom 12 min na 10 cm. Hlađenje 10 min na 13 cm i 18 min na 10 cm je rezultiralo 58%-tним preživljavanjem za 5% DMSO i 42%-tним preživljavanjem za 10% DMSO.

Za sljedeće pokuse je žrtvovano još 15 jedinka europske plosnate kamenice među kojima je pronađeno 6 u različitim razvojnim stadijima (embriji, trohofore i D-ličinke (veliger)). Svaki stadij je podvrgnut tretmanu krioprotектantom DMSO-om s koncentracijama od 5, 10, 15 i 20% u trajanju od 30 min. Poslije tretmana krioprotектantom ličinke su isprane i držane u morskoj vodi 1 h nakon čega je promatrano preživljavanje (Slika 15).



Slika 15. Preživljavanje ličinačkih stadija europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* u ovisnosti o različitim koncentracijama krioprotектanta DMSO.

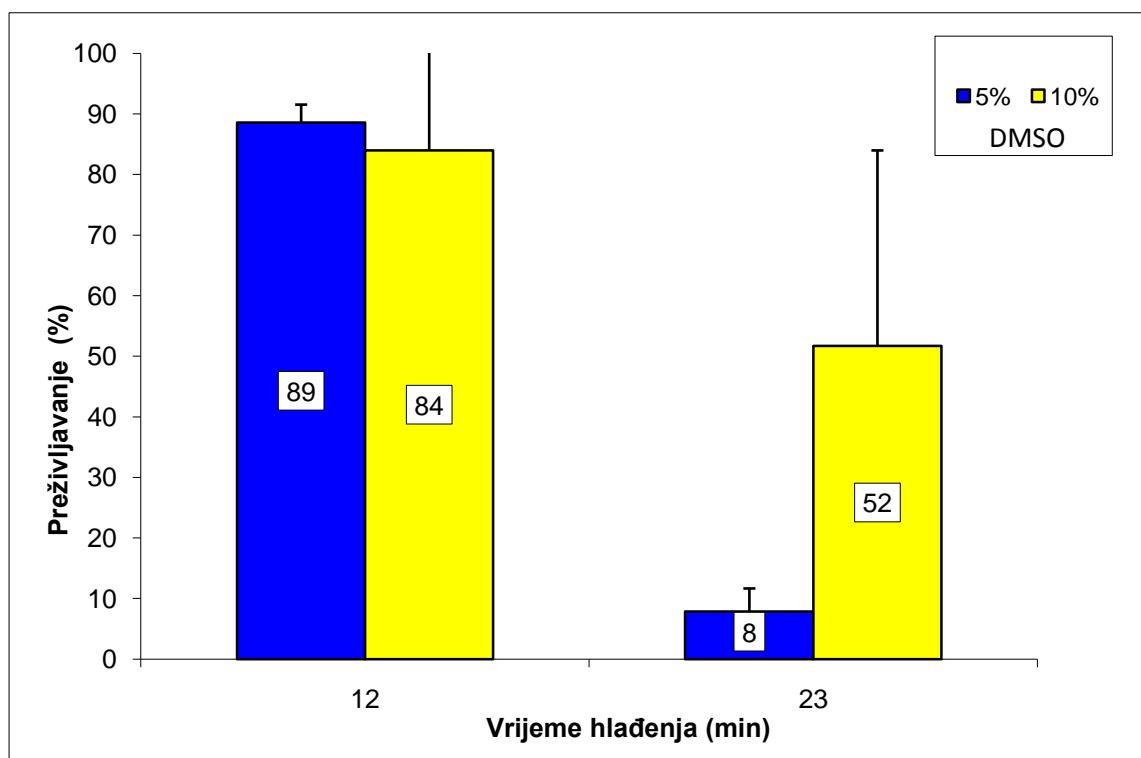
Utjecaj na preživljavanje je pokazala koncentracija krioprotektanta kao i razvojni stadij ličinka. Trohofore, veligeri i D-veligeri su pokazali 100%-tno preživljavanje nakon tretiranja s 5% DMSO-a, a embriji su isti tretman nešto slabije podnijeli sa preživljavanjem 97%.

Koncentracija krioprotektanta od 10% je rezultirala 24%-tnim preživljavanjem embrija i ~100%-tnim preživljavanjem trohofora, veligera i D-veligera.

