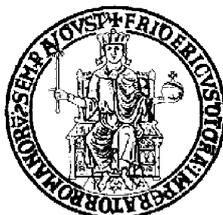


Università degli Studi di Napoli *Federico II*



Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie e Agroalimentari

**Dottorato di Ricerca
in**

Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari

Indirizzo Acquacoltura

XXIII Ciclo

**Centro interdipartimentale di ricerca per la gestione
delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura**

***Applicazioni criobiologiche in acquacoltura e
nella gestione delle risorse idrobiologiche***

Coordinatore

Ch.mo Prof. Giancarlo BARBIERI

Relatore

Ch.mo Prof. Giovanni SANSONE

Dottoranda

Dr. Valentina VITIELLO

Indice

Capitolo I. Introduzione	9
La criopreservazione	10
<u>Alterazioni meccaniche e chimico-fisiche indotte dal congelamento</u>	10
<u>Danni cellulari indotti dal congelamento</u>	11
<u>Tecniche e strumenti</u>	12
<i>Crioprotettivi</i>	12
<i>Seeding</i>	14
<i>Vitrificazione</i>	15
<u>Tappe per l'allestimento di un protocollo di criopreservazione</u>	16
Applicazioni delle tecniche di criopreservazione	16
<u>Produzione animale</u>	16
<i>Acquacoltura</i>	17
<u>Ambiente</u>	18
<u>Ricerca di base</u>	19
La ricerca criobiologica presso il CRIAcq	19
Capitolo 2. Scopo del lavoro e Piano sperimentale	21
Scopo del lavoro	22
Piano sperimentale	22
<u>Valutazioni della qualità dei sistemi biologici nelle tre fasi sperimentali</u>	22
<i>Spermatozoi</i>	22
<i>Ovociti</i>	23
<i>Embrioni</i>	23
<u>Valutazione del tasso di fecondazione</u>	24
<u>Valutazione del tasso di sviluppo embrionale</u>	24
Capitolo III. Materiali e Metodi	26
Fase A. Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone emergenti per l'acquacoltura	27
<i>Pagellus erythrinus</i>	27
<u>Animali</u>	27
<u>Ottenimento seme</u>	27
<u>Trasporto del seme</u>	27
<u>Modalità di attivazione del seme</u>	27
<u>Formazione dei pool di spermatozoi</u>	27
<u>Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	27

<i>Analisi del pattern di motilità del seme fresco</i>	27
<i>Capacità di attivazione nel tempo di seme mantenuto a differenti regimi termici e sottoposto a diverse modalità di stoccaggio</i>	27
<u>Selezione degli agenti crioprotettivi</u>	28
<u>Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento</u>	28
<u>Selezione della curva di congelamento</u>	28
<i>Scongelamento</i>	29
<u>Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati</u>	29
<i>Pecten jacobaeus</i>	30
<u>Animali</u>	30
<u>Ottenimento seme</u>	30
<i>Prove di emissione gametica</i>	30
<u>Modalità di attivazione del seme</u>	30
<u>Formazione dei pool di spermatozoi</u>	30
<u>Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	30
<i>Analisi del pattern di motilità del seme fresco</i>	30
<i>Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici</i>	31
<u>Selezione degli agenti crioprotettivi</u>	31
<u>Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento</u>	31
<u>Selezione della curva di congelamento</u>	31
<i>Scongelamento</i>	32
<u>Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati</u>	32
<i>Paracentrotus lividus</i>	33
<u>Animali</u>	33
<u>Ottenimento seme ed uova</u>	33
<u>Modalità di attivazione del seme</u>	33
<u>Formazione dei pool di spermatozoi</u>	33
<u>Formazione del pool di ovociti</u>	33
<u>Protocollo di fecondazione</u>	33
<u>Protocollo di sviluppo embrionale</u>	33
<u>Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	34
<i>Analisi del pattern di motilità del seme fresco</i>	34
<i>Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici</i>	34
<u>Selezione degli agenti crioprotettivi</u>	34
<u>Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento</u>	35
<u>Selezione della curva di congelamento</u>	35
<i>Scongelamento</i>	36

<i>Ostrea edulis</i>	37
<u>Animali</u>	37
<u>Ottenimento seme</u>	37
<u>Modalità di attivazione del seme</u>	37
<u>Formazione dei pool di spermatozoi</u>	37
<u>Ottimizzazione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	37
<i>Effetto della temperatura sulla motilità spermatica</i>	37
<i>Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici</i>	37
<u>Ottimizzazione della curva di congelamento per nunc da 2 mL</u>	37
<i>Scongelamento</i>	39
<u>Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati</u>	39
Fase B. Validazione della qualità dei gameti prodotti in sistemi RAS (Recirculating Aquaculture Systems) mediante l'applicazione di protocolli di criopreservazione già standardizzati	40
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	40
<i>Ottenimento gameti</i>	40
<i>Produzione trocofore</i>	40
<u>Spermatozoi</u>	40
<u>Trocofore</u>	40
<i>Crassostrea gigas</i>	41
<i>Ottenimento gameti</i>	41
<i>Produzione trocofore</i>	41
<u>Spermatozoi</u>	41
<u>Ovociti</u>	41
<u>Trocofore</u>	42
<i>Ostrea edulis</i>	42
<i>Ottenimento spermatozoi</i>	42
<u>Spermatozoi</u>	42
<i>Pecten jacobaeus</i>	42
<i>Ottenimento spermatozoi</i>	42
<u>Spermatozoi</u>	43
Fase C. Progettazione di biosaggi innovativi con sistemi criopreservati	44
<u>Animali</u>	44
<u>Ottenimento seme</u>	44
<u>Trasporto seme</u>	44
<u>Modalità di attivazione del seme</u>	44
<u>Formazione dei pool di spermatozoi</u>	44

<u>Congelamento</u>	44
<u>Effetto dello stoccaggio in criobanca sulla qualità di spermatozoi criopreservati di <i>Sparus aurata</i></u>	44
<u>Effetto della diluizione con NaCl 1% del seme scongelato mantenuto a differenti regimi termici (18±1°C e 3±1°C)</u>	45
<u>Saggi ecotossicologici dei singoli xenobiotici su seme fresco</u>	45
<u>Criosaggi dei singoli xenobiotici su seme scongelato</u>	45
<u>Xenobiotici testati</u>	45
<i>Metalli pesanti</i>	46
<i>Pesticidi</i>	46
<i>Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)</i>	46
Analisi statistica	46
Capitolo IV. Analisi dei risultati e discussioni	47
Fase A. Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone emergenti per l'acquacoltura	48
<i>Pagellus erythrinus</i>	48
<u>Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	48
<i>Analisi del pattern di motilità del seme fresco</i>	48
<i>Capacità di attivazione nel tempo di seme mantenuto a differenti regimi termici e sottoposto a diverse modalità di stoccaggio</i>	48
<u>Selezione degli agenti crioprotettivi</u>	50
<u>Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento</u>	53
<u>Selezione della curva di congelamento</u>	53
<u>Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati</u>	54
<i>Pecten jacobaeus</i>	55
<i>Prove di emissione gametica</i>	55
<u>Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	55
<i>Analisi del pattern di motilità del seme fresco</i>	55
<u>Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici</u>	56
<u>Selezione degli agenti crioprotettivi</u>	57
<u>Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento</u>	60
<u>Selezione della curva di congelamento</u>	62
<u>Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati</u>	62
<i>Paracentrotus lividus</i>	64
<u>Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	64
<i>Analisi del pattern di motilità del seme fresco</i>	64
<u>Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici</u>	64

<u>Selezione degli agenti crioprotettivi</u>	66
<u>Selezione del gradiente di Adattamento/Raffreddamento</u>	72
<u>Selezione della curva di congelamento</u>	75
<i>Ostrea edulis</i>	78
<u>Ottimizzazione delle conoscenze sul sistema biologico</u>	78
<i>Effetto della temperatura sulla motilità spermatica</i>	78
<i>Effetto della conservazione del seme secco a differenti regimi termici sulla motilità spermatica</i>	78
<u>Ottimizzazione della curva di congelamento per nunc da 2mL</u>	80
<i>Confronto tra i risultati post-scongelo ottenuti con paillettes e nunc</i>	80
Fase B. Validazione della qualità dei gameti prodotti in sistemi RAS (Recirculating Aquaculture Systems) mediante l'applicazione di protocolli di criopreservazione standardizzati	82
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	82
<u>Spermatozoi</u>	82
<u>Trocofore</u>	83
<i>Crassostrea gigas</i>	83
<u>Spermatozoi</u>	83
<u>Ovociti</u>	84
<u>Trocofore</u>	85
<i>Ostrea edulis</i>	86
<u>Spermatozoi</u>	86
<i>Pecten jacobaeus</i>	87
<u>Spermatozoi</u>	87
Fase C. Progettazione di biosaggi innovativi con sistemi criopreservati	88
<i>Effetto dello stoccaggio in criobanca sulla qualità di spermatozoi criopreservati di Sparus aurata</i>	88
<i>Effetto della diluizione con NaCl 1% del seme scongelato mantenuto a differenti regimi termici (18±1°C e 3±1°C)</i>	88
<i>Biosaggi con spermatozoi freschi e criopreservati di Sparus aurata</i>	89
<u>Metalli pesanti</u>	89
<i>Cadmio</i>	89
<i>Cromo</i>	90
<i>Piombo</i>	91
<u>Pesticidi</u>	91
<i>Azinfos-metile</i>	91
<i>Clorpirifos</i>	92
<i>Pentaclorofenolo</i>	92

<u>Idrocarburi Policiclici Aromatici</u>	93
<i>Antracene</i>	93
<i>Fenantrene</i>	94
<i>Pirene</i>	94
Capitolo V. Conclusioni	96
Bibliografia	99

Capitolo I

Introduzione

La criopreservazione

Lo studio degli effetti chimici, fisici e fisiologici del freddo e del profondo freddo sulla materia vivente trova applicazione nella criopreservazione, il cui obiettivo è lo stoccaggio di materiale biologico a basse temperature, generalmente a -196°C (Ashwood et al., 1980), oltre i limiti di tempo imposti in natura, con il ripristino, allo scongelamento, di tutti i parametri fisiologici caratteristici della materia vivente prima del congelamento (Felix, 1985). Per assicurare la sopravvivenza del materiale biologico dopo lo scongelamento è necessario sottoporlo a temperature inferiori a -150°C ; è stato infatti dimostrato che le cellule conservate a temperature superiori (in particolare intorno a -80°C) non si mantengono integre per periodi di tempo lunghi (Chao & Liao, 2001), mentre non subiscono alcuna modificazione nelle loro strutture ultracellulari se conservate a temperature inferiori (Mazur, 1964), che inducono il blocco dei processi metabolici rendendo la vitalità cellulare indipendente dal tempo di conservazione.

La validità della conservazione in azoto liquido per lungo tempo è stata ampiamente dimostrata verificando l'assenza di variazioni significative di vitalità rispetto al materiale fresco (Kumai et al, 1998), nonché registrando tassi di incidenza di alterazioni mutageniche risultati non differenti in animali prodotti da gameti congelati rispetto al fresco (Elder & Brian., 2000).

Alterazioni meccaniche e chimico-fisiche indotte dal congelamento

L'esposizione a condizioni estreme, quali il freddo ed il profondo freddo, provoca effetti di vario tipo, metabolico e strutturale, sui diversi componenti dei sistemi biologici.

Il principale problema del congelamento è il danneggiamento delle cellule per cause sia meccaniche che chimico-fisiche.

Le cause meccaniche sono imputabili alla presenza di acqua nell'ambiente intracellulare che alle basse temperature cristallizza danneggiando la membrana plasmatica. La formazione di ghiaccio intracellulare (Figura 1) è infatti la minaccia più significativa per la vitalità cellulare ed è quasi sempre letale (Mazur, 1963; Mazur, 1968; Mazur, 1977; Pegg, 1987; Sherman, 1962).

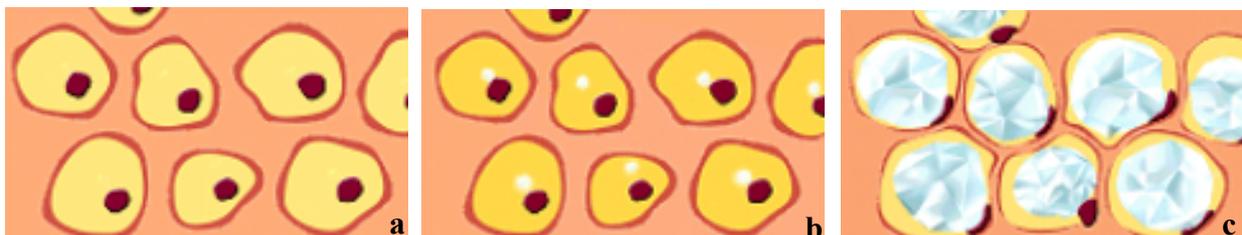


Figura 1. Formazione di ghiaccio intracellulare: (A) tessuto normale, (B) formazione di ghiaccio intracellulare, (C) cristalli di ghiacci intracellulari.

Le cause chimico-fisiche di danneggiamento sono imputabili all'acqua extracellulare che, congelando prima di quella intracellulare, provoca un aumento della pressione osmotica dell'ambiente esterno, generando un flusso di acqua verso l'esterno della cellula che ne causa la riduzione di volume, il danneggiamento di membrane e costituenti cellulari e la morte può sopraggiungere per eccessiva disidratazione o concentrazione ionica (Franks, 1982). Questo effetto di disidratazione delle cellule e concentrazione della soluzione, denominato lesione effetto-

soluzione (Figura 2), può essere tollerato entro certi limiti dalla cellula: le cellule vegetali tollerano, ad esempio, una riduzione del volume cellulare fino al 40–50%, mentre le uova di mammifero tollerano un aumento del loro volume del 200% per 30 minuti senza perdere la loro capacità di sviluppo (Leung, 1991).

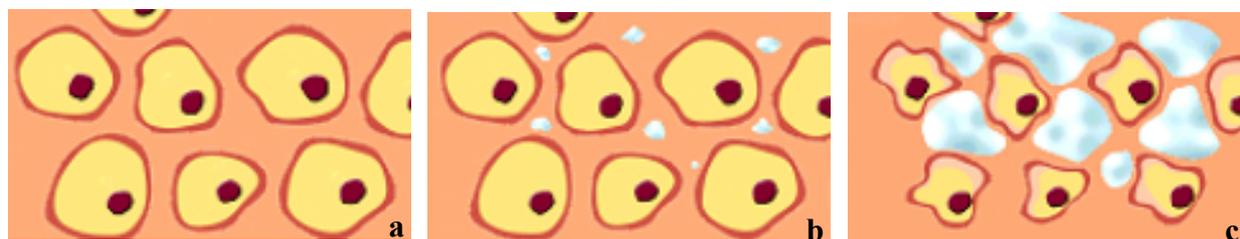


Figura 2. Lesione effetto soluzione: (A) tessuto normale, (B) formazione di ghiaccio extracellulare, (C) disidratazione ed iperosmosi.

Il verificarsi di uno o dell'altro tipo di lesione è strettamente legato alla velocità di congelamento. La formazione di ghiaccio intracellulare è comunemente associata a tassi di congelamento rapido, mentre le lesioni effetto-soluzione sono associate a tassi di congelamento lenti. Tassi di congelamento estremamente bassi (dell'ordine di pochi gradi centigradi al minuto) e tassi di congelamento molto rapidi (dell'ordine di decine di gradi centigradi al minuto) sono in generale considerati come i più distruttivi per i tessuti biologici.

Danni cellulari indotti dal congelamento

Il principale pericolo per le cellule durante i processi di congelamento è rappresentato non dallo stoccaggio a temperature molto basse, ma dall'attraversamento della cosiddetta zona intermedia di temperatura critica (tra +15 °C e -5 °C) sia durante la fase di raffreddamento, che durante quella di riscaldamento (Dobrinsky 1996; Martino et al., 1996a; Martino et al., 1996b; Isachenko et al., 1998; Zeron et al., 1999).

Tra -5 e -80 °C, la formazione dei cristalli di ghiaccio a livello extracellulare e ancor di più intracellulare è la principale fonte di danno, mentre tra -50 e -150 °C i danni che si verificano in maggior misura sono quelli meccanici da frattura del citoplasma, sebbene il meccanismo e le esatte temperature alle quali ciò avviene non sono ancora stati ben definiti.

Lo stoccaggio al di sotto dei -150 °C sembra essere la fase meno pericolosa dell'intera procedura di crioconservazione; in questo caso lo scongelamento accidentale rappresenta il danno che più di frequente tende a verificarsi.

Il primo bersaglio dei danni da congelamento e scongelamento è rappresentato dalla membrana cellulare, barriera fra il citoplasma e l'ambiente esterno. La componente lipidica rende la membrana semipermeabile e fluida per permettere i meccanismi di trasporto trans-membrana (Singer & Nicholson, 1972).

Gli effetti sulle membrane sono complessi e non compresi del tutto (Franks, 1982). A temperatura normale, i fosfolipidi formano un doppio strato con i gruppi polari esposti verso la soluzione acquosa e la parte idrofobica che rappresenta la componente fluida del doppio strato. In questa struttura a mosaico si incastrano le proteine. Durante il congelamento i lipidi solidificano e bloccano il movimento delle proteine.

Quando la membrana congela rapidamente le proteine non possono migrare in zone più fluide della membrana, gradienti di congelamento più lenti forniscono invece alle proteine la possibilità di

migrare e di aggregarsi. Se questa aggregazione è irreversibile la funzionalità della membrana allo scongelamento non può essere ripristinata (Morris, 1987).

Nel caso di criocongelamento di spermatozoi, la degenerazione della membrana spermatica allo scongelamento è la principale causa della ridotta funzionalità di queste cellule (Stoss & Donaldson, 1982).

Il congelamento e lo scongelamento causano, in ogni modo, danno strutturale a tutti i tipi di organelli presenti negli spermatozoi. Il danno appare maggiore per i mitocondri e per la struttura 9+2 presente nel flagello. I mitocondri appaiono gonfi, mostrano vacuolizzazione e la maggior parte delle creste è scomparsa. Questi organelli sono fondamentali per soddisfare il fabbisogno energetico di movimento degli spermatozoi: la diminuzione dell'attività respiratoria e della glicolisi indotta porta a ridotti livelli di ATP e di conseguenza a perdita della motilità. Le fibre della struttura 9+2 appaiono molto meno distinte (Gwo et al., 1992).

Nel caso di ovociti ed embrioni il danno maggiore si ha a carico di strutture quali le gocce lipidiche citoplasmatiche e i microtubuli (Aman & Parks, 1994; Leibo et al., 1996; Martino et al., 1996a; Zenzes et al., 2001); mentre quest'ultimo danno è reversibile, il primo è sempre di natura irreversibile costituendo perciò una delle maggiori cause di morte cellulare.

Tecniche e strumenti

La velocità di raffreddamento e congelamento costituisce un fattore importante da calibrare nella messa a punto di un protocollo di criopreservazione: il congelamento quindi deve essere da una parte abbastanza rapido da impedire la totale disidratazione cellulare e dall'altra sufficientemente lento da impedire la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari (Leung, 1991).

Durante lo scongelamento le cellule congelate passano attraverso le stesse fasi precedentemente descritte, ma ovviamente l'ordine di queste risulta invertito. Il campione congelato comincia a fondere, l'acqua è trasportata attraverso le membrane cellulari verso l'esterno della cellula per le caratteristiche ipertoniche del mezzo in cui si trovano; proprio in questa fase, prima della completa fusione del campione, è possibile l'accrescimento dei cristalli di ghiaccio intracellulare. Per limitare i danni che si possono verificare nel passaggio dallo stato solido a quello liquido, è stato dimostrato, in numerosi esperimenti, che rapide velocità di scongelamento risultano generalmente migliori di quelle lente.

Inoltre diventa di fondamentale importanza ridurre il contenuto intracellulare di acqua al fine di minimizzare la formazione di ghiaccio nel citoplasma. A tal fine risulta fondamentale l'utilizzo degli agenti crioprotettivi.