Preživljavanjem embrija od 4% je rezultirao tretman s 15%-tnim krioprotektantom, trohofore su pokazale 100% preživljavanja, veligeri 41.5%, a D-veligeri 81.5% u istom tretmanu.

Tretman sa 20% krioprotektanta embriji nisu uspjeli preživjeti, trohofore su pokazale preživljavanje od 37%, veligeri 22%, a D-veligeri 77%.

Trohofore, veligeri i D-veligeri su u zadnjem pokušu izloženi koncentracijama od 5% i 10% DMSO-a i krioprezervirane u 2 koraka, 10 min na 13 cm pa 12 i 23 min na 10 cm (Slika 16).



Slika 16. Preživljavanje ličinka europske plosnate kamenice, *Ostrea edulis* nakon krioprezervacije sa 5 i 10% DMSO-om kao krioprotektantom, uz hlađenje u 2 koraka (10 min na 13 cm pa na 10 cm 12 i 23 min).

Hlađenje 10 min na 13 cm pa 12 min na 10 cm je rezultiralo većim postocima preživljavanja i za 5% DMSO-a (89% preživljavanje) i za 10% DMSO-a (84% preživljavanje).

Hlađenje 10 min na 13 cm pa 23 min na 10 cm je rezultiralo preživljavanjem od 8% pri koncentraciji krioprotektanta od 5%, te 52% pri koncentraciji krioprotektanta od 10%.

Svi rezultati prikazuju preživljavanje odmah nakon otapanja. Za stvarno preživljavanje potrebno je pratiti daljnji ličinački razvoj nakon otapanja i mogućnost dostizanja komercijalne, tržišne veličine odgovarajuće kvalitete.

4. RASPRAVA

Istraživanja krioprezervacije školjkaša pokazuju do određenog stupnja preživljavanje izloženosti solucijama krioprotектаната i hlađenje na niske temperature.

Varijacije u kvaliteti sperme nakon otapanja su raspravljane u nekoliko istraživanja (Baynes i Scott, 1987). Rutinski se koristi pokretljivost sperme za predviđanja sposobnosti oplodnje sperme, ali ona nije uvijek u vezi sa stopama oplodnje prije smrzavanja ili nakon otapanja (Piironen, 1987; Stoss i Holtz, 1983). Ova nedosljednost se djelomično pripisuje biološkim varijacijama čimbenika kao što su genetičke značajke i zdravlje matičnog stoka (Baynes i Scott, 1987). U ovom istraživanju nije testirana sposobnost oplodnje krioprezervirane sperme većim dijelom zbog hermafroditizma i larviparnosti *O. edulis*. Rezultati krioprezervacije ukazuju da je za krioprezervaciju sperme *O. edulis* DMSO pogodniji krioprotектант i to u koncentraciji od 10% kada je preživljavanje nakon otapanja iznosilo 60% u odnosu na 77% kontrolne, sveže sperme. Sperma različitih mužjaka pokazuje varijacije pokretljivosti/preživljavanja kao odgovor na smrzavanje i otapanje. Uputno bi bilo izvesti još pokusa kako bi se istražila mogućnost i sposobnost oplodnje otopljene sperme kao stvarnog pokazatelja uspješnosti krioprezervacije. Nakon postupka krioprezervacije i bojanja "live-dead" fluorescentnom bojom primjećena su oštećenja spermatozeugmata ("paketica" sperme) (Slika 13) što bi moglo utjecati na uspjeh oplodnje sa krioprezerviranom spermom. Oštećenja su vidljiva kroz raspadanje strukture spermatozeugmata kao i u jako malom broju živih stanica (obojene zeleno).

Najveća pažnja je usmjerenja na fizičke i kemijske čimbenike koji utječu na preživljavanje otopljenih ličinka kamenica (Lin i sur., 1999), no biološki čimbenici također trebaju biti uzeti u obzir. Jedan od najvažnijih je kvaliteta ličinka koja može varirati od jedinke do jedinke. Matični stok sazrijeva u različitim stopama ovisno o genetičkim različitostima, dostupnosti hrane, stresu ili drugim okolišnim čimbenicima. Posljedično ovi čimbenici mogu utjecati na mejotičke procese, stvarajući oocite sa različitim potencijalom za oplodnju ili asinhronost u razvojnim stadijima. Drugi važan čimbenik koji utječe na preživljavanje ličinka je njihova koncentracija po makrotubi. Ako se embriji nakupe jedan na drugi može doći do akumulacije toksičnih supstanci pa kisik

potreban za normalne metaboličke funkcije može postati ograničavajući (Paniagua-Chavez i Tiersch, 2001). Dosad su se različite metode sa različitim protokolima pokazale uspješnima za krioprezervaciju istog organizma. U ovom istraživanju se DMSO pokazao kao prikladniji krioprotектант за krioprezervaciju ličinka *O. edulis* od metanola. Kasniji ličinački stadiji (D-veliger) pokazuju veću otpornost na utjecaje krioprotектаната i proces krioprezervacije. Najveće preživljavanje je opaženo pri koncentracijama DMSO-a od 5% i 10%, primjenom hlađenja u 2 koraka, 10 min na 13 cm te potom 12 ili 15 min na 10 cm prije uranjanja u tekući dušik. Rezultati ovog istraživanja upućuju na mogućnost krioprezervacije ličinka europske plosnate kamenice uz visoke stope preživljavanja no rezultati su temeljeni na promatranju preživljavanja odmah nakon otapanja. Za daljnje procjene bilo bi uputno promatrati i pratiti daljnji ličinački razvoj nakon otapanja i mogućnost dostizanja komercijalne, tržišne veličine odgovarajuće kvalitete.

5. ZAKLJUČAK

Hrvatska ima dugu tradiciju uzgoja akvatičnih organizama. Organizirani uzgoj europske plosnate kamenice u Malostonskom zaljevu je zabilježen još u 16. stoljeću (1573.). Državnom strategijom razvoja marikulture u sljedećih 10 godina cilj je povećanje uzgoja školjkaša na 20.000 tona godišnje, uz izgradnju mrijestilišta. Godine 1990. u Hrvatskoj su proizvedena 2 milijuna komada kamenica, a od toga je oko 60% proizvedeno u Malostonskom zaljevu (Benović, 1997). Sav uzgoj se temelji na dostupnosti mlađi iz prirode koja varira iz godine u godinu. Negativni čimbenici sredine utječu na oštećenje, usporavanje ili čak potpuno zaustavljanje razvoja ličinka, što u konačnici rezultira preuranjenim ili prekasnim prihvatom ili pak izostankom prihvata na kolektore u prirodnoj sredini, kao i u uzgajalištima. Izgradnja mrijestilišta bi omogućila stalnu dostupnost mlađi i podizanje proizvodnje na veću razinu. Krioprezervacija bi mogla omogućiti dostupnost kvalitetnih ličinka za mrijestilišta i daljnji uzgoj te osigurati genetičku kvalitetu i sigurnost u slučaju mogućih opasnosti kao što su bolesti i okolišne katastrofe.

Ovaj rad je prvi ikada objavljen pokušaj krioprezervacije sperme i ličinka europske plosnate kamenice, *O.edulis*.

Rezultati "live-dead" fluorescentnog bojanja ukazuju da je za krioprezervaciju sperme *O. edulis* DMSO pogodniji krioprotектант i to u koncentraciji od 10% kada je preživljavanje iznosilo 60% u odnosu na 77% kontrolne, svježe sperme.

Preživljavanje na osnovu procjena pokretljivosti također najbolje rezultate pokazuje sa 10% DMSO-om kao krioprotектantom, nema progresivnog gibanje, a vibrirajuće kretnje iznose 7%, dok nakon dodatka morske vode progresivno gibanje iznosi 3%, a vibrirajuće kretnje sperme 8%. Početna pokretljivost prije tretmana krioprezervacije je procijenjena na 13% progresivnog gibanja i 63% vibrirajućih kretnji. Krioprezervacija pokazuje utjecaj na spermatozeugmata ("paketice" sperme) kroz smanjeno preživljavanje i strukturalne deformacije što bi moglo utjecati na moć oplodnje. Stvarni uspjeh krioprezervacije sperme *O.edulis* bi bilo uputno testirati uspješnošću oplodnje što otežava hermafroditizam kao i unutarnja oplodnja ovog školjkaša.