Crioprotettivi

Le cellule devono essere preventivamente trattate con i crioprotettivi, sostanze in grado di bilanciare gli effetti del ghiaccio intracellulare e della soluzione concentrata esterna, e di abbassare la temperatura di nucleazione dell'acqua intracellulare.

In generale i crioprotettivi:

- permettono la formazione di cristalli di ghiaccio di piccole dimensioni, riducendo la loro velocità di nucleazione;
- favoriscono una più omogenea nucleazione dei cristalli;
- regolano la disidratazione cellulare.

I meccanismi implicati non sono ancora del tutto conosciuti, ma si pensa ad un'influenza di queste sostanze sulle proprietà chimico-fisiche del mezzo extracellulare piuttosto che ad un'azione diretta

sulla cellula.

I crioprotettivi sono classificati in base alla loro capacità di permeazione attraverso la membrana plasmatica.

I *crioprotettivi permeabili* sono in grado di:

- rimpiazzare, per osmolarità, l'acqua all'interno delle cellule;
- diminuire le differenze di pressione osmotica a cavallo della membrana, riducendo la quantità di acqua che diffonde dall'interno della cellula verso l'ambiente extracellulare;
- abbassare la temperatura di formazione dei cristalli di nucleazione;
- ridurre, in combinazione con velocità di congelamento basse e controllate, i cambiamenti del volume cellulare, minimizzando la formazione e le dimensioni di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula.

Quelli più comunemente usati sono:

- Dimetilsolfossido (DMSO) C_2H_6SO
- Glicerolo (GLOH) $C_3H_8O_3$
- Propilen glicole (PG) $C_3H_8O_2$
- Etilen glicole (EG) $C_2H_6O_2$
- Metanolo (METOH) CH_3OH .

Il glicerolo, il DMSO e il PG sono stati, fino all'ultimo decennio del secolo scorso, i crioprotettivi più comunemente utilizzati.

L'EG è stato utilizzato per la prima volta da Miyamoto & Ishibashi (1977); il suo peso molecolare (62,70Da), più basso rispetto ad altri rappresentati della sua categoria (92,10 il glicerolo, 76,10 il PG, 78,13 Da il DMSO), spiega la sua alta permeabilità e, conseguentemente, la sua maggiore versatilità di utilizzo (Bracke & Niemann, 1995).

I *crioprotettivi non permeabili* sono distinti in due gruppi principali a seconda della grandezza molecolare, in:

- crioprotettivi non permeabili a basso peso molecolare (glucosio, saccarosio, galattosio, trealosio e altri zuccheri)
- crioprotettivi non permeabili ad alto peso molecolare, maggiore di 50.000 Da (polivinilpirrolidone, polivinil alcool, amido idrossietilico, ialuronato di sodio e altri polimeri; proteine quali quelle antigelo estratte da pesci polari e da insetti resistenti al freddo).

L'azione protettiva dei crioprotettivi non permeabili a basso peso molecolare è dovuta alla capacità di indurre una disidratazione delle cellule prima del congelamento, che comporta la riduzione della formazione dei cristalli di ghiaccio. Data l'incapacità di penetrazione cellulare, sono impiegati insieme ai crioprotettivi permeabili. Un esempio è lo studio di Usuki et al. (1997), in cui spermatozoi di *Crassostrea gigas* sono stati criopreservati usando una soluzione contenente DMSO 8%, saccarosio 50 mM e glutatione ridotto.

I crioprotettivi non permeabili ad alto peso molecolare proteggono le cellule durante il congelamento/scongelo modificando la forma e la grandezza dei cristalli di ghiaccio in modo da renderli innocui.

Oltre a queste caratteristiche, alcuni crioprotettivi posseggono anche altre funzioni protettive nei confronti delle cellule durante il congelamento come, ad esempio, la capacità di stabilizzare le strutture intracellulari e le membrane.

Gli alcoli sono in grado di regolare la disidratazione e proteggere le strutture proteiche, mentre

alcuni disaccaridi stabilizzano la struttura delle membrane.

Studi condotti per stabilire l'esatta funzione di ogni crioprotettivo e come affrontare i problemi che derivano dal loro uso hanno invece mostrato che il glicerolo è uno scarso stabilizzatore delle strutture di membrana, e che, ad alte concentrazioni e temperature, può indurre la fusione (Womersley et al., 1986); una rapida rimozione del crioprotettivo allo scongelamento sembra possa evitare questo problema.

Le differenti proprietà dei vari crioprotettivi suggeriscono che ciascuno protegga le cellule contro i danni da congelamento in una maniera specifica e che la soluzione crioprotettiva più efficiente possa essere data da una combinazione appropriata di crioprotettivo, che però non è ancora stata individuata.

Tuttavia, i crioprotettivi possono essere tossici per le cellule: la tossicità di un crioprotettivo dipende non solo dalle sue caratteristiche chimiche (capacità di denaturare gli enzimi a temperatura ambiente) (Adam et al., 1995), ma anche dalla sua concentrazione, dalla durata del contatto crioprotettivo-cellula e dalla temperatura alla quale è sottoposto il sistema (Shalafer, 1981).

Ne deriva che un crioprotettivo per poter svolgere la propria funzione deve avere due caratteristiche essenziali: bassa tossicità ed elevata solubilità in acqua.

Il punto critico di un esperimento di criopreservazione è quindi la ricerca di un equilibrio tra l'efficienza del crioprotettivo e la tolleranza alla tossicità da parte della cellula da trattare (Chao & Liao, 2001). Infatti le soluzioni crioprotettive possono, in alcuni casi, offrire una tossicità maggiore della loro capacità di protezione, in altri casi, viceversa, proteggere in misura maggiore dello stesso grado di tossicità.

Seeding

È stato dimostrato che la formazione controllata del ghiaccio rappresenta un fattore chiave per la vitalità del materiale biologico dopo congelamento/scongelamento (Mazur P. 1984).

Anche se la temperatura di congelamento dell'acqua è 0°C, la formazione del ghiaccio può avvenire a temperatura ben al di sotto dello zero, e in condizioni molto controllate, l'acqua può addirittura essere raffreddata fino a -40°C prima che abbia inizio la nucleazione del ghiaccio.

La capacità di una soluzione acquosa di raffreddarsi al di sotto del proprio punto di congelamento senza cambiare stato, cioè senza passare dallo stato liquido a quello solido (ghiaccio) è definita *superaffreddamento*.

Tale fenomeno, nei processi di criopreservazione delle cellule e dei tessuti riproduttivi, si verifica molto spesso.

L'evidenza sperimentale ha portato a registrare per embrioni una bassa vitalità post-scongelamento a seguito dell'utilizzo di gradienti di congelamento caratterizzati da una temperatura di nucleazione del ghiaccio inferiore a -9°C, vitalità più bassa rispetto ai tassi ottenuti quando la nucleazione era stata effettuata a temperature di -5 e -7°C (Mazur, 1984).

Toccare la soluzione acquosa o l'acqua con un cristallo o con un oggetto metallico induce la sua cristallizzazione; questo processo viene anche definito "seeding" e viene generalmente utilizzato per ottenere un congelamento controllato manualmente. La cristallizzazione può essere indotta dalle particelle presenti nel medium o dalla vibrazione meccanica di superfici.

Durante un congelamento lento, i campioni sono solitamente raffreddati fino alla temperatura di -7°C, temperatura che viene mantenuta fino al raggiungimento dell'equilibrio termico, e

successivamente, toccando esternamente il contenitore criogenico contenente il campione, ad esempio, con delle pinze raffreddate in azoto liquido, si induce la formazione di ghiaccio. A questo punto la temperatura aumenta fino al punto di fusione della soluzione e, dopo la formazione di ghiaccio, ritorna, ad una velocità di 2.5°C/min a -7°C. Questo processo consente di ottenere la disidratazione cellulare, fondamentale per minimizzare i danni da freddo che dipendono dalla formazione dei cristalli di ghiaccio.

Vitrificazione

Nel caso di congelamento ultra-rapido le molecole d'acqua non hanno il tempo di formare i cristalli di ghiaccio; si assiste così alla formazione di una soluzione vitrea. Questo fenomeno prende il nome di vitrificazione. Viene effettuato aggiungendo al materiale biologico i crioprotettivi ad elevata concentrazione, inducendo la deidratazione in una soluzione concentrata e quindi immergendo i campioni direttamente in azoto liquido: i crioprotettivi, presenti in concentrazioni molto elevate, in seguito ad un rapidissimo abbassamento della temperatura, passano da uno stato liquido ad uno solido senza organizzarsi in una struttura cristallina, comportandosi così in maniera del tutto simile al vetro (Figura 3).

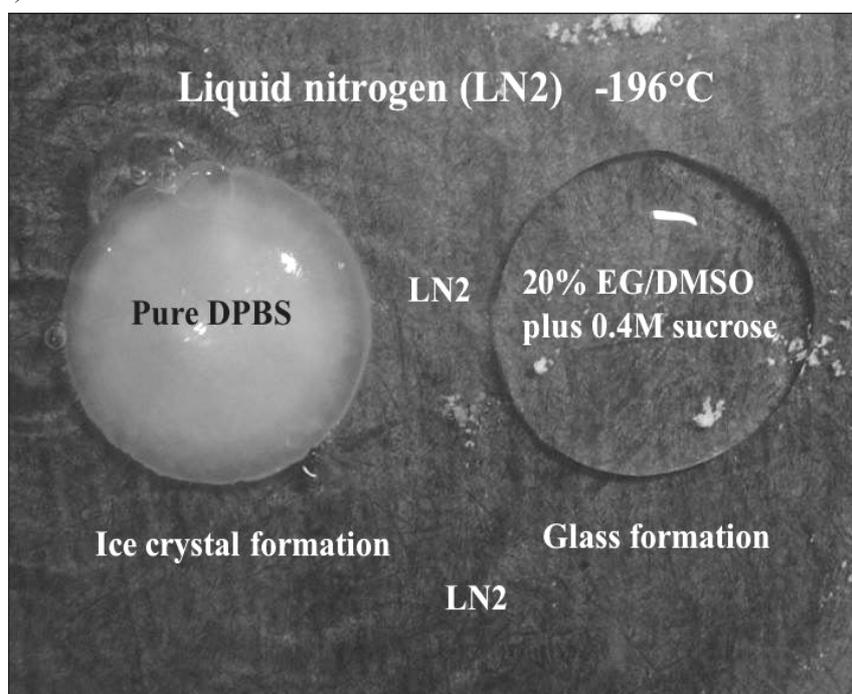


Figura 3. Differenza visiva tra congelamento con formazione di cristalli di ghiaccio (Pure DPBS) e vitrificazione (20% EG/DMSO plus 0,4M sucrose). (Da: Notiziario SIET 2007, http://www.sietitalia.it/2007_notiziario_SIET.pdf)

Per evitare un'eccessiva tossicità ed un'eccessiva disidratazione, per l'elevata concentrazione del CPA, è necessario aumentare la concentrazione di crioprotettivo gradualmente, in più passaggi, in modo tale che le cellule assumano una quantità di crioprotettivo sufficiente a proteggerle dai danni della disidratazione, senza subire, contemporaneamente, effetti tossici.

La vitrificazione è una pratica interamente manuale che richiede tempi brevi per la sua realizzazione e può risultare poco riproducibile dipendendo dalla manualità ed esperienza dell'operatore. Non richiede attrezzature specializzate o costose per controllare il processo di raffreddamento/congelamento.

Evitando tutti gli effetti negativi della formazione di ghiaccio intracellulare, tale tecnica costituisce

uno strumento potenzialmente molto utile per lo sviluppo di procedure di criopreservazione per tessuti complessi ed organi che sono ricalcitranti alle procedure convenzionali a causa della presenza di differenti tipi di cellule, ognuno con requisiti unici per disidratazione.

Tappe per l'allestimento di un protocollo di criopreservazione

L'allestimento di un protocollo di criopreservazione per un sistema biologico di una data specie è una sperimentazione complessa, di tipo multifattoriale e sequenziale progressiva, che richiede, in primo luogo, la conoscenza della fisiologia del sistema biologico e dei danni ad esso causati dall'esposizione alle basse temperature.

In generale quindi la ricerca per la messa a punto di un protocollo di criopreservazione prevede un piano sperimentale articolato nelle seguenti fasi:

1. acquisizione della conoscenza del sistema biologico, per la determinazione delle migliori condizioni di gestione a breve e medio termine (modalità di prelievo, trasporto, adattamento a differenti regimi termici, conservazione a breve termine);
2. selezione dell'agente crioprotettivo (tipologia e concentrazione) meno tossico, mediante la conduzione di saggi di tossicità dei crioprotettivi,
3. selezione del gradiente di adattamento/raffreddamento (A/R), per la fase di adattamento del sistema biologico al crioprotettivo
4. selezione della curva di congelamento fino all'immersione in azoto liquido (-196°C),
5. ottimizzazione delle fasi 3, 4 e 5.

Data la complessità delle procedure di criocongelamento e le differenze fisiologiche dei gameti ed embrioni di specie anche affini (Yankson et al, 1991) è evidente che ogni protocollo di crioconservazione è sistema- e specie-specifico: l'applicazione di metodi ottimizzati per una data specie a specie analoghe raramente ha portato a risultati soddisfacenti.

Fino ad oggi le tecniche di criopreservazione hanno dato maggiori successi nel trattamento di spermatozoi, in quanto la conservazione di uova ed embrioni presenta maggiori difficoltà, a causa di fattori strutturali e morfologici:

- le grandi dimensioni, con basso rapporto superficie/volume, fattore che rallenta il flusso dell'acqua e l'azione dei crioprotettivi;
- la presenza di più strati membranari semipermeabili che possono influenzare il flusso d'acqua e crioprotettivi (Hagedorn et al., 1997) ;
- la complessità strutturale degli embrioni, con diversi compartimenti caratterizzati da proprietà osmotiche differenti.

Tenuto conto di tali difficoltà, numerosi studi sono orientati verso la criopreservazione di blastomeri isolati da embrioni allo stadio di blastula (Maissé et al, 1998; Martino et al, 1996b).

Applicazioni delle tecniche di criopreservazione

Produzione animale

La crescente necessità di ottimizzare e differenziare le produzioni zootecniche ed agroalimentari ha portato il comparto della ricerca a sviluppare protocolli di potenziamento riproduttivo e di allevamento di nuove specie.

Tra le scienze biotecnologiche riproduttive, la criopreservazione costituisce uno strumento essenziale per contrastare l'impoverimento genetico delle specie allevate (Nicholas, 1996), indotto dal crescente utilizzo di incroci, ma anche da tecniche di inseminazione artificiale, superovulazione, produzione embrionale in vitro e trasferimento embrionale, introdotti per il potenziamento produttivo.

La criopreservazione permette campagne di incroci tra popolazioni e scambi internazionali di cellule germinali e lo stoccaggio di gameti di organismi geneticamente selezionati per la produzione, poi utilizzabili per campagne di fecondazione artificiale. Oggi, tecniche di criopreservazione per gameti di animali domestici sono ampiamente conosciute ed applicate commercialmente (Fahning & Garcia, 1992). Settori produttivi quali quello bovino e bufalino si avvalgono delle tecnologie criopreservative per migliorare le linee produttive.

Tra le innumerevoli applicazioni che essa fornisce vi sono:

- potenziale aumento dell'efficienza di allevamento di specie geneticamente perfezionate con tecniche di selezione e manipolazione genetica (Lubenz et al., 1997);
- supporto alle applicazioni dell'ingegneria genetica nell'allevamento, mediante il mantenimento di genotipi selvatici utilizzabili dai selezionatori come riferimenti genetici iniziali, permettendo un ritorno ai ceppi di partenza in caso di una eventuale selezione fortuita di un carattere indesiderato (Maissé et al., 1998) o in caso di disastri naturali o incidenti con improvvisi fenomeni di massiccio inquinamento ambientale o imprevista diffusione di patologie (Chao & Liao, 2001);
- disponibilità continua di gameti ed embrioni oltre le normali stagioni riproduttive e possibilità di superare il problema di asincronia di deposizione di gameti tra i sessi;
- facile accessibilità al seme che consente di sfruttare al meglio materiale genetico maschile senza dover tener conto della localizzazione del riproduttore;
- facilità ed economicità di trasporto di gameti ed embrioni anche su lunghe distanze.

Acquacoltura

Con una produzione mondiale di 50 milioni di tonnellate nel 2007, l'acquacoltura costituisce un importante settore produttivo, in continua espansione (ISMEA, 2010). Anche se il 50% delle produzioni riguarda la piscicoltura d'acqua dolce (con a livello europeo soprattutto salmonidi), settori quali la piscicoltura d'acqua di mare e la molluschicoltura hanno fatto registrare dal 2003 al 2007 incrementi produttivi (rispettivamente 39% e 14%). Le produzioni europee si caratterizzano per un'elevata tecnica ed un'attenzione sempre crescente per problematiche quali gestione delle acque, alimentazione artificiale, controllo della sincronizzazione delle deposizioni di uova, riproduzione artificiale, sterilizzazione dei pesci per tripliodizzazione, selezione genetica, vaccini, etc (Maissé, et al, 1998).

In questo quadro, il miglioramento genetico e la conservazione di linee genetiche pure costituiscono due esigenze attuali del settore. Inoltre vi è una richiesta di biotecnologie in grado di contrastare problemi quali bassi tassi di crescita, alta mortalità, diffusi frequenti di malattie, degradazione dell'ambiente, crescente richiesta da parte del mercato (Chao & Liao, 2001).

Per tutte queste problematiche la criopreservazione costituisce un valido strumento di contrasto a supporto delle attività degli allevatori.

Negli ultimi anni, in effetti, l'utilizzo di tale biotecnologia si sta lentamente espandendo anche alla produzione acquatica (Fabbrocini et al, 2000): la criopreservazione di spermatozoi è stata sperimentata con successo per molte specie ittiche e protocolli di criopreservazione su larga scala

sono stati testati per specie d'acqua dolce come *Oncorhynchus mykiss* (Cabrita et al, 2001; Lahnsteiner et al, 1997; Steinberg et al, 1995; Conget et al, 1994; Wheeler & Thorgaard, 1991), *Salmo trutta fario* (Lahnsteiner et al, 1996), *Salmo trutta lacustris* (Piironen, 2003), *Salvelinus alpinus* (Piironen, 2003; Richardson et al, 2000; Lahnsteiner et al, 1997), *Polyodon spathula* (Brown & Mims, 1999), *Silurus glanis* (Bart et al, 1998), *Lota lota maculosa* (Jensen et al, 2008), *Pangasius larnaudii* (Kwantong & Bart, 2006), *Rutilus rutilus* (Urbányi et al, 2006), *Abramis brama* (Urbányi et al, 2006), *Blicca bjoerkna* (Urbányi et al, 2006) e *Barbus barbus* L. (Urbányi et al, 2006) e marine, come *Sparus aurata* (Fabbrocini et al, 2000, Cabrita et al., 2005), *Dicentrarchus labrax* (Fauvel 1998; Sansone et al, 2002), *Scophthalmus maximus* (Chen et al, 2003; Chereguini et al., 2003), *Anguilla anguilla* (Asturiano et al., 2003), *A. japonica* (Tanaka et al., 2002), *Diplodus puntazzo* (Taddei et al., 2001), *Hippoglossus hippoglossus* (Babiak et al., 2006), *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson et al, 1999), *Macrozoarces americanus* (Yao et al, 2000), *Morone saxatilis* (He and Woods, 2003), *Pleuronectes americanus* (Rideout et al., 2003), *Epinephelus marginatus* (Cabrita et al., 2009), *E. malabaricus* (Gwo, 1993), *Gadus morhua* e *Melanogrammus aeglefinus* (Rideout et al., 2004).

Nell'ambito dei molluschi studi sulla messa a punto di protocolli di criopreservazione sono stati svolti per un numero limitato di specie, come *Crassostrea gigas* (Ieropoli et al, 2004; Bourgrier, 1986; Staeger, 1974; Yankson & Moyse, 1991; Smith et al, 2001; Van der Horst et al, 1985), *Crassostrea virginica* (Zell et al, 1979, Paniagua-Chavez & Tiersh, 2001), *Saccostrea cucullata* (Yankson & Moyse, 1991), *Crassostrea iredalei* (Yankson & Moyse, 1991), *Crassostrea tulipa* (Yankson & Moyse, 1991), *Pinctada fucata martensii* (Kawamoto et al, 2007; Narita et al, 2008), *Pinctada margaritifera* (Acosta-Salnon et al, 2007), *Mytilus galloprovincialis* (Di Matteo et al, 2009), *Haliotis diversicolor supertexta* (Gwo et al, 2002).

L'industria acquacolturale ed enti stanno iniziando ad utilizzare tale tecnologia per stoccare sperma di riproduttori ed allestire banche criogeniche di sperma di organismi selvatici per scambi internazionali di campioni (Chao & Liao, 2001).

Per ovociti ed embrioni, invece, lo studio di protocolli di criopreservazione è ancora in una fase iniziale e c'è ancora molto lavoro da fare affinché la pratica di criopreservazione di questi sistemi biologici possa diventare realmente applicativa (Chao & Liao, 2001).

Ambiente

La perdita di variabilità genetica nelle popolazioni selvatiche e la cattività ha aumentato la necessità della realizzazione di piani strategici al fine di assicurare la sopravvivenza delle specie. La criopreservazione degli embrioni e dei gameti, con la costituzione di banche criogeniche, consente di salvaguardare la biodiversità per garantire in futuro l'arricchimento o il ripristino di tipi genetici a rischio d'estinzione a causa dei danni indotti all'ecosistema da inquinamento eccessivo (Perrucci et al, 2003)

La diversità genetica all'interno di una specie, rappresentata ad esempio da razze animali e varietà vegetali, è fondamentale per il settore produttivo, poiché riduce il rischio di malattie e aumenta la capacità di adattamento a cambiamenti climatici e ambientali.

Per mantenere un alto livello di diversità genetica in una popolazione dovrebbe essere mantenuto un gran numero di riserve selvatiche, uno per ogni popolazione geneticamente differenziata. Tale soluzione non è realistica né per il costo né per il lavoro necessario. Così, la creazione di una banca di sperma criopreservato potrebbe fornire una soluzione alternativa per preservare i pool genetici

selvatici e quindi costituire uno strumento molto prezioso per la conservazione di specie a rischio di estinzione, poiché fornisce l'opportunità di preservare campioni rappresentativi e successivamente ricostruire il ceppo originario, popolazione o varietà (Martínez-Páramo et al, 2009).

I gameti stoccati in azoto liquido infatti possono poi essere utilizzati in campagne di ripopolamento mediante procedure di fecondazione in vitro.

Negli ultimi anni l'applicazione di tecniche di criopreservazione è stata estesa anche al germoplasma vegetale: l'efficacia di questa tecnica è stata dimostrata in prove di laboratorio su numerose specie portando a considerare lo stoccaggio in azoto liquido come l'unica tecnica attualmente disponibile in grado di assicurare una reale conservazione a lungo termine e affidabile in ogni situazione. Tale tecnica è indicata nel caso di alcuni semi recalcitranti, di specie che si propagano vegetativamente, di specie rare, minacciate o in pericolo di estinzione, così come di prodotti biotecnologici di alto livello come quelli costituiti dalle linee cellulari di estrazione farmaceutica, cloni selezionati o materiale geneticamente modificato (APAT, 2006; Engelmann, 2004; González-Benito, 1998; Harvenget et al., 2004, Hirano et al., 2005; Panis et al., 2001).

L'utilizzo di tale biotecnologia si sta quindi estendendo anche al settore agricolo, con l'istituzione di banche di semi e gemme vegetative per la conservazione delle risorse genetiche vegetali (Hirano et al, 2005; Popov et al, 2006; Ozden-Tokatli et al, 2010).

Ricerca di base

Anche la ricerca di base, infine, può usufruire dei vantaggi della criopreservazione: tale tecnica, ad esempio, consente il mantenimento in modo sicuro e poco dispendioso di linee genetiche modificate, il cui mantenimento tradizionale mediante allevamento per omozigosi richiederebbe notevoli risorse (Glenister & Thornton, 2000).

Gameti ed embrioni criopreservati inoltre possono essere utilizzati come bioindicatori in indagini ecotossicologiche (Chao & Liao, 2001): valutazioni degli effetti di contaminanti nelle acque del Mare del Nord condotti con larve veliger criopreservate dell'ostrica *Crassostrea gigas* e della vongola *Tapes philippinarum* hanno dimostrato che le larve criopreservate di vongola sono più sensibili ai contaminanti ed alla disponibilità di cibo rispetto alle larve di ostrica (McFadzen, 1992).

Lo stoccaggio in azoto liquido rende i sistemi biologici bioindicatori disponibili in qualsiasi periodo dell'anno (indipendentemente dalla stagionalità dei cicli riproduttivi) per l'esecuzione dei saggi ecotossicologici, con indubbio potenziamento dei controlli ambientali grazie alla possibilità di effettuare azioni di biomonitoraggio in continuo e con maggiore omogeneità di standard qualitativo, rendendo più affidabili e riproducibili i saggi (Benhra et al, 1997; Paredes & Bellas, 2010).

Campioni biologici criopreservati, quindi, possono essere utilizzati come sistemi sperimentali ed il loro utilizzo dovrà in futuro essere standardizzato.

La ricerca criobiologica presso il CRIAcq

Il “Centro interdipartimentale di ricerca per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura CRIAcq” dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, fin dalla sua istituzione nel 2000, ha avuto come missione programmatica la “*valorizzazione delle specie acquatiche autoctone mediterranee mediante una gestione responsabile delle risorse idrobiologiche e l'adozione di modelli produttivi per una acquacoltura eco-compatibile ed ecosostenibile in Campania*”.

L'attuazione di tale scopo è stata prefissata portando avanti ricerche di base ed applicate nel campo dell'acquacoltura, per la valorizzazione di specie autoctone, e della gestione delle risorse idrobiologiche, mediante lo studio e la progettazione di soluzioni tecnologiche volte a minimizzare gli effetti derivanti dal prelievo dell'acqua, dallo scarico degli effluenti, nonché la valutazione del rischio da contaminazione chimica mediante la conduzione di saggi ecotossicologici.

Il gruppo di lavoro del Laboratorio di Fisiologia Ambientale e degli Organismi Acquatici & Laboratorio di Criobiologia, presso il Dipartimento delle Scienze Biologiche dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, ed afferente al CRIAcq, è da tempo impegnato nello studio della fisiologia di gameti ed embrioni di organismi acquatici e nella messa a punto di protocolli di congelamento specie-specifici per spermatozoi ed embrioni di pesci e molluschi di specie marine di notevole interesse economico, con una particolare attenzione per specie autoctone mediterranee. L'obiettivo di tale linea di ricerca è la creazione di un "portfolio" di protocolli criobiologici per la costituzione di criobanche per applicazioni nei vari settori di interesse (difesa della biodiversità, acquacoltura, supporto all'ingegneria genetica, applicazioni ecotossicologiche) (Sansone et al., 2006). Le specie prese in esame nel corso degli anni sono state numerose: *Sparus aurata* (spermatozoi), *Dicentrarchus labrax* (spermatozoi), *Puntazzo puntazzo* (spermatozoi), *Crassostrea gigas* (spermatozoi, ovociti ed embrioni), *Mytilus galloprovincialis* (spermatozoi ed embrioni), *Ostrea edulis* (spermatozoi), *Pecten jacobaeus* (spermatozoi), *Ciona intestinalis* (spermatozoi), *Paracentrotus lividus* (spermatozoi), *Sphaerechinus granularis* (spermatozoi). Numerosi risultati sono stati raggiunti per alcuni dei sistemi biologici studiati (Fabbrocini et al., 2000; Sansone et al., 2002; Ieropoli et al., 2004; Di Matteo et al., 2009).

Sulla base delle considerazioni presentate relativamente alle applicazioni criobiologiche, ed in considerazione della missione e degli obiettivi del CRIAcq, il presente progetto di tesi di dottorato ha voluto affrontare lo studio criobiologico in differenti campi applicativi, tentando di offrire un contributo per le produzioni autoctone emergenti, per la gestione delle risorse idrobiologiche e per il controllo degli ecosistemi acquatici.

Capitolo II

Scopo della tesi & Piano sperimentale

Scopo del lavoro

Tale lavoro sperimentale è stato finalizzato alle applicazioni della criopreservazione in ambito acquatico, per la messa a punto di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone mediterranee emergenti per il settore acquacolturale, per la validazione delle produzioni in sistemi a ricircolazione idrica (RAS) mediante l'utilizzo di protocolli già standardizzati, e per l'impiego di sistemi criopreservati in biosaggi innovativi per il monitoraggio ambientale.

Piano sperimentale

Il progetto di ricerca è stato sviluppato in tre fasi sperimentali, che hanno riguardato differenti tipologie di ricerca:

- Fase A. Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone emergenti per l'acquacoltura.

Tale fase ha avuto come oggetto di studio spermatozoi di *Pagellus erythrinus*, *Pecten jacobaeus* e *Paracentrotus lividus*, sistemi biologici per i quali protocolli di criopreservazione non sono stati ancora individuati, e l'ottimizzazione della gestione del seme di *Ostrea edulis*. Per ognuno di tali sistemi biologici la sperimentazione è stata svolta secondo la classica articolazione dello studio criobiologico per la messa a punto di un protocollo di criopreservazione: acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico, selezione degli agenti crioprotettivi meno tossici, selezione dei gradienti di adattamento/raffreddamento e congelamento, ottimizzazione del protocollo.

- Fase B. Validazione della qualità dei gameti prodotti in sistemi RAS (Recirculating Aquaculture Systems) mediante l'applicazione di protocolli di criopreservazione standardizzati.

La validazione delle produzioni in RAS è stata effettuata mediante la verifica della risposta alla criopreservazione dei gameti e degli embrioni di quattro specie di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* e *Pecten jacobaeus*) allevati e/o stabulati presso l'impianto RAS della Stazione Sperimentale CRIAcq di Salerno, sistemi biologici per i quali protocolli di criopreservazione sono stati previamente standardizzati.

- Fase C. Progettazione di biosaggi innovativi con sistemi criopreservati.

Questa fase sperimentale ha richiesto un preliminare studio bibliografico per la scelta del sistema biologico da utilizzare; hanno fatto quindi seguito prove preliminari per acquisire conoscenze sul sistema biologico criopreservato necessarie per la progettazione del biosaggio. Infine, il protocollo sperimentale messo a punto con spermatozoi di *Sparus aurata* è stato applicato esponendo il sistema sia fresco che criopreservato e scongelato a singoli xenobiotici di riferimento.

Valutazioni della qualità dei sistemi biologici nelle tre fasi sperimentali

Spermatozoi

La valutazione qualitativa degli spermatozoi dei teleostei, molluschi ed echinodermi qui presi in considerazione è stata effettuata analizzando la motilità spermatica, espressa in classi (da 0 a 5), in base alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (RVL), secondo la

correlazione proposta da Fabbrocini et al. (2000) e riportata in Tabella I.

% spermatozoi RVL	0	5	10	15	20	30	50	65	80	90	100
Classe di motilità	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5

Tabella I. Classi di motilità in relazione alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (da Fabbrocini et al., 2000)

Mediante l'utilizzo di un sistema d'acquisizione immagini collegato al microscopio, per ogni campione di spermatozoi analizzato è stato acquisito un breve filmato, creando, in questo modo, un archivio video di tutti i campioni spermatici analizzati. Le immagini videoregistrate di ciascun esperimento sono state analizzate da tre operatori addestrati con osservazioni indipendenti.

L'analisi delle caratteristiche di motilità degli spermatozoi è stata condotta analizzando differenti parametri della motilità spermatica:

1. *tempo di attivazione*: comportamento del seme nei primi minuti post-attivazione, registrando il raggiungimento della massima classe di motilità;
2. *massima classe di motilità raggiunta*: massima classe di motilità spermatica;
3. *durata della massima motilità spermatica*: arco temporale durante il quale il seme mostra una motilità \geq a classe 3 (arco di classe 3);
4. *durata totale della motilità*: monitoraggio dell'andamento della motilità spermatica dall'attivazione fino alla perdita di motilità (raggiungimento classe 0);
5. *capacità di attivazione nel tempo*: effetto della conservazione in differenti condizioni sperimentali sulla qualità del seme.

La valutazione della motilità spermatica costituisce un valido strumento per stimare la qualità degli spermatozoi: in molte specie di teleostei, infatti, è stata osservata una correlazione tra la motilità e la capacità fecondante degli spermatozoi (Chao & Liao, 2001; Urbányi et al, 2006); la valutazione visual della motilità spermatica, inoltre, rimane il parametro più diffuso per la stima della vitalità degli spermatozoi di invertebrati marini (Gwo, 2000).

La disponibilità di ovociti, registrata durante tutta la sperimentazione soltanto nel caso dei molluschi bivalvi *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas* e dell'echinoderma *Paracentrotus lividus*, ha permesso di effettuare per gli spermatozoi di tali specie delle prove di fecondazione artificiale per valutarne la capacità fecondante.

E' stata inoltre valutata la percentuale di corretto sviluppo embrionale (a larva D per i bivalvi, a pluteo per il riccio di mare) degli embrioni ottenuti dalle procedure di fecondazione.

Ovociti

I criteri di valutazione della qualità degli ovociti si basano sulla loro analisi morfologica, nonché sui tassi di fecondazione e sviluppo a larve normoformate degli embrioni ottenuti dalle procedure di fecondazione. In particolare, l'omogeneità per forma e dimensione e la distinzione di nucleo e nucleolo all'osservazione al microscopio (obiettivo 10x) costituiscono buoni indici della qualità degli ovociti, soprattutto nella fase di selezione dei batch di uova durante la scelta delle sospensioni da utilizzare per le sperimentazioni.

Embrioni

La valutazione qualitativa degli embrioni di molluschi bivalvi ed echinodermi si basa principalmente sullo sviluppo a stadi larvali normoformati; in casi specifici in cui gli stadi embrionali sono caratterizzati da movimento proprio, come le trocofore di molluschi bivalvi, la

qualità embrionale viene stimata anche sulla base della percentuale di embrioni mobili.

Valutazione del tasso di fecondazione

I protocolli di fecondazione utilizzati per le differenti specie analizzate hanno previsto l'aggiunta di piccole quantità di soluzioni di seme attivato in aliquote di sospensioni di ovociti, definendo come rapporto ottimale uova:spermatozoi 1:10, valutato mediante osservazione al microscopio (10X-20X) verificando il numero di spermatozoi presenti attorno ad ogni singola cellula e, in base al risultato ottenuto, provvedendo ad aggiunte di ulteriori aliquote di soluzione spermatica, nel caso in cui il numero fosse minore di 10, oppure a diluizioni con acqua di mare se il numero di spermatozoi risultasse essere maggiore di 10, per evitare fenomeni di polispermia (His et al., 1997).

La valutazione del tasso di fecondazione è stata effettuata pochi minuti dopo l'aggiunta degli spermatozoi alla soluzione di ovociti, mediante la verifica del sollevamento della membrana di fecondazione (His et al, 1999) (Figura 4).

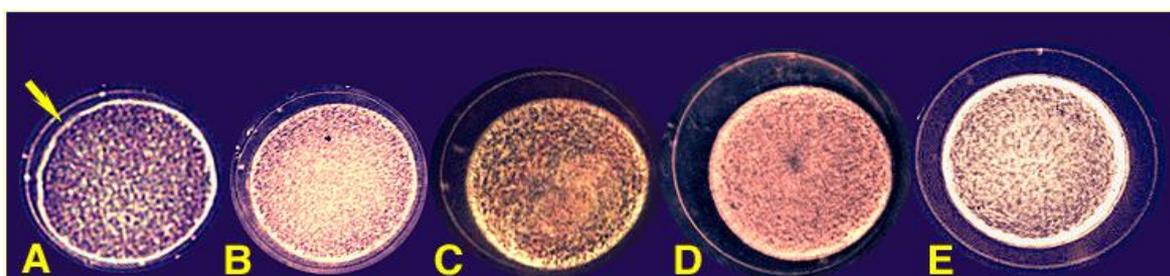


Figura 4. Sollevamento della membrana di fecondazione in uovo fecondato di *Paracentrotus lividus* (da <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/oursinMDC/soulevmb.html>)

In alternativa, la valutazione è stata effettuata verificando la percentuale di emissione del globulo polare 15-20 minuti dall'aggiunta degli spermatozoi.

Valutazione del tasso di sviluppo embrionale

A seguito dell'incubazione degli embrioni alle più opportune condizioni per ogni specie, le larve sono state fissate mediante aggiunta di formalina al 40% e campioni random di 100 larve sono stati osservati al microscopio per registrare la presenza di stadi larvali normoformati, in base a simmetria, forma, dimensione.

Per la valutazione sono state utilizzate come riferimento le classificazioni riportate da His et al, 1999 (Figure 5 e 6).

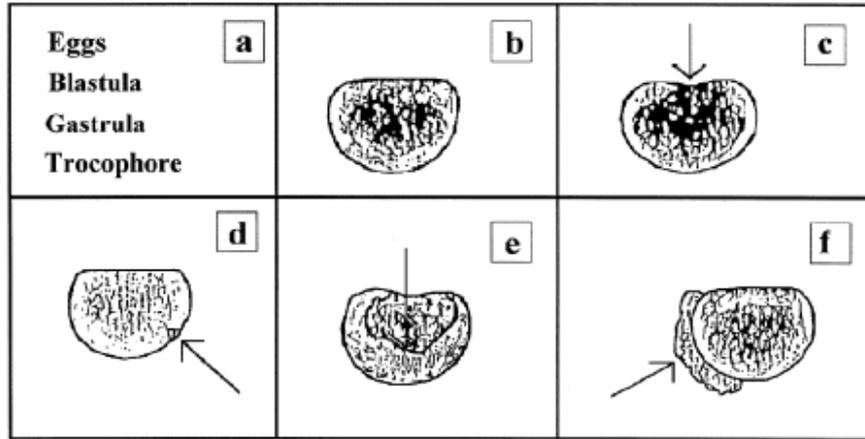


Figura 5. Da His et al, 1999. Differenti anomalie in larve D di *Crassostrea gigas* in accordo, rispettivamente, con His et al. (1997): (a) uova non segmentate, blastule normali o anormali, gastrule e trocofore, (b) larve normali, (c) convessità cardinale, (d) margine della conchiglia danneggiato, (e) conchiglia incompleta, (f) mantello estruso.

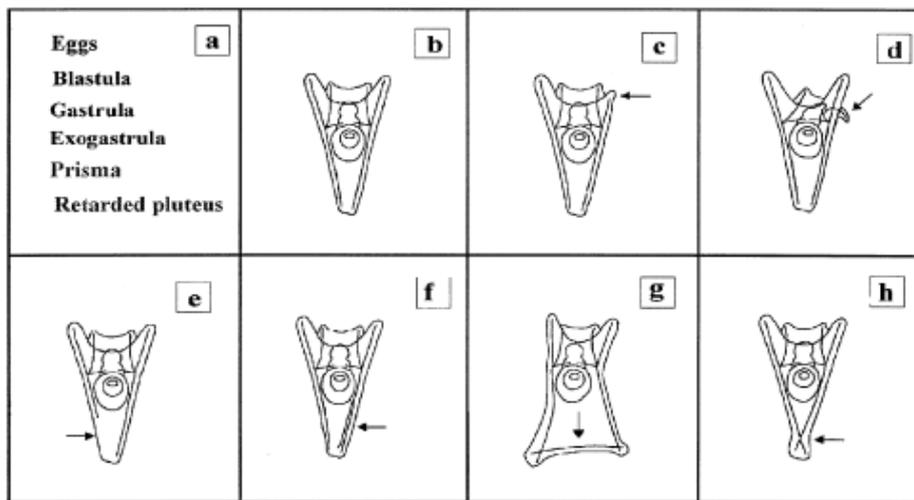


Figura 6. Da His et al, 1999. Differenti anomalie in plutei di *Paracentrotus lividus* in accordo con Klöckner et al. (1985): (a) vari stadi di sviluppo deformati o ritardati da uova a plutei a due braccia, (b) plutei normali, (c) braccia post-orali di lunghezza diversa, (d) asta orale ruotata a destra, (e) mancanza di porzioni dell'asta destra del corpo, (f) asta sinistra del corpo raddoppiata, (g) sta del corpo addizionale posta trasversalmente, (h) asta del corpo incrociata apicalmente.