Kod krioprezervacije trohofora rezultati pokazuju da je pri koncentraciji krioprotektanta DMSO od 10% preživljavanje prisutno u sva četiri vremena hlađenja (9, 12, 15 i 18 min), sa najvećim postotkom preživljavanja od 80% kada se hlađenje odvijalo 10 min na 13 cm i zatim 15 min na 10 cm. Utjecaj na preživljavanje je pokazala koncentracija krioprotektanta kao i razvojni stadij ličinka. Rani embrionalni stadiji su osjetljiviji. Hlađenje 10 min na 13 cm pa 12 min na 10 cm je rezultiralo većim postocima preživljavanja i za 5% DMSO-a (89% preživljavanje) i za 10% DMSO-a (84% preživljavanje) kod trohofora, veligera i D-veligera. Krioprezervacija ličinka europske plosnate kamenice je moguća, no potrebno je optimizirati krioprezervacijski protokol kao i promatrati preživljavanje krioprezerviranih ličinka do tržišne veličine kako bi se donijeli valjani zaključci.

6. LITERATURA

- Adams, S.L., Smith, J.F., Roberts, R.D., Janke, A.R., Kaspar, H.F., Tervit, H.R., Pugh, P.A., Webb, S.C., King, N.G. 2004. Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of a practical method for commercial spat production. *Aquaculture*, 242: 271-282.
- Baynes, S.M., Scott, A.P. 1987. Rainbow trout spermatozoa : The influence of spermquality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture* 66, 53-67.
- Benović A., 1997. The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of Croatia. The History, present condition, and future of the mollusc an fisheries of north and central America and Europe. Volume 3, Europe. US Dept Commer, Noaa Tech Rep 129, 217-226.
- Chao, N.H., Chiang, C.P., Hsu, H.W., Tsai, C.T., Lin, T.T. 1994. Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquat. Living Resour.*, 7: 99.
- Chao, N.H., Lin, T.T., Chen, Y.J., Hsu, H.W., Liao, I.C. 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*, 155: 31-44.
- Choi, Y.H., Chang, Y.J. 2003. The influence of cooling rate, developmental stage and the addition of sugar on the cryopresarvation of larvae of the Pearl oyster *Pinctada fucata martensi*. *Cryobiology*, 46: 190.
- Coe W. E., 1943. Sexual differentiation in Mollusks I.-pelecypods. *Quart. Rev. Biol.*, 18-2: 154-164.
- Cranfield H. J., 1973. A study of Morphology, Ultrastructure, and histocemistry of the pediveliger of *Ostrea edulis*. *Mar Biol.* 22; 187-202.
- Denniston R.S., Michelet S. and Godke R.A. 2000. Principles of Cryopreservation. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*. Szerk: Tiersch, T.R. és Mazik, P.M. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. 2000. pp 59-74.
- Dong, Q., Eudeline, B., Huang, C., Tiersch, T.R., 2005a. Standardization of photometric measurement of sperm concentration from diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture Research*, 36: 86-93.

- Dong, Q., Eudeline, B., Huang, C., Allen S.K., Tiersch, T.R., 2005b. Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*, 50: 1-16.
- Dong, Q., Huang, C., Tiersch, T.R. 2007. Control of sperm concentration is necessary for standardization of sperm cryopreservation in aquatic species: Evidence from sperm agglutination in oysters. *Cryobiology*, 54:87-98.
- Erdmann W., 1935. Untersuchung über die Lebensgeschichte der Auster. *Wiss.Meeruntersuch. Komm.Wiss.Untersuch.Dtsch.Meere in Kiel und der Biol.Anstalt Helgoland* 19(16) ; 1-25.
- Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A. and Meryman H.T. 1984. Vitrification as an Approach to Cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426.
- Gwo, J.C. 1995. Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology*, 43: 1163-1174.
- Gwo, J.C., Chen, C.W., Cheng, H.Y. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology*, 58: 1563-1578.
- Harper E. M., 1991. Post-larval cementation in the Ostreidae and its implications for other cementing bivalvia. *J. Moll.Stud*: 58; 37-47.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of Sharoteredon mossambicus spermatozoa, *Aquaculture*. 32: 313–320.
- He, Y., Dong, Q., Tiersch, T.R., Devireddy, R.V., 2004. Variation in the Membrane Transport Properties and Predicted Optimal Rates of Freezing for Spermatozoa of Diploid and Tetraploid Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Biology of Reproduction*. 70:1428-1437.
- Héral M., 1989. L'ostréiculture française traditionnelle. In «Aquaculture», Barnabé, Ed. Lavoisier Technique et Documentation Publisher, 2^eme édition, Paris, vol. 1: 347-369.
- Hrs-Brenko M., 1980. The settlement of mussels and oysters in the norther Adriatic Sea. *Nova Thalassia* 4, Suppl. 67-85.
- Korringa P., 1940. Experiments and observations on swarming, setting and pelagic life in the oyster *Ostrea edulis*. *Arc.Neerl.Zool.*, Vol. 5, pg. 1-249.