Capitolo III

Materiali e Metodi

Fase A. Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone emergenti per l'acquacoltura

Pagellus erythrinus

Animali

Per la sperimentazione è stato utilizzato seme di riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media 23 cm), stabulati presso l'azienda agricola Panittica Pugliese (Torre Canne, BR) e sottoposti a condizionamento con fotoperiodo naturale e temperatura corrispondente a quella stagionale.

Ottenimento seme

Il seme è stato prelevato previa anestesia (con 200 ppm fenossietanolo) per stripping addominale e tenuto a secco.

Trasporto del seme

Il trasporto del seme alla sede di sperimentazione è stato effettuato entro 6 ore dal prelievo, mantenendo il materiale biologico a secco, in ambiente isolato, ad una temperatura di $3\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Modalità di attivazione del seme

La sospensione di spermatozoi attivati è stata ottenuta miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata (0,22 μm , 36‰, pH 8,1), con un rapporto di diluizione di 1:100.

Formazione dei pool di spermatozoi

Per tutte le fasi della sperimentazione sono stati utilizzati pools costituiti da spermatozoi con classe di motilità maggiore di 3. Campioni di spermatozoi caratterizzati da una minore motilità spermatica sono stati scartati.

Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico

Analisi del pattern di motilità del seme fresco

Alla costituzione del pool di seme secco, un'aliquota è stata attivata, mantenuta a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ e ne è stato valutato l'andamento della motilità spermatica nel tempo, determinando i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

Capacità di attivazione nel tempo di seme mantenuto a differenti regimi termici e sottoposto a diverse modalità di stoccaggio

Il seme secco è stato suddiviso in aliquote che sono state mantenute inattive a differenti condizioni sperimentali per 24 ore:

- a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ a secco
- a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ diluito 1:6 in una soluzione di NaCl 1% (V/V), inibitrice della motilità spermatica
- a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ a secco

- a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ diluito 1:6 in una soluzione di NaCl 1%, inibitrice della motilità spermatica.

Al termine delle 24 ore, il seme è stato attivato (diluizione finale 1:100 sia per il seme secco, sia per il seme diluito in NaCl 1%) e mantenuto a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ed è stato monitorato l'andamento della motilità spermatica, registrando i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

Selezione degli agenti crioprotettivi

Aliquote di spermatozoi inattive sono state diluite 1:6 in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di crioprotettivi. Le concentrazioni finali (V/V) testate sono state le seguenti:

- DMSO: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- EG: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- PG: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- GIOH: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- MetOH 4%, 8%.

L'incubazione è stata condotta alla temperatura di $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ e dopo tempi di esposizione di 10, 20 e 30 minuti aliquote di seme trattato sono state attivate per valutarne la massima classe di motilità raggiunta.

Come controllo sono stati considerati spermatozoi incubati in NaCl 1% in assenza di crioprotettivi alla stessa temperatura di incubazione.

Per le fasi sperimentali successive sono state selezionate le concentrazioni che hanno fatto registrare le minori perdite di motilità spermatica rispetto al controllo.

Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento

Aliquote di spermatozoi inattivi, addizionati con soluzioni di NaCl 1% contenenti i crioprotettivi selezionati nella fase precedente, sono stati sottoposti a due differenti tipologie di Adattamento/Raffreddamento:

- A/R n.1: 15 minuti a 2°C
- A/R n.2 da 18°C a 2°C con un gradiente di raffreddamento di $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Gli spermatozoi sottoposti ai due tipi di adattamento/raffreddamento sono stati poi attivati mediante diluizione (finale 1:100) per valutarne la massima classe di motilità raggiunta.

Selezione della curva di congelamento

Spermatozoi inattivi, addizionati con soluzioni di NaCl 1% contenenti i crioprotettivi selezionati, ed adattati e raffreddati secondo la modalità selezionata nella fase sperimentale precedente, sono stati sottoposti a due differenti gradienti di congelamento, riportati in Figura 7, selezionati tra i gradienti utilizzati per spermatozoi di altre specie di Teleostei marini (Fabbrocini et al, 2000, Sansone et al, 2002):

- C n.1: gradiente di $-3,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino a -70°C
- C n.2: gradiente di $-23,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino a -90°C .

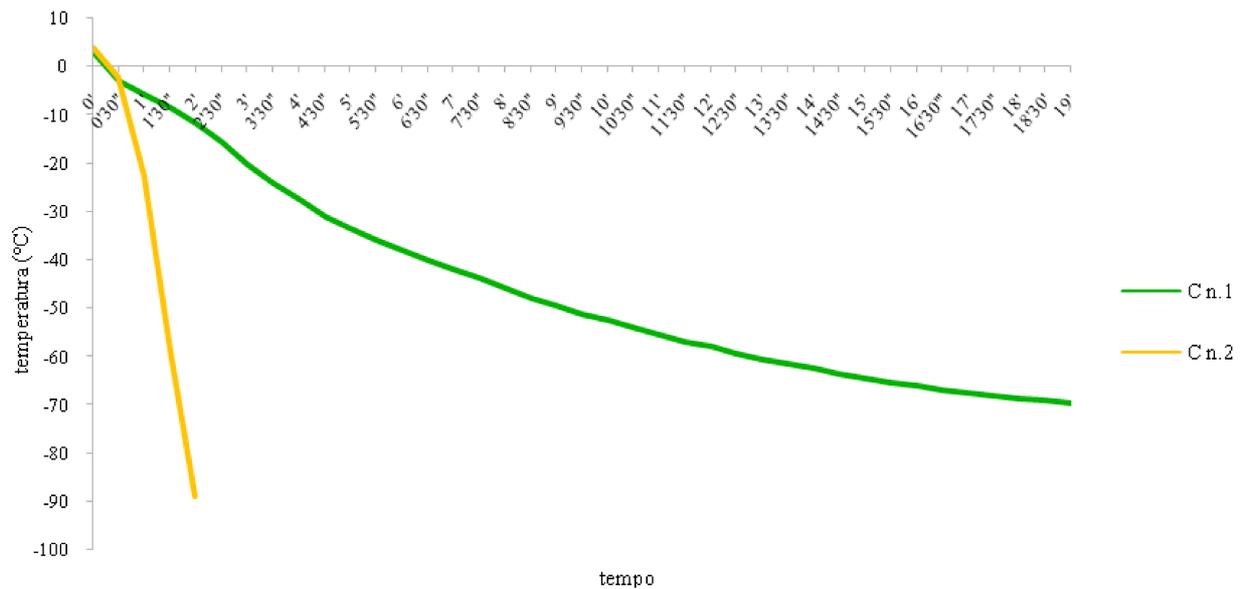


Figura 7. Gradienti di congelamento testati.

Al raggiungimento delle temperature indicate, le paillettes sono state immerse in azoto liquido.

Scongelamento

Gli spermatozoi sono stati scongelati con un gradiente di 15°C/sec e sono stati quindi attivati mediante diluizione (finale 1:100) per valutarne la massima classe di motilità raggiunta.

Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati

Gli spermatozoi che allo scongelamento hanno mostrato differenze risultate statisticamente non significative dai rispettivi controlli post-adattamento ($p > 0,05$) sono stati mantenuti per 20 minuti a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ per valutarne l'andamento nel tempo della motilità.

Pecten jacobaeus

Animali

Tutte le sperimentazioni sono state eseguite su spermatozoi ottenuti da individui adulti maturi di *Pecten jacobaeus* prelevati all'arrivo dei pescherecci al porto di Chioggia (Adriatico settentrionale). Il trasporto degli animali fino alla sede di ricerca è stato effettuato a secco, in ambiente isolato (camera di polistirolo), mantenuto ad una temperatura di 5°C mediante l'uso di ghiaccio.

Gli animali venivano inseriti in reti a maglie larghe e posizionati in modo che la valva convessa fosse posizionata verso il basso e le due valve restassero accollate il più possibile per trattenere l'acqua all'interno permettendo all'animale di sopravvivere durante il trasporto.

Ottenimento seme

Il seme è stato ottenuto mediante prelievo bioptico introducendo una pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale. Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di 35 μ m per allontanare residui di tessuto gonadale.

Il prelievo bioptico delle uova, utili per verificare la capacità fecondante degli spermatozoi, non ha fornito in alcun caso uova abili alla fecondazione.

Prove di emissione gametica

Al fine di recuperare uova sono state effettuate prove di emissione gametica controllata:

- 200 μ l di soluzione 10⁻⁴ di 5-HT (Serotonina) sono stati iniettati all'interno delle gonadi, in accordo con il protocollo riportato da Wang & Croll, 2006; gli esemplari così trattati sono stati posizionati in contenitori separati con 300 mL di acqua di mare filtrata (salinità 36‰, temperatura 15°C). Come controllo sono stati considerati animali cui è stata iniettata una soluzione senza serotonina.
- Un gruppo di organismi è stato posizionato in acqua di mare filtrata (salinità 36‰, temperatura 15°C) e sottoposto a cicli alternati a 18°C e 28°C di 30 minuti ciascuno. Come controllo sono stati considerati animali posizionati in acqua di mare ma non sottoposti allo shock termico.

Modalità di attivazione del seme

La sospensione di spermatozoi attivati è stata ottenuta miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata (0,22 μ m, 36‰, pH 8,1), con un rapporto di diluizione di 1:100.

Formazione dei pool di spermatozoi

Per tutte le fasi della sperimentazione sono stati utilizzati pools costituiti da spermatozoi con classe di motilità maggiore di 3. Campioni di spermatozoi caratterizzati da una minore motilità spermatica sono stati scartati.

Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico

Analisi del pattern di motilità del seme fresco

Alla costituzione del pool di seme secco, un'aliquota è stata attivata, mantenuta a 18 \pm 1°C e ne è stato valutato l'andamento della motilità spermatica nel tempo, determinando i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici

Il seme secco è stato suddiviso in aliquote che sono state mantenute inattive a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) per 20 minuti. In seguito il seme è stato attivato e mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$, monitorando l'andamento della motilità spermatica nel tempo ed i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

Selezione degli agenti crioprotettivi

Aliquote di spermatozoi inattive sono state diluite 1:100 in soluzioni di acqua di mare contenenti concentrazioni crescenti di agenti crioprotettivi. Le concentrazioni finali (V/V) testate sono state:

- DMSO: 5%, 7%, 10%, 15%
- EG: 5%, 7%, 10%, 15%
- PG: 5%, 7%, 10%, 15%
- GIOH: 5%, 10%
- MetOH 4%, 6%, 8%.

L'incubazione è stata condotta alla temperatura di $10\pm 1^\circ\text{C}$ e dopo tempi di esposizione di 30 e 60 minuti aliquote di seme trattato sono state attivate per valutarne la classe di motilità.

Come controllo sono stati considerati spermatozoi incubati in acqua di mare in assenza di crioprotettivi alla stessa temperatura di incubazione.

Per le fasi sperimentali successive sono state selezionate le concentrazioni che hanno fatto registrare le minori perdite di motilità spermatica rispetto al controllo.

Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento

Aliquote di spermatozoi inattivi sono state diluite con acqua di mare monitorandone l'attivazione; quando gli spermatozoi hanno raggiunto valori di motilità superiori a classe 2,5 sono stati addizionati i crioprotettivi selezionati della fase precedente, sono stati sottoposti a due differenti curve di Adattamento/Raffreddamento:

- A/R n. 1: (10' a $10\pm 1^\circ\text{C}$)
- A/R n. 2: (10' a $3\pm 1^\circ\text{C}$).

Gli spermatozoi sottoposti ai due gradienti di adattamento/raffreddamento sono stati poi osservati al microscopio per valutarne la classe di motilità.

Selezione della curva di congelamento

Spermatozoi inattivi, addizionati con acqua di mare contenente i crioprotettivi selezionati ed adattati e raffreddati secondo la modalità selezionata nella fase sperimentale precedente, sono stati sottoposti a differenti gradienti di congelamento, fino a -70°C , riportati in Figura 8:

- C n.1: $-7,5^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.2: $-10^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.3: $-15^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.4: $-20^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.5: $-25^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.6: $-30^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.7: $-40^\circ\text{C}/\text{min}$.

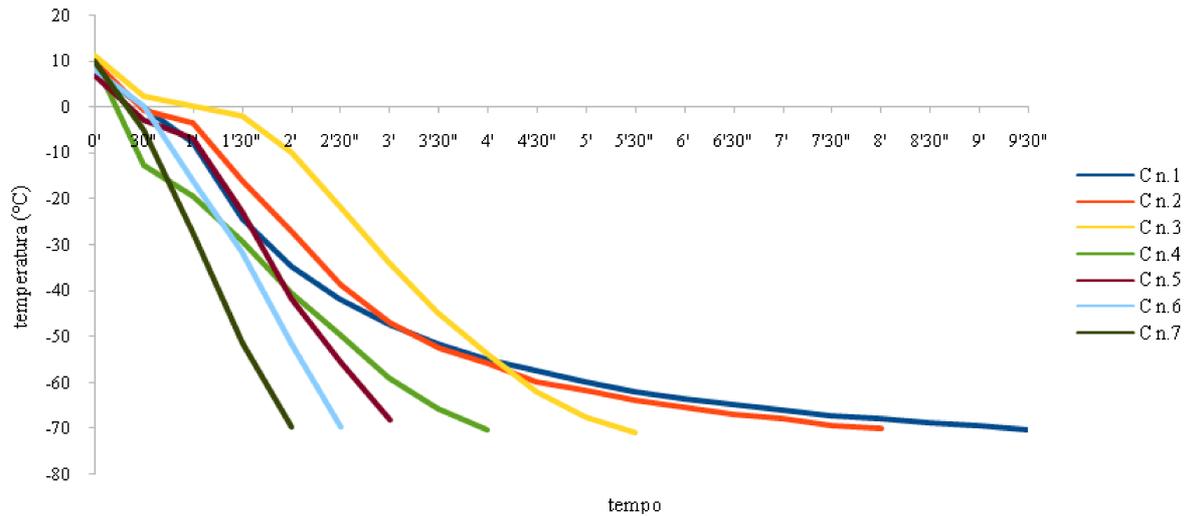


Figura 8. Gradienti di congelamento testati.

Al raggiungimento della temperatura indicata, le paillettes contenenti gli spermatozoi sono state immerse in azoto liquido.

Scongelamento

Gli spermatozoi sono stati scongelati con un gradiente di $15^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ed analizzati per valutarne la classe di motilità.

Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati

Gli spermatozoi scongelati sono stati mantenuti a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$, monitorandone la motilità spermatica per 60 minuti dopo lo scongelamento.

Paracentrotus lividus

Animali

Per la sperimentazione sono stati utilizzati spermatozoi di *Paracentrotus lividus* ottenuti da individui adulti maturi provenienti dalle acque del Golfo di Napoli e stabulati presso il Settore Allevamento Organismi Marini per la Ricerca della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli.

Ottenimento seme ed uova

L'emissione gametica è stata indotta mediante scuotimento vigoroso degli animali oppure per shock osmotico, mediante iniezione di 1 mL di cloruro di potassio (KCl) 0,5 M attraverso la membrana peristomale.

I gameti raccolti da ogni organismo sono stati mantenuti separati.

Modalità di attivazione del seme

La sospensione di spermatozoi attivati è stata ottenuta miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata sterilizzata (0,22 µm, 38‰, pH 8,02, 18°C).

Formazione dei pool di spermatozoi

Per tutte le fasi della sperimentazione sono stati utilizzati pools costituiti da spermatozoi con classe di motilità maggiore di 3. Campioni di spermatozoi caratterizzati da una minore motilità spermatica sono stati scartati.

Formazione del pool di ovociti

Il pool di ovociti, utilizzato per verificare la capacità fecondante degli spermatozoi durante tutte le fasi della sperimentazione, è stato costituito unendo i campioni di uova caratterizzati da morfologia regolare e percentuali di ovociti anormali inferiori al 10%.

Una aliquota del pool di ovociti così costituito è stata diluita con acqua di mare filtrata fino ad ottenere una soluzione con densità 20 uova/mL. Gli ovociti sono stati mantenuti in sospensione mediante l'utilizzo di una leggera aerazione dell'acqua, che ha permesso di mantenere una densità omogenea di ovociti in tutta la sospensione.

Protocollo di fecondazione

Il protocollo di fecondazione utilizzato ha previsto l'aggiunta di 50 µL di seme attivato in 20 mL di sospensione di uova a densità 20 uova/mL. La quantità di soluzione spermatica da utilizzare tuttavia è dipesa dalla densità del pool di spermatozoi, derivante, a sua volta, della densità dei campioni di sperma ottenuti da ogni maschio: se infatti la sospensione è risultata diluita la quantità di soluzione spermatica utilizzata per la fecondazione è stata proporzionalmente aumentata.

Protocollo di sviluppo embrionale

Gli zigoti ottenuti sono stati successivamente diluiti fino ad ottenere una densità finale di 4 embrioni/mL ed incubati a 18-20°C per 48-50h.

Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico

Analisi del pattern di motilità del seme fresco

Alla costituzione del pool di seme secco, un'aliquota è stata attivata, mantenuta a $18\pm 1^\circ\text{C}$ e ne è stato valutato l'andamento della motilità spermatica nel tempo, determinando i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici

Il seme secco è stato suddiviso in aliquote che sono state mantenute inattive a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) per 3 ore. In seguito il seme è stato attivato e mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$, monitorandone l'andamento della motilità spermatica, e registrando i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità. Il seme attivato è stato anche utilizzato in prove di fecondazione per valutarne la capacità fecondante e la successiva percentuale di sviluppo a plutei normoformati degli zigoti ottenuti dalle procedure di fecondazione.

Selezione degli agenti crioprotettivi

Al fine di valutare l'effetto sulla fecondazione del crioprotettivo immesso nell'ambiente di fecondazione insieme al seme (precedentemente trattato con il crioprotettivo) è stata effettuata una prova preliminare di fecondazione in presenza della massima concentrazione di crioprotettivo derivante dall'aggiunta del seme trattato con esso (per test ecotossicologico o per il congelamento). Tale prova è stata messa a punto considerando la più elevata concentrazione di crioprotettivo solitamente testata per gli spermatozoi, cioè 20%. Sono state perciò determinate le percentuali di fecondazione e corretto sviluppo a larva pluteo normoformata ottenute in presenza nell'ambiente di fecondazione e sviluppo dei crioprotettivi da testare (Tabella II).

Concentrazione finale massima di crioprotettivo cui sono esposti gli spermatozoi nelle prove di tossicità	Concentrazione corrispondente finale di crioprotettivo nell'ambiente di fecondazione	Concentrazione corrispondente finale di crioprotettivo nell'ambiente di sviluppo
20,00%	0,05%	0,01%

Tabella II. Concentrazioni finali massime di crioprotettivo nelle differenti fasi sperimentali.

È stato quindi valutato il grado di tossicità dei crioprotettivi in funzione della loro concentrazione e del tempo di esposizione alla temperatura di $18\pm 1^\circ\text{C}$: aliquote di seme sono state addizionate con acqua di mare contenente concentrazioni crescenti di crioprotettivi. Le concentrazioni finali (V/V) testate sono le seguenti:

- DMSO: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- EG: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- PG: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- GIOH: 5%, 7%, 10%, 15%, 20%
- MetOH 4%, 8%.

Dopo tempi di esposizione di 10, 20 e 30 minuti è stato valutato l'effetto di ciascuna concentrazione dei crioprotettivi testati sulla motilità (classe) e sulla capacità fecondante degli spermatozoi. Gli

zigoti ottenuti sono stati incubati per determinare la percentuale di sviluppo a plutei normoformati. Come controllo sono stati considerati spermatozoi incubati in acqua di mare in assenza di crioprotettivi alla stessa temperatura di incubazione ($18\pm 1^\circ\text{C}$). Per le fasi sperimentali successive sono state selezionate le concentrazioni che hanno fatto registrare le minori perdite di motilità spermatica rispetto al controllo.

Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento

Spermatozoi inattivi, addizionati con acqua di mare contenente i crioprotettivi selezionati della fase precedente sono stati sottoposti a due differenti tipologie di Adattamento/Raffreddamento:

- A/R n. 1: (10' a $10\pm 1^\circ\text{C}$)
- A/R n. 2: (10' a $18\pm 1^\circ\text{C}$)

Gli spermatozoi sono stati poi osservati al microscopio per valutarne la classe di motilità e sono stati utilizzati in prove di fecondazione per valutarne la capacità fecondante e lo sviluppo a plutei normoformati degli embrioni derivanti.

Selezione della curva di congelamento

Il seme secco, addizionato con acqua di mare contenente i crioprotettivi selezionati ed adattato/raffreddato secondo la modalità selezionata nella fase sperimentale precedente è stato sottoposto a differenti gradienti di congelamento, fino a -70°C , riportati in Figura 9:

- C n.1: $-6,5^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.2: $-12^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.3: $-17^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.4: $-20^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.5: $-23^\circ\text{C}/\text{min}$
- C n.6: $-50^\circ\text{C}/\text{min}$

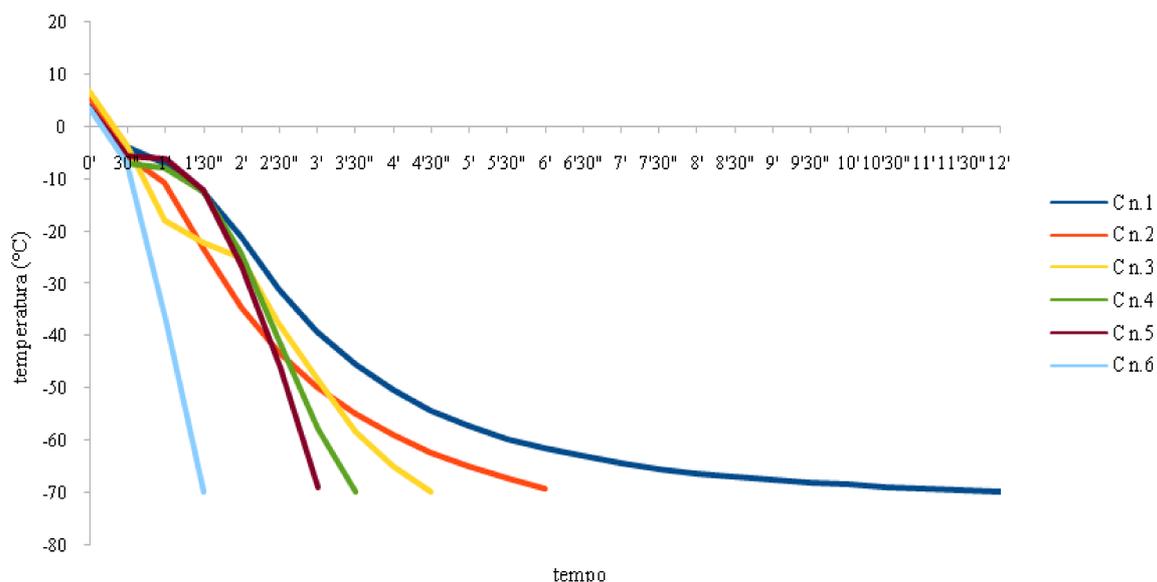


Figura 9. Gradienti di congelamento testati.

Al raggiungimento dei -70°C , le paillettes sono state immerse in azoto liquido.

Scongelamento

Gli spermatozoi sono stati scongelati con un gradiente di 15°C/s ed analizzati per valutarne la classe di motilità. Sono inoltre stati utilizzati per valutare la loro capacità fecondante.

Ostrea edulis

Animali

Tutte le sperimentazioni sono state condotte su individui adulti maturi di *Ostrea edulis* provenienti da allevamenti del versante Atlantico della Francia.

Il trasporto degli animali fino alla sede di ricerca è stato effettuato a secco, in ambiente isolato (camera di polistirolo), mantenuto ad una temperatura di 5°C.

Ottenimento seme

Il seme è stato ottenuto mediante prelievo biotico introducendo una pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale. Il materiale recuperato è stato filtrato mediante l'utilizzo di un setaccio a maglia di 35 µm.

Modalità di attivazione del seme

La sospensione di spermatozoi attivati è stata ottenuta miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata e sterilizzata (0,22 µm, salinità 36‰, pH 8,1), con un rapporto di diluizione di 1:100.

Formazione dei pool di spermatozoi

Per tutte le fasi della sperimentazione sono stati utilizzati pools costituiti da spermatozoi con classe di motilità maggiore di 3. Campioni di spermatozoi caratterizzati da una minore motilità spermatica sono stati scartati.

Ottimizzazione delle conoscenze sul sistema biologico

Effetto della temperatura sulla motilità spermatica

Alla costituzione del pool di seme, aliquote di esso sono state attivate e mantenute a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$), valutando per ognuna di esse l'andamento della motilità spermatica nel tempo ed i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici

Aliquote di seme inattivo sono state mantenute a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$), dopo 120 e 180 minuti sono state attivate e mantenute allo stesso regime termico di conservazione pre-attivazione, valutandone quindi l'andamento della motilità spermatica nel tempo ed i parametri della motilità tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

Ottimizzazione della curva di congelamento per nunc da 2 mL

Tra le differenti tipologie di contenitori criogenici esistenti molti utilizzati sono le paillettes, sottili cannuce in plastica dal volume variabile da 0,25 a 0,5 mL, ed i nunc, provette in plastica dal volume variabile da 1 mL a 5 mL (Figura 10).

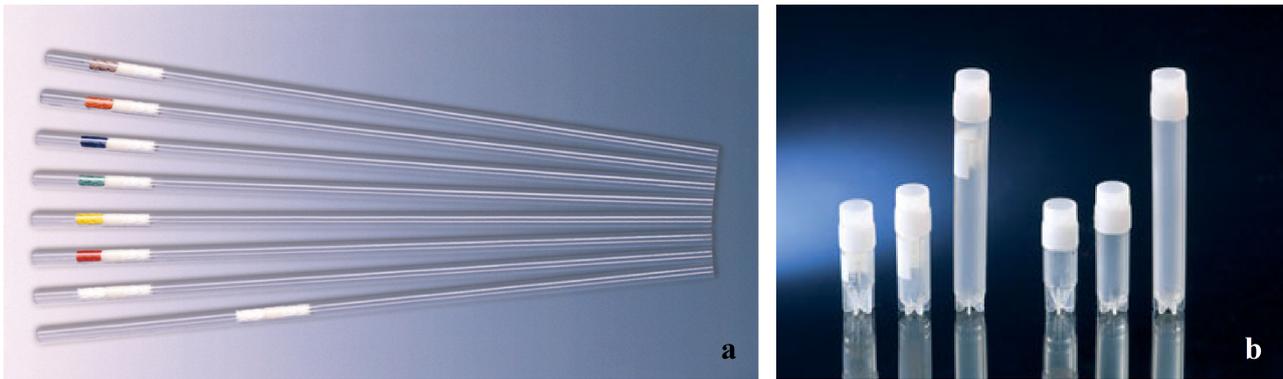


Figura 10. Contenitori criogenici comunemente utilizzati: (a) paillettes da 0,25 mL, (b) nunc di volume vario (1, 2, 5 mL).

I congelamenti effettuati con tali differenti tipologie di contenitori inducono gradienti e velocità di congelamento molto diverse, in virtù dei differenti volumi di soluzione che contengono.

I gradienti di congelamento per uno stesso sistema biologico devono quindi essere differenziati ed ottimizzati per le diverse tipologie di contenitore.

Lo studio criobiologico nel caso degli spermatozoi di *Ostrea edulis* ha riguardato l'ottimizzazione del protocollo di criopreservazione utilizzando come contenitore criobiologico nunc da 2 mL.

La sospensione spermatica addizionata con la soluzione di acqua di mare e crioprotettivi precedentemente selezionati (DMSO 5%, 7%, 10% e EG 5%, 7%, 10%, 15%) (Ieropoli et al, 2005) e posta in nunc da 2 mL, è stata mantenuta per 10' a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ ed in seguito congelata a -70°C utilizzando i seguenti gradienti di congelamento, riportati in Figura 11:

- C n.1: $-2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- C n.2: $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- C n.3: $-3.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- C n.4: $-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

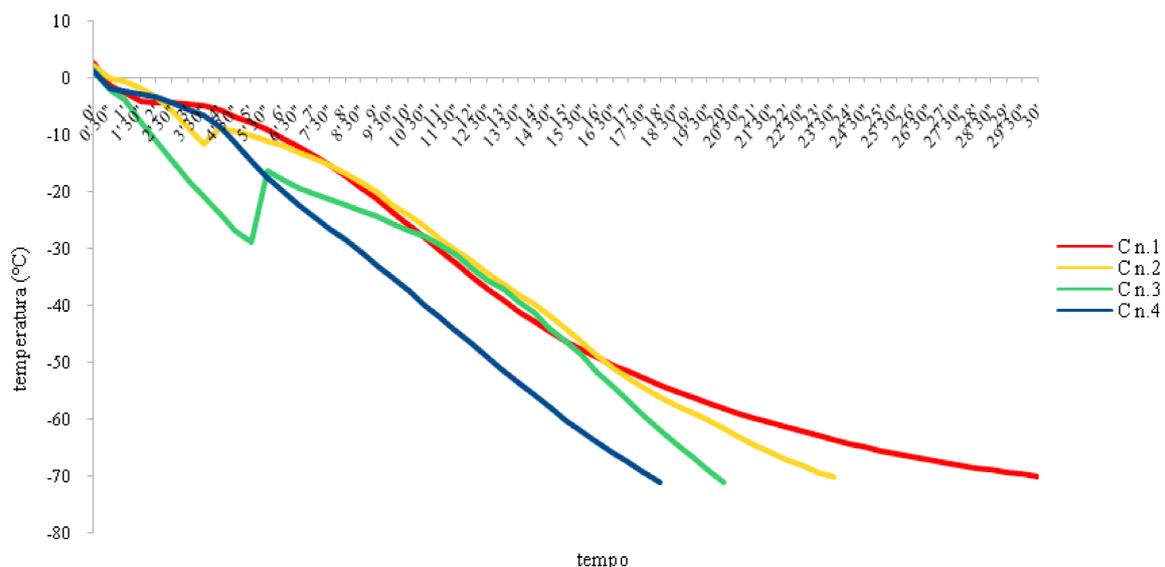


Figura 11. Gradienti di congelamento testati.

Al raggiungimento della temperatura di -70°C , i nunc sono stati immersi in azoto liquido.

Scongelamento

La sospensione di sperma è stata scongelata ad un gradiente di circa $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino ad una temperatura di $18\pm 1^{\circ}\text{C}$.

È stata quindi valutata la classe di motilità allo scongelamento, confrontata con la motilità post-scongelamento di spermatozoi criopreservati in paillettes, utilizzando la stessa modalità di adattamento-raffreddamento ed un gradiente di congelamento di $-35^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati

Gli spermatozoi scongelati che hanno fatto registrare i migliori risultati di motilità allo scongelamento sono stati mantenuti a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ monitorandone l'andamento della motilità nel tempo, confrontato con l'andamento della motilità di spermatozoi criopreservati in paillettes.

Fase B. Validazione della qualità dei gameti prodotti in sistemi RAS (Recirculating Aquaculture Systems) mediante l'applicazione di protocolli di criopreservazione già standardizzati

Tutte le sperimentazioni sono state condotte su gameti ottenuti da organismi sessualmente maturi allevati (indotti alla maturazione sessuale nel caso di *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas*, mantenuti in stand-by pre-emissivo nel caso di *Ostrea edulis* e *Pecten jacobaeus*) presso il RAS della Stazione Sperimentale del CRIAcq di Salerno, utilizzando come controllo gameti ottenuti da organismi sessualmente maturi reperiti da allevamenti a mare e/o pesca.

Mytilus galloprovincialis

Ottenimento gameti

I gameti sono stati ottenuti sottoponendo gli organismi a shock termico e raccolti singolarmente al fine di selezionare le emissioni di migliore qualità con cui costituire i pool di spermatozoi ed ovociti utilizzati per la sperimentazione.

Produzione trocofore

Gli embrioni ottenuti a seguito della procedura di fecondazione sono stati diluiti in acqua di mare filtrata (0,22 µm, 34‰, pH 8,02) fino ad ottenere una densità di 10 emb/mL e sono stati quindi incubati a 22°C per 24 ore.

Le trocofore ottenute sono state concentrate e portate ad una densità di 20000 trc/mL.

Spermatozoi

Gli spermatozoi di *Mytilus galloprovincialis* sono stati criopreservati utilizzando il protocollo messo a punto da Di Matteo et al (2009): aliquote di pool di seme sono state diluite 1:10 in FSW (0,22 µm, 34‰, pH 8,02) contenente il crioprotettivo EG alla concentrazione finale (V/V) 7%; i nunc da 2 mL sono stati quindi raffreddati da 20±1°C a 2°C con un gradiente di -0,25°C/min e sono stati in seguito congelati a -80°C utilizzando un gradiente a doppio step: -1°C/min fino a -15°C e -6°C/min fino a -80°C. Una volta raggiunti i -80°C/min i nunc sono stati immersi in azoto liquido (-196°C).

Lo scongelamento è stato effettuato utilizzando un gradiente di 60°C/min e gli spermatozoi scongelati sono stati mantenuti a 20±1°C valutandone, quindi, motilità allo scongelamento, capacità fecondante e sviluppo a larve D normoformate degli embrioni ottenuti dalla prova di fecondazione.

Trocofore

Le trocofore sono state criopreservate secondo il protocollo messo a punto da attività di tesi sperimentale (dati non pubblicati): la soluzione di trocofore concentrate è stata addizionata con un'aliquote di EG tale da ottenere una concentrazione finale di crioprotettivo del 10% ed è stata quindi raffreddata in nunc da 2 mL da 22°C a 2°C con un gradiente di 1,1°C/min. Il congelamento fino alla temperatura di -30°C è stato effettuato con un gradiente di -0,75°C/min, in seguito i nunc

sono stati immersi in azoto liquido. Lo scongelamento è stato effettuato utilizzando un gradiente molto lento di 90-100°C/min e le trocofore scongelate sono state analizzate al microscopio per verificarne la percentuale di movimento; in seguito sono state diluite alla concentrazione finale di 10 trc/mL ed incubate al buio a 22°C per 24h per consentirne lo sviluppo a larva D. Le larve ottenute sono state fissate per valutarne la percentuale di sviluppo morfologicamente normale.

Crassostrea gigas

Ottenimento gameti

I gameti sono stati ottenuti mediante prelievo biotico; le sospensioni ottenute da ogni singolo riproduttore sono state filtrate (35µm gli spermatozoi, 100µm le uova) per allontanare residui di tessuto gonadale ed analizzate al microscopio al fine di selezionare i gameti di migliore qualità, con cui costituire i pool di spermatozoi ed ovociti utilizzati per la sperimentazione.

Produzione trocofore

Gli embrioni ottenuti a seguito della procedura di fecondazione sono stati diluiti in acqua di mare filtrata (0,22 µm, 34‰, pH 8,02) fino ad ottenere una densità di 10 emb/mL e sono stati quindi incubati a 18°C per 24 ore.

Le trocofore ottenute sono state concentrate e portate ad una densità di 40000-80000 trc/mL.

Spermatozoi

Gli spermatozoi di *Crassostrea gigas* sono stati criopreservati utilizzando il protocollo riportato da Ieropoli et al, 2004: aliquote di pool di seme sono state diluite 1:10 in acqua di mare filtrata (0,22µm, 34‰, pH 8,02) contenente il crioprotettivo EG alla concentrazione finale (V/V) 10%; i nunc da 2 mL contenenti tale soluzione sono stati adattati per 15 minuti a 26°C e sono stati in seguito congelati a -70°C utilizzando un gradiente di -6°C/min. Al raggiungimento di -70°C/min i nunc sono stati immersi in azoto liquido (-196°C).

Lo scongelamento è stato effettuato utilizzando un gradiente di 70°C/min e gli spermatozoi sono stati mantenuti ad una temperatura di 26±1°C valutandone, quindi, motilità allo scongelamento, capacità fecondante e sviluppo a larve D normoformate degli embrioni ottenuti dalla prova di fecondazione.

Ovociti

Gli ovociti di *Crassostrea gigas* sono stati criopreservati utilizzando il protocollo messo a punto da Tervit et al, 2005: soluzioni concentrate (2000000 ovoc/mL) di uova sono state diluite 1:1 con una soluzione di crioprotettivo EG (concentrazione finale 10%) aggiunta gradualmente i 10 step, un'aliquota al minuto, agitando dopo ogni aggiunta. La soluzione ottenuta è stata caricata in paillettes da 0,250 mL ed è stata adattata per 20 minuti a 23°C ed in seguito raffreddata a 0°C per 5 minuti. Le paillettes sono state poi sottoposte ad un gradiente di -1°C/min fino al raggiungimento della temperatura di -10°C, lasciate a tale temperatura per 5 minuti e quindi portate a -35°C con un gradiente di -0,3°C/min. A questo punto sono state immerse in azoto liquido (-196°C).

Le paillettes sono state scongelate tenendole in un bagno d'acqua a 28°C fino allo scioglimento del

ghiaccio. Il contenuto di ogni paillettes è stato diluito 1:1 con acqua di mare filtrata e dopo 30 minuti ulteriormente diluito 1:9. Dopo 30 minuti gli ovociti sono stati osservati al microscopio per verificarne la forma e quindi, dopo opportuna diluizione, sono stati utilizzati per le prove di fecondazione. Infine, gli embrioni ottenuti sono stati incubati per la verifica del tasso di sviluppo a larve D normoformate.

Trocofore

Le trocofore di *Crassostrea gigas* sono state criopreservate utilizzando il protocollo riportato da Fabbrocini et al, 1999. Trocofore concentrate (40000-80000 trc/mL) sono state raffreddate fino alla temperatura di 2°C utilizzando un gradiente di -1°C/min, sono state quindi addizionate con il crioprotettivo PG (concentrazione finale 7%). I nunc da 2 mL contenenti la soluzione ottenuta sono stati congelati fino a -32°C con un gradiente di -1°C/min e quindi immersi in azoto liquido. Lo scongelamento è stato effettuato portando le trocofore alla temperatura di 20°C. Dopo la diluizione a 20 trc/mL e la verifica al microscopio della percentuale di motilità, le trocofore scongelate sono state incubate a 20°C per 24 ore per permetterne lo sviluppo a larve D. Al termine di tale periodo di incubazione è stata verificata la percentuale di sviluppo a larve D normoformate.

Ostrea edulis

Ottenimento spermatozoi

Gli spermatozoi sono stati ottenuti mediante prelievo bioptico; le sospensioni ottenute da ogni singolo riproduttore sono state filtrate (35µm) per allontanare residui di tessuto gonadale ed analizzate al microscopio al fine di selezionare gli spermatozoi di migliore qualità, utilizzate quindi per costituire i pool utilizzati per la sperimentazione.

Spermatozoi

Gli spermatozoi di *Ostrea edulis* sono stati criopreservati secondo il protocollo ottimizzato nella Fase A della sperimentazione: aliquote di seme secco sono state diluite 1:100 con una soluzione di acqua di mare filtrata (0,22 µm, 36‰, pH 8,0) addizionata con EG alla concentrazione finale (V/V) di 15% è stata posta in nunc da 2 mL, mantenuta per 10' a 3±1°C, in seguito congelata a -70°C utilizzando un gradiente di -3°C/min e quindi immersi in azoto liquido (-196°C). In seguito gli spermatozoi sono stati scongelati ad una temperatura di 18±1°C con un gradiente di 90-100°C/min. È stata quindi valutata la classe di motilità allo scongelamento.

Pecten jacobaeus

Ottenimento spermatozoi

Gli spermatozoi sono stati ottenuti mediante prelievo bioptico; le sospensioni ottenute da ogni singolo riproduttore sono state filtrate (35µm) per allontanare residui di tessuto gonadale ed analizzate al microscopio al fine di selezionare gli spermatozoi di migliore qualità e costituire i pool utilizzati per la sperimentazione.