- Korringa P., 1947. Relations between the moon and periodicity in breeding throughout the geographical ranges of *Ostrea edulis*. Ann Bio 33: pp. 1-17.
- Leropoli, S., Masullo, P., Do Espirito Santo, M., Sansone, G., 2004. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilisation viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*C. gigas*). Cryobiology, 49: 250-257.
- Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research 28, 471-479.
- Leibo S.P. 1980. Water Permeability and its Activation Energy of Fertilized and Unfertilized Mouse Ova. Journal of Membrane Biology. 53, 179-188.
- Lin, T.T., Chao, N.H., Tung, H.T. 1999. Factors affecting survival of cryopreserved oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Cryobiology, 39: 192-196.
- Manahan D. T., 1983. The uptake and metabolism of dissolved amino acids by bivalve larvae. Biol. Bull. 164; 236-250.
- Marteil L., 1976. La conchyliculture française. II . Biologie de l'huître et de la moule. Rev. Trav. Inst. Peches marit., 15-2: 153-346.
- Martin A. G., Littaye-Mariette A., Langlade A. i Allenou J.-P., 1995. Cycle de reproduction naturelle de l'huître plate *Ostrea edulis*. Groupe de Travail sur la Reproduction des Mollusques Bivalves d'Aquaculture Marine. 21-33.
- Mazur P. 1963. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. Journal of Cell Physiology. 47, 347-369.
- Mazur P. 1970. The Freezing of Biological Systems. Science. Cryobiology: Vol. 168, 939-949.
- Nascimento, A., Leite, N.L.M.B., Araújo, M.M.S., Sansone, G., Pereira, S.A., Espírito Santo, M. 2005. Selection of cryoprotectant based on their toxic effects on oyster gametes and embryos. Cryobiology, 46: 190.
- Nerlović, V. 2005. Utjecaj prehrane fitoplanktonom na razvoj ličinke kamenice *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 u laboratorijskim uvjetima uzgoja, magistarski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Ó Foighil, D. 1989. Role of spermatozeugmata in the spawning ecology of the brooding oyster *Ostrea edulis*. Gamete research 24: 219.228.

- Paniagua-Chavez, C.G., Buchman, J.T., Supan, J.E., Tiersch T.R. 1998. Settlement and growth of Eastern oyster produced from cryopreserved larvae. *Cryo-Lett.*, 19: 283.
- Paniagua-Chavez, C.G., Tiersch T.R. 2001. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trocophore larvae of the Eastern oyster. *Cryobiology*, 43: 211-223.
- Piironen, J. 1987. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of Whitefish (*Coregonus muksun* Pallas). *Aquaculture* 66, 347-357.
- Raven C. P., 1964. Development. In: *Physiology of Mollusca*, Vol I, Chapter 5; 65 . 195. Wilbur K M, Yonge CM, (Eds.), Academic Press, New York and London
- Scott A.P., Baynes S.M. 1980. A review of biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17, 707-739.
- Smith, J.F., Pugh, P.A., Tervit, H.R., Roberts, R.D., Janke, A.R., Kaspar, H.F., Adams, S.L. 2001. Cryopreservation of shellfish sperm, eggs and embryos. *Proceedings of New Zealand Society of Animal Production* 61: 31-34.
- Stoss, J., Holtz, W. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm.III. Effects of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. *Aquaculture* 31, 275-282.
- Strathmann M.F., 1987. Phylum Mollusca, Class Bivalvia. Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast; 309-353.University of Washington Press, Seattle and London.
- Yonge C. M., 1960. Oysters. Londres, Collins edit. 209 p.