Spermatozoi

Gli spermatozoi di *Pecten jacobaeus* sono stati criopreservati secondo il protocollo messo a punto nella Fase A della sperimentazione: aliquote di spermatozoi inattivi, diluiti 1:100 con acqua di mare (0,22 μm , 36‰) contenente il crioprotettivo EG alla concentrazione finale (V/V) del 10%, sono state adattate per 10 minuti alla temperatura di $10\pm 1^\circ\text{C}$ e quindi congelate in paillettes da 0,25mL a -70°C utilizzando un gradiente di $-20^\circ\text{C}/\text{min}$. Le paillettes sono state scongelate con un gradiente di $15^\circ\text{C}/\text{sec}$ fino alla temperatura di 10°C . È stata quindi valutata la classe di motilità allo scongelamento.

Fase C. Progettazione di biosaggi innovativi con sistemi criopreservati

Tra i differenti sistemi biologici marini per i quali protocolli di criopreservazione facilmente riproducibili sono stati già messi a punto ed ottimizzati vi sono gli spermatozoi di *Sparus aurata* (Fabbrocini et al, 2000; Cabrita et al, 2005) che sono stati selezionati per tale fase sperimentale, per la messa a punto di un biosaggio innovativo con sistemi criopreservati.

Animali

Tutte le sperimentazioni sono state condotte su spermatozoi ottenuti da esemplari maschi sessualmente maturi di *Sparus aurata* allevati presso l'azienda Panittica Pugliese di Torrecanne (BR).

Ottenimento seme

Il seme è stato prelevato previa anestesia (in ghiaccio) per stripping addominale e tenuto a secco.

Trasporto seme

Il trasporto del seme alla sede di sperimentazione è stato effettuato entro 6 ore dal prelievo, mantenendo il materiale biologico a secco, in ambiente isolato, ad una temperatura di $3\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Modalità di attivazione del seme

La sospensione di spermatozoi attivati è stata ottenuta miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata e sterilizzata ($0,22\ \mu\text{m}$, 36‰, pH 8,02, 18°C), con un rapporto di diluizione di 1:100.

Formazione dei pool di spermatozoi

Per tutte le fasi della sperimentazione sono stati utilizzati pools costituiti da spermatozoi con classe di motilità maggiore di 3. Campioni di spermatozoi caratterizzati da una minore motilità spermatica sono stati scartati.

Congelamento

Gli spermatozoi di *Sparus aurata* sono stati criopreservati utilizzando il protocollo messo a punto da Fabbrocini et al., 2000: il seme diluito 1:6 con una soluzione di NaCl 1% contenente il crioprotettivo DMSO alla concentrazione finale del 5% è stato adattato per 10 minuti a 4°C e quindi congelato in paillettes da 0,25 mL fino alla temperatura di -150°C con un gradiente di $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Sono stati infine immersi in azoto liquido (-196°C). Le paillettes sono state trasferite in un contenitore per lo stoccaggio a lungo termine di campioni mantenuti a -196°C , creando in questo modo uno stock omogeneo di seme criopreservato di orata.

Effetto dello stoccaggio in criobanca sulla qualità di spermatozoi criopreservati di *Sparus aurata*

Dopo 6 mesi di stoccaggio in banca criogenica (a -196°C) alcune paillettes sono state scongelate con un gradiente di $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ utilizzando un bagnetto d'acqua a 30°C e portato alla temperatura di $18\pm 1^{\circ}\text{C}$. Il seme scongelato è stato quindi attivato mediante diluizione (1:17, finale 1:100) con acqua di mare ed è stato valutato l'andamento nel tempo del seme. Come controllo sono stati considerati spermatozoi criopreservati, mantenuti in banca per 1 giorno e quindi scongelati.

Effetto della diluizione con NaCl 1% del seme scongelato mantenuto a differenti regimi termici (18±1°C e 3±1°C)

Il seme scongelato è stato diluito 1:6 in una soluzione di NaCl 1% ed incubato a differenti regimi termici (18±1°C e 3±1°C).

Dopo 15, 30, 60 e 90 minuti di incubazione, aliquote di seme sono state attivate mediante diluizione 1:3 (diluizione finale 1:100) con acqua di mare, determinandone l'andamento nel tempo della motilità.

I risultati ottenuti ai differenti regimi termici e tempi di incubazione sono stati confrontati con l'andamento della motilità di seme scongelato ed immediatamente attivato e mantenuto a 18°C, al fine di selezionare le condizioni (temperatura e tempo di incubazione) da utilizzare nel biosaggio.

Saggi ecotossicologici dei singoli xenobiotici su seme fresco

La sospensione di seme fresco conservata a secco a 3±1°C, è stata diluita 1:6 per l'esposizione con soluzioni di diluente inibitore NaCl 1% contenenti i singoli xenobiotici da testare.

L'esposizione è stata effettuata a 3±1°C per 1 ora e al termine di essa aliquote di seme sono state attivate mediante diluizione 1:17 (diluizione finale 1:100) con acqua di mare; è stata così valutata la motilità spermatica del seme esposto rispetto al controllo, costituito da seme incubato alle stesse condizioni sperimentali in una soluzione di NaCl 1%.

Al fine di stimare l'eventuale tossicità del solvente DMSO utilizzato per la preparazione delle soluzioni madri di alcuni xenobiotici, è stato valutato anche l'effetto sulla motilità spermatica dell'incubazione in presenza del massimo volume di solvente utilizzato per le soluzioni test.

Criosaggi dei singoli xenobiotici su seme scongelato

Le paillettes conservate in azoto liquido (-196°C) sono state scongelate con un gradiente di 15°C/sec ed aliquote di seme scongelato sono state attivate mediante diluizione 1:17 (diluizione finale 1:100) con FSW per valutare la riuscita del processo di congelamento.

Seme scongelato che ha mostrato una buona motilità spermatica è stato utilizzato per costituire un pool, conservato a freddo, utilizzato per i saggi.

La sospensione di spermatozoi scongelati (ottenuta unendo il seme di più paillettes) conservata a freddo è stata diluita 1:6 per l'esposizione con la soluzione di xenobiotico diluita in NaCl 1%. L'esposizione è stata effettuata a 3±1°C per 1 ora e al termine di essa aliquote di seme sono state attivate mediante diluizione 1:3 (diluizione finale 1:100) del seme esposto rispetto al controllo, costituito da seme scongelato diluito 1:6 con una soluzione di NaCl 1% ed incubato alle stesse condizioni sperimentali.

Al fine di stimare l'eventuale tossicità del solvente DMSO utilizzato per la preparazione delle soluzioni madri degli xenobiotici, è stato valutato anche l'effetto dell'incubazione in presenza del massimo volume di solvente utilizzato per le soluzioni test.

Xenobiotici testati

Gli xenobiotici cui sono stati esposti gli spermatozoi freschi e criopreservati appartengono a tre classi di contaminanti: metalli pesanti, pesticidi e idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

In particolare sono stati testati: cadmio, cromo e piombo, azinfos-metile, clorpirifos e pentaclorofenolo, antracene, fenantrene, pirene.

Metalli pesanti

I sali dei metalli pesanti cadmio ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$), cromo ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) e piombo (PbNO_3), forniti dalla Carlo Erba, sono stati solubilizzati in acqua bidistillata milliQ; aliquote delle soluzioni madri, con concentrazioni nominali di 1000 mg/L (ppm), sono state diluite in una soluzione di NaCl 1% per preparare le concentrazioni da testare.

Pesticidi

Azinfos-metile (Azinphos-methyl Pestanal®, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}_2$) e Clorpirifos (Chlorpyrifos-methyl Pestanal®, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{C}_{13}\text{NO}_3\text{PS}$) sono stati ottenuti dalla Riedel-De Haën, il Pentaclorofenolo (Pentachlorophenol Sodium, $\text{C}_6\text{HCl}_5\text{O}$) dalla Fluka.

Le soluzioni madri dei tre pesticidi, con concentrazioni nominali di 20000mg/L (ppm) sono state preparate sciogliendo i singoli sali in DMSO. Tali soluzioni sono state poi diluite con una soluzione di NaCl 1% per preparare le soluzioni alle concentrazioni da testare.

Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Antracene ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$), Fenantrene ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) e Pirene ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}$) sono stati forniti dalla Sigma Aldrich. Soluzioni madri con concentrazione nominale 10000 mg/L (ppm) sono state preparate sciogliendo aliquote di singoli sali in DMSO inducendone la completa solubilizzazione secondo la metodologia riportata da Bonnet et al, 2005.

Tali soluzioni sono state poi diluite con una soluzione di NaCl 1% per preparare le soluzioni alle concentrazioni da testare.

Analisi statistica

Ogni esperimento, effettuato in triplicato, è stato ripetuto almeno tre volte ($n \geq 9$).

L'analisi statistica è stata condotta effettuando l'ANOVA ad una e due vie, in relazione alla tipologia dei dati da analizzare, per il calcolo dei primi effettivi significativi rispetto al controllo: l'ANOVA ad una via è stato utilizzato per valutare gli effetti di differenti concentrazioni di CPA con gli stessi tempi di equilibratura, mentre l'ANOVA a 2 vie è stata utilizzata per comparare differenti concentrazioni con differenti tempi di equilibratura e differenti gradienti di pre-congelamento e congelamento. Un test t di Student del campione accoppiato è stato utilizzato per analizzare le differenze significative tra due gruppi campione.

Un valore di $p < 0,05$ è stato scelto come livello per la significatività.

Capitolo IV

Analisi dei risultati e discussioni

Fase A. Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone emergenti per l'acquacoltura

Pagellus erythrinus

Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico

Analisi del pattern di motilità del seme fresco

L'andamento della motilità di spermatozoi di *Pagellus erythrinus* attivati subito dopo la formazione del pool di spermatozoi (t0) è riportato in Figura 12.

Il seme addizionato con l'acqua di mare, già 30 secondi dopo l'attivazione ha raggiunto valori di motilità superiori a classe 3,5 (corrispondente al 65% di spermatozoi RVL) e ha mantenuto tali livelli qualitativi per 10 minuti, subendo poi una graduale riduzione di motilità e raggiungendo classe 0 25-30 minuti dopo l'attivazione.

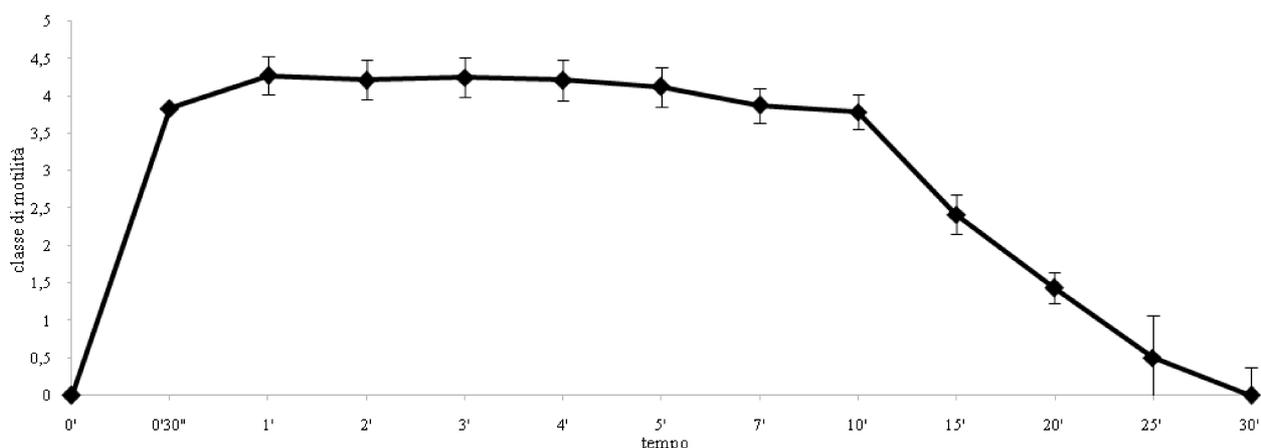


Figura 12. Andamento della motilità di spermatozoi di *Pagellus erythrinus* attivati subito dopo la formazione del pool (t0) e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

I parametri della motilità registrati per il seme fresco di *P. erythrinus* sono riportati in Tabella III.

Parametro	Attivazione a t0
Tempo di attivazione	1'
Massima motilità	$4,28\pm 0,26$
Durata della massima motilità	10'
Durata totale della motilità	30'

Tabella III. Parametri della motilità del seme attivato subito dopo la formazione del pool (t0) e mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Capacità di attivazione nel tempo di seme mantenuto a differenti regimi termici e sottoposto a diverse modalità di stoccaggio

Le prove di mantenimento del seme secco e diluito in diluente inibitore NaCl 1% per 24 ore hanno fatto registrare i risultati riportati in Figura 13.

La conservazione del seme per 24 ore, secondo le tutte le modalità testate, ha indotto una perdita di qualità spermatica, facendo registrare una riduzione della massima classe di motilità raggiunta dal seme.

La conservazione a secco a $18\pm 1^\circ\text{C}$ è risultata, in generale, la condizione sperimentale più dannosa per il sistema biologico esaminato, con valori di motilità massima che hanno di poco superato classe 2,5 ($2,75\pm 0,34$) e la graduale riduzione della motilità che ha raggiunto classe 1 20' dopo l'attivazione.

Il mantenimento del seme secco a freddo ($3\pm 1^\circ\text{C}$) ha fatto registrare una classe di motilità all'attivazione comparabile a quella del seme t_0 ; la motilità spermatica comunque ha mantenuto valori prossimi a classe 3 per soli 5 minuti dall'attivazione ed è poi rapidamente diminuita a percentuali di spermatozoi RVL inferiori al 10% entro i successivi 5 minuti (10').

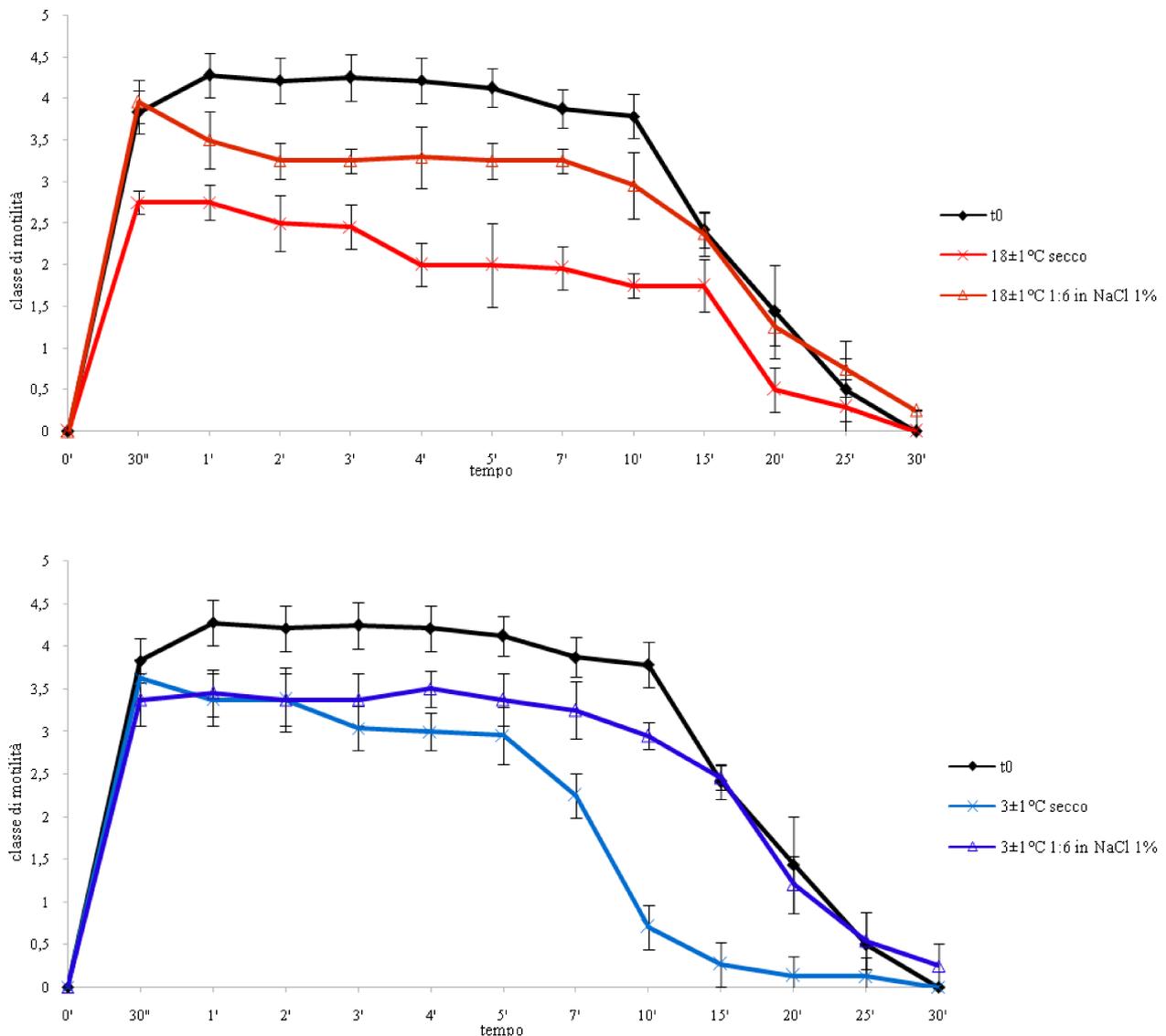


Figura 13. Andamento nel tempo del seme mantenuto sia a secco che in diluente inibitore NaCl 1% per 24h a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$). In nero (t_0) l'andamento della motilità degli spermatozoi attivati subito dopo il prelievo biotico e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

La diluizione del seme con un inibitore della motilità, quale una soluzione di NaCl 1%, ha permesso di ridurre il decadimento della qualità spermatica per entrambi i regimi termici testati: la conservazione per 24 ore in tale mezzo ha indotto, infatti, all'attivazione, valori di motilità

spermatica superiori a classe 3 ed andamenti della motilità spermatica molto simili, con la persistenza di buone percentuali di spermatozoi RVL (superiori a 50%) per 7 minuti ed un successivo decadimento della motilità spermatica statisticamente non differente ($p > 0,05$) da quello registrato a t_0 .

Il mantenimento del seme a freddo ($3 \pm 1^\circ\text{C}$) sia a secco che diluito in NaCl 1% per tempi fino a 96 ore dalla formazione dei pool ha fatto registrare i risultati riportati in Tabella IV.

	Parametro	6h	24h	48h	72h	96h
Seme conservato secco a $3 \pm 1^\circ\text{C}$ dopo il prelievo	Tempo di attivazione	1'	30"	1'	1'	30"
	Massima motilità	$4 \pm 0,2$	$3,63 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,3$	$3 \pm 0,3$
	Durata della massima motilità	10'	5'	5'	2'	1'
	Durata totale della motilità	30'	25'	25'	20'	10'
Seme conservato diluito 1:6 in NaCl 1% a $3 \pm 1^\circ\text{C}$	Tempo di attivazione	1'	1'	30"	30"	30"
	Massima motilità	$3,75 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,21$	$3,2 \pm 0,3$	$3,25 \pm 0,2$	$2,75 \pm 0,2$
	Durata della massima motilità	10'	10'	7'	3'	--
	Durata totale della motilità	30'	30'	30'	20'	7'

Tabella IV. Parametri della motilità di seme conservato a $3 \pm 1^\circ\text{C}$ a secco e diluito 1:6 in NaCl 1% per tempi fino a 96 ore dal prelievo.

La conservazione in NaCl 1% a freddo ha fatto registrare per tutti i tempi di attivazioni valori di massima classe di motilità statisticamente differenti da quelli del seme mantenuto a secco a freddo ($p < 0,05$). La minore intensità di motilità (dell'ordine comunque di 0,25 classi) è stata compensata dalla durata della massima motilità, che ha fatto registrare per il seme conservato in NaCl 1% valori più elevati.

Comunque, indipendentemente della tipologia di conservazione (secco o diluito in inibitore) la qualità del seme decade all'aumentare dell'intervallo di tempo di conservazione, fissando, in linea generale, un tempo massimo di 24-48h per l'utilizzo del seme fresco.

Selezione degli agenti crioprotettivi

DMSO

In Figura 14 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di DMSO.

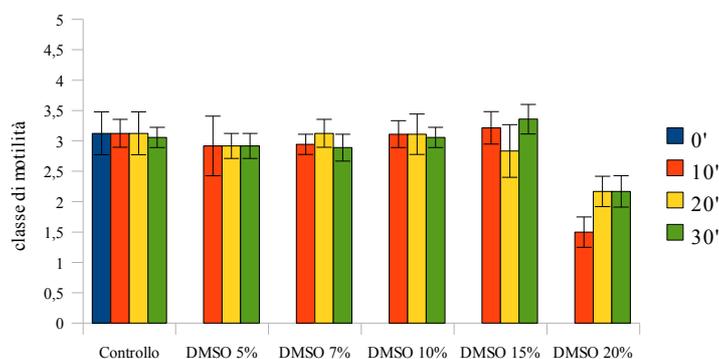


Figura 14. Motilità spermatica all'attivazione di seme incubato a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10', 20' e 30' in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di DMSO.

Per tale crioprotettivo, concentrazioni fino al 15% hanno indotto variazioni statisticamente non significative ($p>0,05$) della motilità spermatica rispetto al controllo, anche dopo 30 minuti di incubazione. L'aumento della concentrazione al 20% e per soli 10 minuti di incubazione ha fatto registrare invece una significativa riduzione della motilità spermatica.

EG

I valori di motilità spermatica all'attivazione registrati a seguito dell'incubazione del seme in presenza di EG sono riportati in Figura 15.

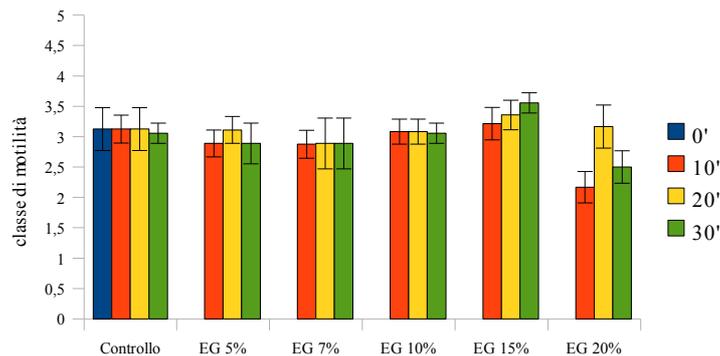


Figura 15. Motilità spermatica all'attivazione di seme incubato a $18\pm 1^\circ\text{C}$ per 10', 20' e 30' in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di EG.

Gli spermatozoi di pagello incubati per 30 minuti in presenza di concentrazioni di EG fino al 15% e poi attivati non hanno mostrato all'attivazione riduzioni statisticamente significative della motilità ($p>0,05$), mentre una breve (10') esposizione a concentrazioni maggiori ha indotto una perdita significativa di motilità ($p<0,05$).

PG

I risultati di motilità spermatica all'attivazione registrati a seguito dell'esposizione del seme al PG sono mostrati in Figura 16.

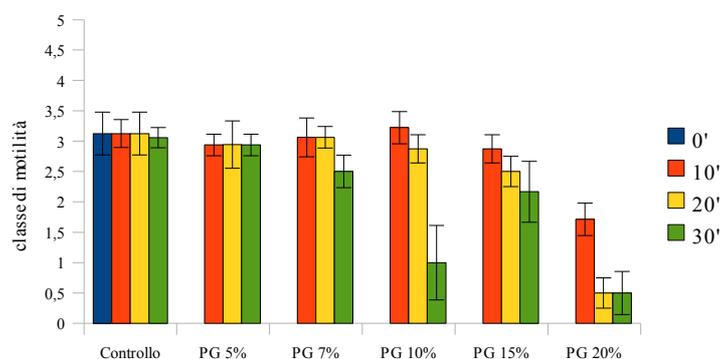


Figura 16. Motilità spermatica all'attivazione di seme incubato a $18\pm 1^\circ\text{C}$ per 10', 20' e 30' in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di PG.

Tale crioprotettivo ha mostrato una maggiore tossicità su tale sistema biologico, facendo registrare una significativa riduzione della motilità spermatica rispetto al controllo ($p<0,05$) già alla concentrazione 7% dopo 30 minuti di incubazione. Un aumento della concentrazione fino al 15%

non ha indotto ulteriori perdite di motilità spermatica, mentre l'incubazione in concentrazioni del 20% ha drasticamente ridotto la motilità già dopo 10 minuti di incubazione.

GIOH

In Figura 17 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di GIOH.

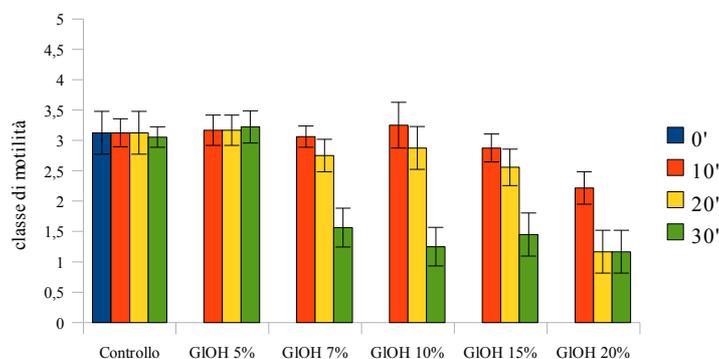


Figura 17. Motilità spermatica all'attivazione di seme incubato a $18\pm 1^\circ\text{C}$ per 10', 20' e 30' in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di GIOH.

Concentrazioni di GIOH del 5% non hanno indotto riduzioni di motilità spermatica all'attivazione statisticamente significative rispetto al controllo ($p > 0,05$), anche ai tempi di esposizione più elevati (30 minuti). L'aumento della concentrazione (da 7% al 15%) ha fatto registrare i primi effetti statisticamente significativi rispetto al controllo ($p < 0,05$) solo dopo 30 minuti di incubazione, mentre l'ulteriore incremento di crioprotettivo (20%) ha indotto perdite significative ($p < 0,05$) di motilità spermatica già dopo soli 10 minuti di incubazione.

MetOH

I valori di motilità spermatica all'attivazione registrati a seguito dell'incubazione del seme in presenza di MetOH sono riportati in Figura 18.

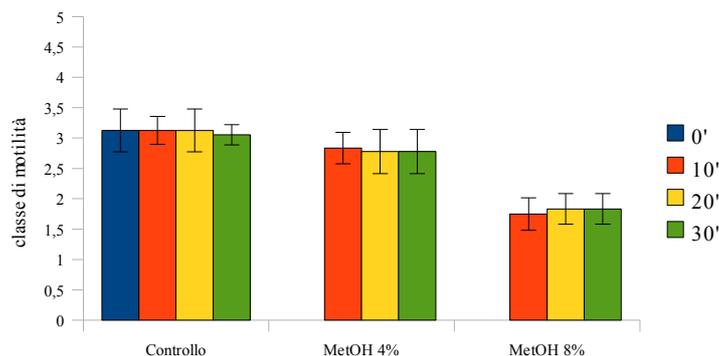


Figura 18. Motilità spermatica all'attivazione di seme incubato a $18\pm 1^\circ\text{C}$ per 10', 20' e 30' in soluzioni di NaCl 1% contenenti concentrazioni crescenti di MetOH.

Il metanolo alla concentrazione 4% e per tutti i tempi di esposizione non ha fatto registrare risultati significativi di variazione della motilità spermatica all'attivazione rispetto al controllo ($p > 0,05$). Il raddoppio della concentrazione (da 4% a 8%) ha indotto riduzioni significative della motilità spermatica ($p < 0,05$) già dopo 10' di incubazione.

In base alle prove effettuate, i crioprotettivi selezionati sono stati i seguenti: DMSO 5%, DMSO 7%, DMSO 10%, EG5%, EG7%, EG10%, PG5%, PG7%, GIOH5%, MetOH8%.

Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento

I risultati di motilità spermatica registrati sottoponendo gli spermatozoi ai gradienti di adattamento/raffreddamento (A/R) testati, in presenza dei crioprotettivi selezionati nella fase precedente, sono riportati in Figura 19.

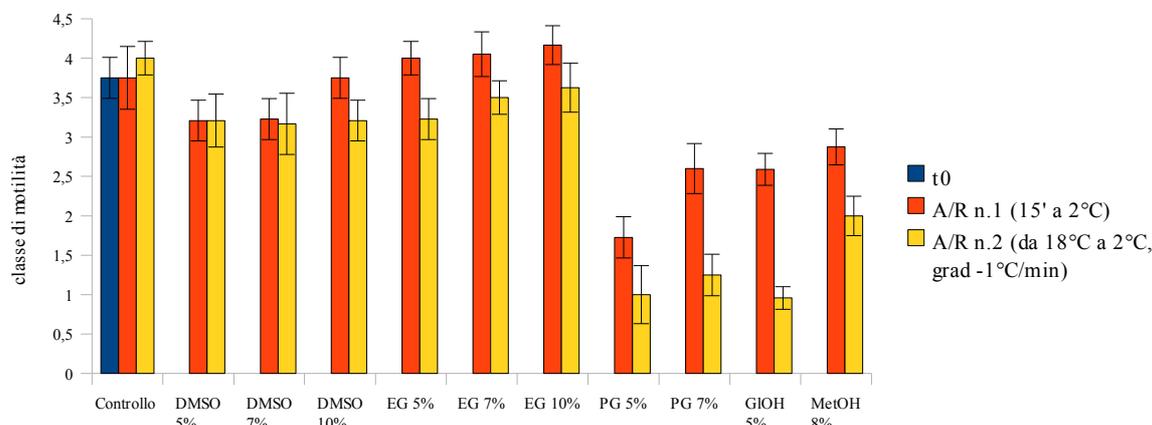


Figura 19. Motilità di spermatozoi sottoposti a due gradienti di adattamento/raffreddamento (A/R).

L'adattamento ai crioprotettivi condotto a freddo, a temperatura costante (A/R n.1, 15 minuti a 2°C) hanno fatto registrare valori di motilità spermatica che, per tutti i crioprotettivi selezionati, ad eccezione di DMSO 5 e 7%, è risultata statisticamente maggiore ($p < 0,05$) rispetto alla motilità registrata utilizzando la curva A/R n.2 (da 18°C a 2°C con un gradiente di raffreddamento di 1°C/min).

Alla luce di tali risultati, per le fasi successive della sperimentazione è stata adottata una fase di A/R isoterma, per 15 minuti, a 2°C.

Selezione della curva di congelamento

In Figura 20 sono riportati i risultati di motilità spermatica registrati sottoponendo gli spermatozoi, addizionati con i crioprotettivi selezionati e raffreddati secondo il gradiente A/R n.1, a due differenti gradienti di congelamento (C n.1 e C n.2).

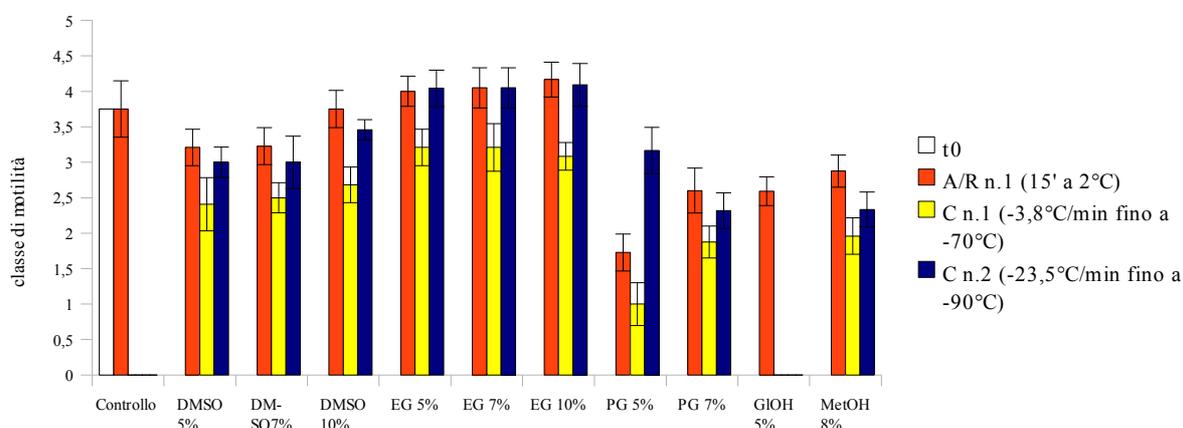


Figura 20. Motilità post-scongelo di spermatozoi sottoposti a due gradienti di congelamento (C).

Il gradiente C n.1 ha fatto registrare allo scongelamento, per tutti i crioprotettivi selezionati, valori di motilità spermatica risultati statisticamente inferiori ($p < 0,05$) rispetto ai valori registrati al termine della fase A/R.

Il congelamento degli spermatozoi mediante il gradiente C n.2 ha permesso di ottenere allo scongelamento risultati di motilità spermatica all'attivazione migliori rispetto all'altro gradiente, facendo registrare, nel caso di DMSO 7, EG a tutte le concentrazioni selezionate e PG 7%, risultati statisticamente non differenti dai valori di motilità pre-congelamento ($p > 0,05$).

In generale l'aggiunta del seme con EG alle concentrazioni comprese tra 5% e 10% e con DMSO 10% ha indotto all'attivazione valori di motilità statisticamente non differenti rispetto al controllo ($p > 0,00$); tra i crioprotettivi selezionati dalle prove di tossicità, il solo crioprotettivo che, allo scongelamento, non ha fatto registrare la presenza di spermatozoi mobili, è stato il glicerolo, che quindi non è stato in grado di proteggere le cellule dai danni provocati dal congelamento.

Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati

I risultati del monitoraggio della motilità post-scongelamento (fino a 20') degli spermatozoi che allo scongelamento hanno mostrato differenze risultate statisticamente non significative dai rispettivi controlli sono riportati in Figura 21.

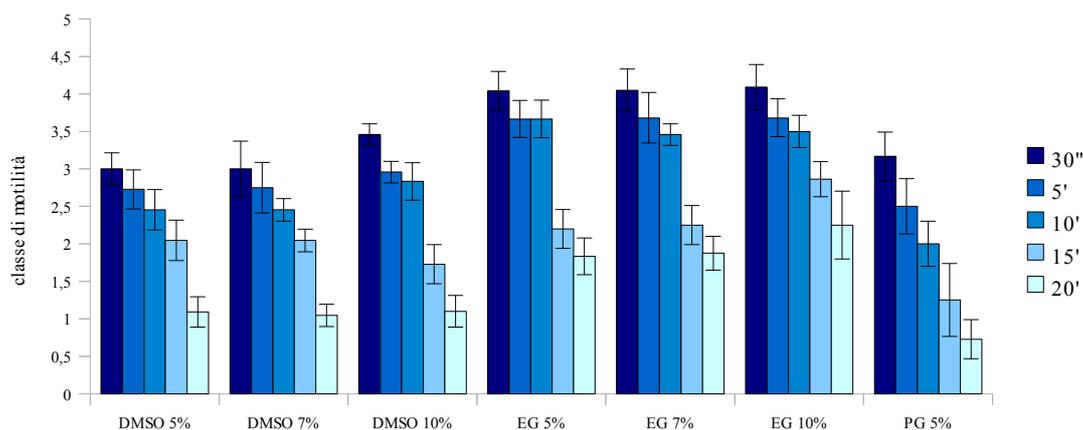


Figura 21. Motilità post-scongelamento di spermatozoi mantenuti a 18°C.

In termini di durata della motilità post-scongelamento, i migliori risultati sono stati registrati con l'EG 10%, che ha permesso al seme di mantenere nei 20 minuti successivi allo scongelamento, valori di motilità spermatica superiori a classe 1,5.

Anche gli altri crioprotettivi testati, comunque, hanno fatto registrare, al termine del monitoraggio, la presenza di spermatozoi con movimento RVL.

Pecten jacobaeus

Prove di emissione gametica

Le prove di emissione controllata di gameti effettuate mediante iniezione con serotonina e mediante shock termico hanno fatto registrare i risultati riportati in Figura 21 e Figura 22.

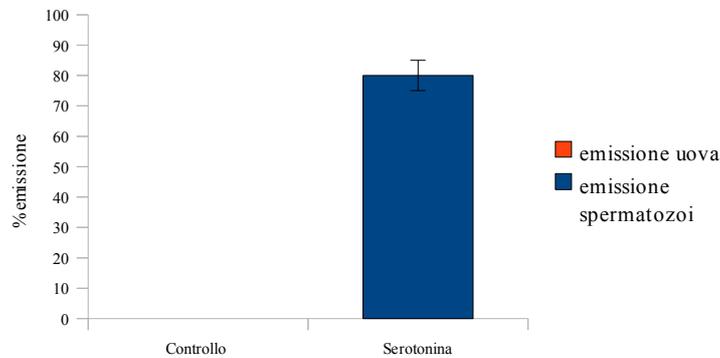


Figura 21. Percentuale di emissione gametica registrata iniettando nelle gonadi serotonina. Il controllo rappresenta l'emissione ottenuta iniettando una soluzione senza serotonina.

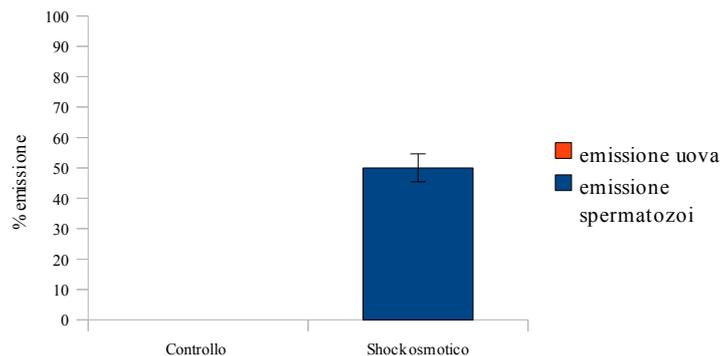


Figura 22. Percentuale di emissione gametica registrata sottoponendo gli animali a shock termico. Il controllo rappresenta l'emissione ottenuta da animali posti in acqua ma non sottoposti a shock termico.

Il trattamento delle gonadi con serotonina ha fatto registrare nell'80 % dei campioni analizzati l'emissione di spermatozoi che, analizzati al microscopio, hanno mostrato classi di motilità comprese tra 4 e 5.

Le prove di emissione gametica per shock termico hanno indotto un'effettiva emissione solo nel 50% degli organismi trattati; anche in questo caso sono stati emessi soltanto spermatozoi, che hanno fatto registrare valori di motilità spermatica compresi tra le classi 4 e 5.

Entrambi i trattamenti non hanno indotto emissione di uova.

Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico

Analisi del pattern di motilità del seme fresco

L'andamento della motilità di spermatozoi di *Pecten jacobaeus* attivati subito dopo la formazione del pool (t_0) e mantenuti a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ è riportato in Figura 23.

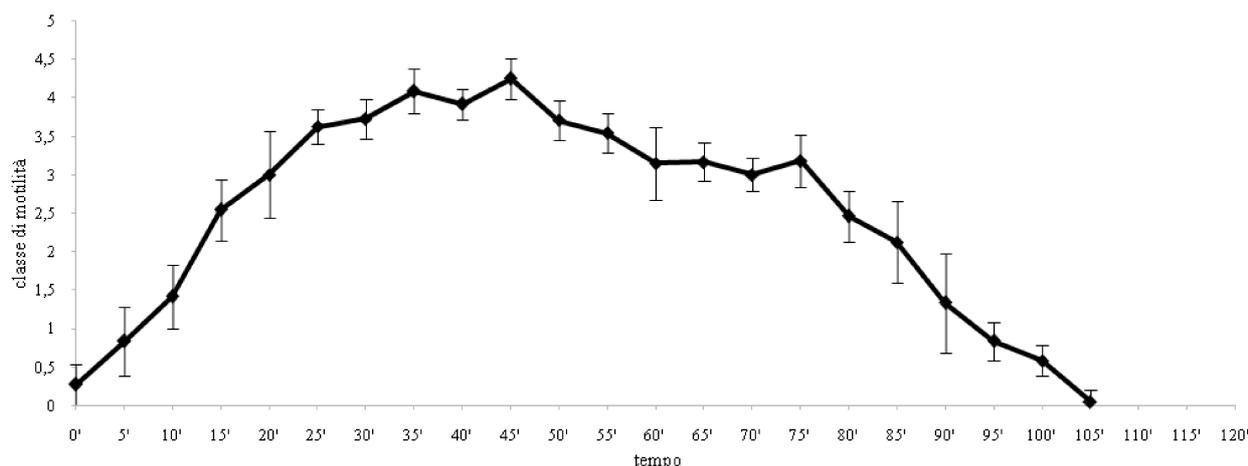


Figura 23. Andamento della motilità di spermatozoi di *Pecten jacobaeus* attivati subito dopo la costituzione del pool (t0) e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Il seme addizionato con l'acqua di mare ha raggiunto valori di motilità spermatica superiori a classe 3 dopo 20 minuti dall'attivazione, mantenendo tali intensità di motilità per circa 55 minuti; in seguito, la motilità è lentamente diminuita, raggiungendo classe 0 105 minuti dall'attivazione.

In Tabella V sono riportati i parametri della motilità registrati per seme attivato subito dopo il prelievo e mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Parametro	Attivazione a t0
Tempo di attivazione	35'
Massima motilità	$4,25\pm 0,2$
Durata della massima motilità	55'
Durata totale della motilità	105'

Tabella V. Parametri della motilità del seme attivato subito dopo il prelievo biotico (0h) e mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici

La prova di mantenimento del seme secco a differenti temperature ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) per 20 minuti ha fatto registrare, a seguito dell'attivazione, gli andamenti della motilità spermatica riportati in Figura 24.

Il mantenimento del seme secco per soli 20 minuti dopo la formazione del pool ha alterato la qualità degli spermatozoi, indipendentemente dal regime termico di conservazione: il monitoraggio dell'andamento della motilità spermatica nel tempo a seguito dell'attivazione ha fatto registrare per tutti i regimi termici testati una elevata riduzione della massima classe di motilità raggiunta, con differenze statisticamente poco significative tra le tre temperature.

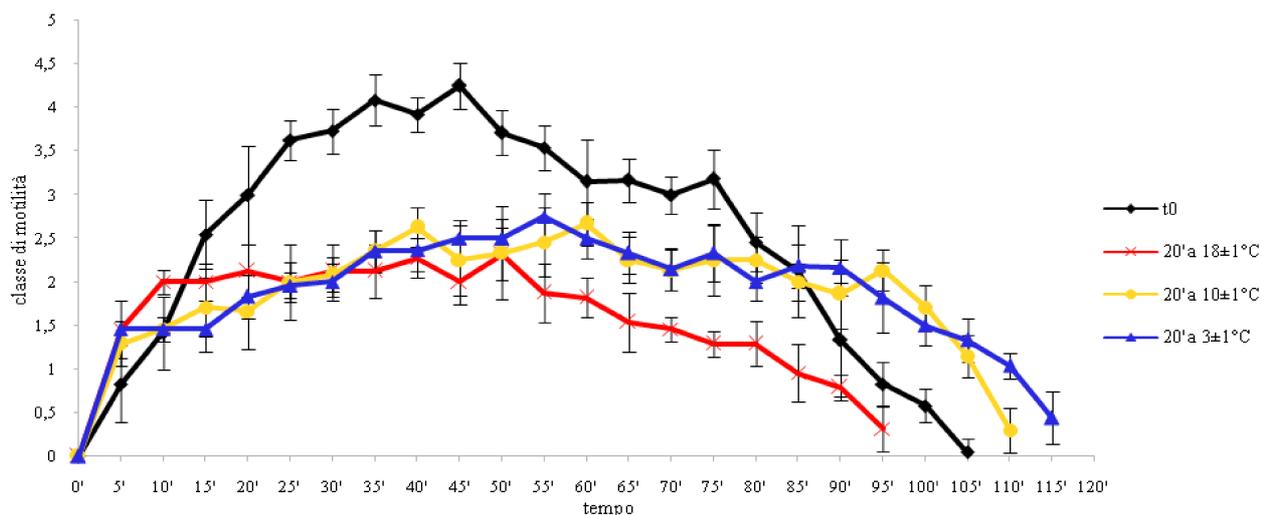


Figura 24. Andamenti della motilità di spermatozoi di *Pecten jacobaeus* mantenuti inattivi per 20 minuti a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) ed inseguito attivati e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$. In nero (t0) l'andamento della motilità degli spermatozoi attivati subito dopo il prelievo biotico e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Differenze significative ($p < 0,05$) tra i tre trattamenti sono invece stati registrati per la durata totale della motilità spermatica: la conservazione a $18\pm 1^\circ\text{C}$ per 20' ha fatto registrare una riduzione della durata della motilità rispetto al seme attivato subito dopo il prelievo, mentre la conservazione agli altri due regimi termici ($10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) ha indotto un lieve incremento della durata della motilità (rispettivamente 5 e 10 minuti).

In Tabella VI sono riportati i risultati ottenuti con i differenti regimi termici testati, in termini dei parametri della motilità

Parametro	$18\pm 1^\circ\text{C}$	$10\pm 1^\circ\text{C}$	$3\pm 1^\circ\text{C}$
Tempo di attivazione	40'	40'	45'
Massima motilità	$2,25\pm 0,16$	$2,75\pm 0,2$	$2,75\pm 0,16$
Durata massima motilità	--	--	--
Durata totale della motilità	95'	110'	115'

Tabella VI. Parametri della motilità del seme mantenuto inattivo per 20 minuti a differenti regimi termici a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) ed inseguito attivati e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$

Selezione degli agenti crioprotettivi

DMSO

In Figura 25 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme di *P. jacobaeus* in acqua di mare contenente concentrazioni crescenti di DMSO.

La motilità degli spermatozoi incubati con DMSO alle concentrazioni 5% e 7% per 30' di esposizione ha mostrato le minori differenze significative rispetto al controllo ($p < 0,05$). Una riduzione statisticamente più significativa è stata registrata con le concentrazioni 10% e 15% ($p < 0,05$). Tempi di incubazione maggiori (60') hanno indotto una maggiore riduzione di motilità anche per le concentrazioni 5% e 7% ($p < 0,05$).

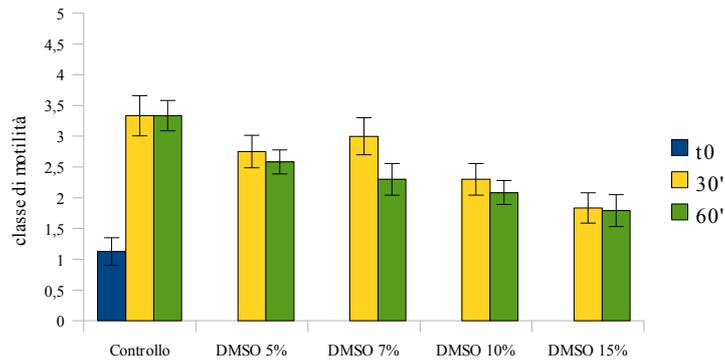


Figura 25. Motilità spermatica di spermatozoi incubati per 30' e 60' in soluzioni di DMSO a 10±1°C.

EG

I valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme in presenza di EG sono riportati in Figura 26.

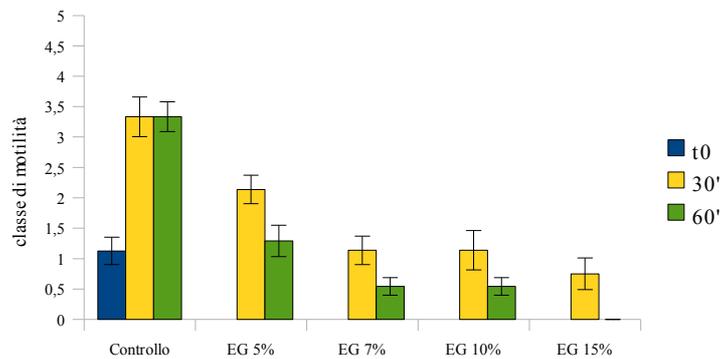


Figura 26. Motilità spermatica di spermatozoi incubati per 30' e 60' in soluzioni di EG a 10±1°C .

Tale crioprotettivo si è dimostrato estremamente tossico per gli spermatozoi di *P. jacobaeus*, inducendo riduzioni della motilità spermatica statisticamente significative ($p < 0,05$) rispetto al controllo già alla più bassa concentrazione testata (5%) e dopo 30 minuti di incubazione. La tossicità è aumentata all'aumentare della concentrazione e del tempo di incubazione.

PG

I risultati di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme in soluzioni di acqua di mare contenenti il crioprotettivo PG sono mostrati in Figura 27.

L'esposizione per 30 minuti al PG alla più bassa concentrazione testata (5%) ha indotto una riduzione significativa ($p < 0,05$) della motilità degli spermatozoi, e la riduzione della motilità è aumentata all'aumentare della concentrazione e del tempo di incubazione.

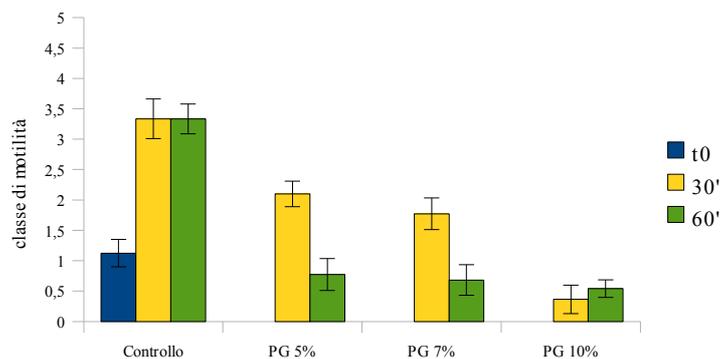


Figura 27. Motilità spermatica di spermatozoi incubati per 30' e 60' in soluzioni di PG a 10±1°C.

GIOH

In Figura 28 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme per 30 e 60 minuti in concentrazioni crescenti di GIOH.

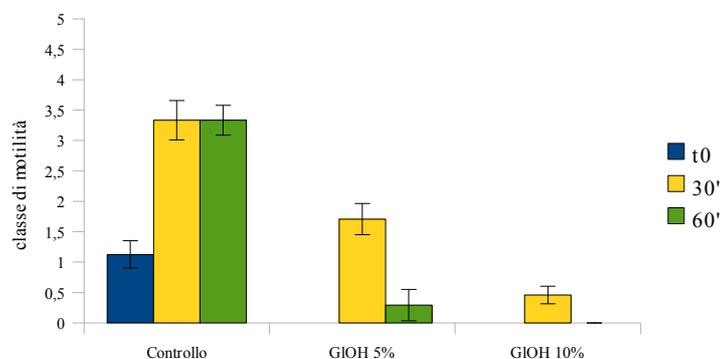


Figura 28. Motilità spermatica di spermatozoi incubati per 30' e 60' in soluzioni di GIOH a 10±1°C.

Gli spermatozoi di *P. jacobaeus* hanno mostrato una elevata sensibilità anche al glicerolo: l'incubazione per 30 minuti in acqua di mare contenente il 5% di tale crioprotettivo ha indotto una riduzione statisticamente significativa della motilità spermatica. Ed anche in questo caso l'aumento della concentrazione e del tempo di incubazione ha indotto una ulteriore riduzione della motilità rispetto al controllo.

MetOH

I valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme in MetOH sono riportati in Figura 29.

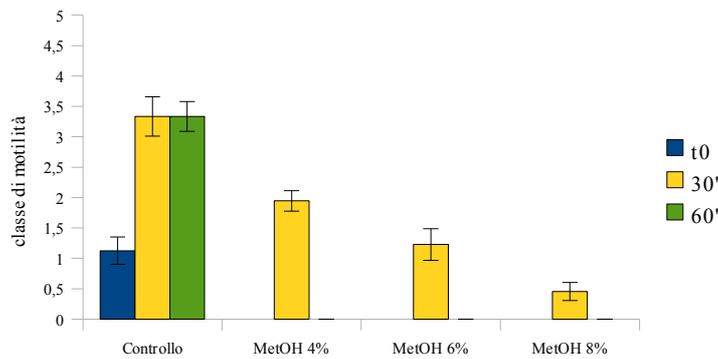


Figura 29. Motilità spermatica di spermatozoi incubati per 30' e 60' in soluzioni di MetOH a $10\pm 1^\circ\text{C}$.

Anche il metanolo si è rivelato molto tossico per gli spermatozoi di *P. jacobaeus*: tutte le concentrazioni testate hanno avuto effetti significativi ($p < 0,05$) sulla motilità spermatica con, dopo 30 minuti di incubazione, riduzioni più marcate all'aumentare della concentrazione; l'incubazione per 60 minuti ha fatto registrare la totale assenza di spermatozoi RVL (classe 0) anche alla concentrazione più bassa testata (4%).

In considerazione dell'elevata sensibilità del sistema biologico analizzato verso i crioprotettivi testati, il criterio scelto per selezionare le concentrazioni da utilizzare nelle fasi sperimentali successive non è stata la significatività statistica delle riduzioni di motilità registrate rispetto al controllo: sono stati infatti inclusi anche crioprotettivi che hanno fatto registrare riduzioni significative di motilità spermatica, poiché l'efficacia di criopreservazione non necessariamente va di pari passo con una minore tossicità del crioprotettivo, mentre per tutti i crioprotettivi testati sono state omesse le più basse concentrazioni (5% e 4%), rivelatesi inefficaci per l'ottenimento di una valida criopreservazione.

Per tale motivo per le fasi successive della sperimentazione sono stati selezionati le seguenti concentrazioni: DMSO 7 e 10%, EG 7 e 10%, PG7 e 10%, GIOH 5% e MetOH 6%.

Selezione della curva di Adattamento/Raffreddamento

I valori di motilità spermatica di spermatozoi addizionati con i crioprotettivi selezionati nella fase precedente e raffreddati secondo i due i gradienti di adattamento/raffreddamento (A/R) testati, sono riportati di seguito.

A/R n. 1: (10' a $10\pm 1^\circ\text{C}$)

L'incubazione degli spermatozoi con i crioprotettivi per 10 minuti a $10\pm 1^\circ\text{C}$ ha fatto registrare i valori di motilità spermatica riportati in Figura 30.

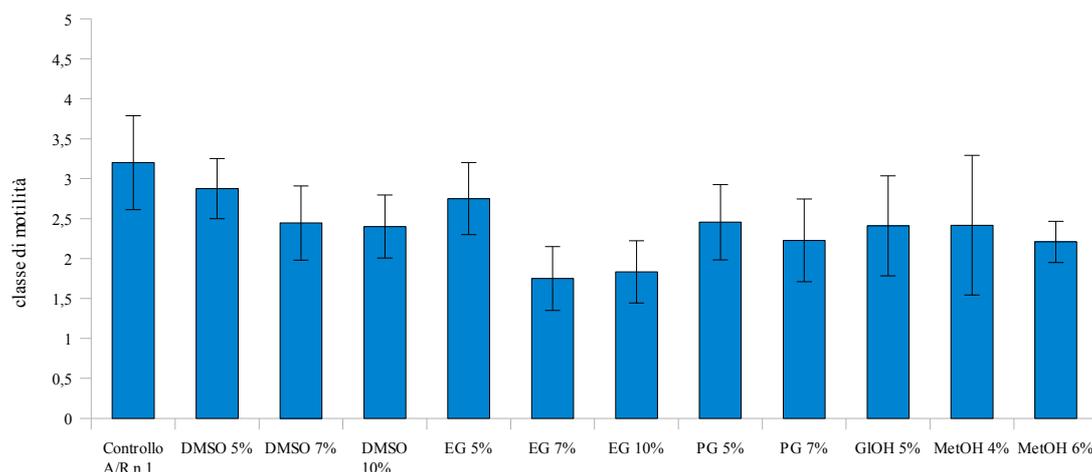


Figura 30. Motilità di spermatozoi sottoposti al gradiente di adattamento/raffreddamento A/R n.1 (10' a $10\pm 1^\circ\text{C}$).

In mantenimento degli spermatozoi non trattati con i crioprotettivi (Controllo A/R n.1) per 10 minuti a $10\pm 1^\circ\text{C}$ ha indotto una buona motilità spermatica (classe 3). Riduzioni della motilità spermatica statisticamente non significative ($p > 0,05$) rispetto al controllo sono state registrate solo in presenza di DMSO 5%, EG 5% e MetOH 4%; tutti gli altri trattamenti hanno indotto valori di motilità spermatica molto minori rispetto al controllo.

A/R n. 2: (10' a $3\pm 1^\circ\text{C}$)

In Figura 31 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione degli spermatozoi con i crioprotettivi selezionati per 10 minuti a $3\pm 1^\circ\text{C}$.

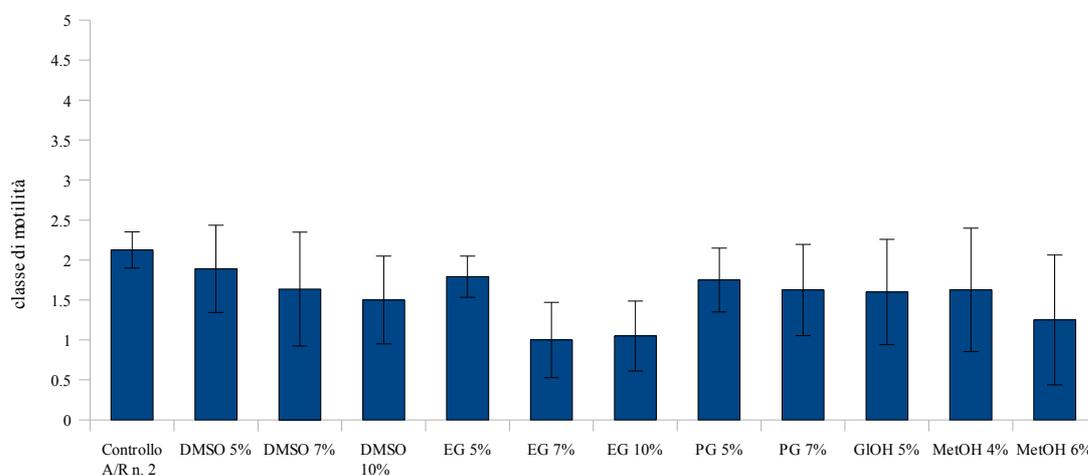


Figura 31. Motilità di spermatozoi sottoposti al gradiente di adattamento/raffreddamento A/R n.2 (10' a $3\pm 1^\circ\text{C}$).

Tale gradiente di adattamento/raffreddamento ha fatto registrare già nel controllo valori di motilità spermatica molto bassi (inferiori a classe 2,5). L'incubazione con i crioprotettivi ha indotto riduzioni significative ($p < 0,05$) di motilità spermatica rispetto al controllo per tutti i crioprotettivi ad eccezione di DMSO 5% e PG 7%.

Il sistema si è confermato estremamente sensibile ai crioprotettivi anche quando l'incubazione è condotta a regimi termici più bassi rispetto ai $18\pm 1^\circ\text{C}$; i migliori risultati ottenuti con il gradiente A/R n.1 rispetto al gradiente A/R n.2 hanno confermato che il trattamento di tale sistema biologico a

10±1°C ne limita lo stress preservandone le capacità motili.

Selezione della curva di congelamento

In Figura 32 sono riportati i risultati di motilità spermatica registrati sottoponendo gli spermatozoi, addizionati con i crioprotettivi selezionati e raffreddati secondo il gradiente A/R n.1, a differenti gradienti di congelamento.

Tra i gradienti di congelamento testati i migliori risultati allo scongelamento sono stati registrati con il C n.4 (-20°C/min), che ha permesso di ottenere con tutti i crioprotettivi testati (ad eccezione di PG 5% e MetOH 4%) spermatozoi motili. In ogni caso comunque le differenze tra la motilità del seme adattato e quella del seme scongelato sono risultate statisticamente significative ($p < 0,05$). In assoluto la minore perdita di motilità è stata ottenuta quando gli spermatozoi sono stati trattati con EG 10% (motilità post-A/R classe 1,83±0,39, motilità post-scongelamento classe 1,23±0,41).

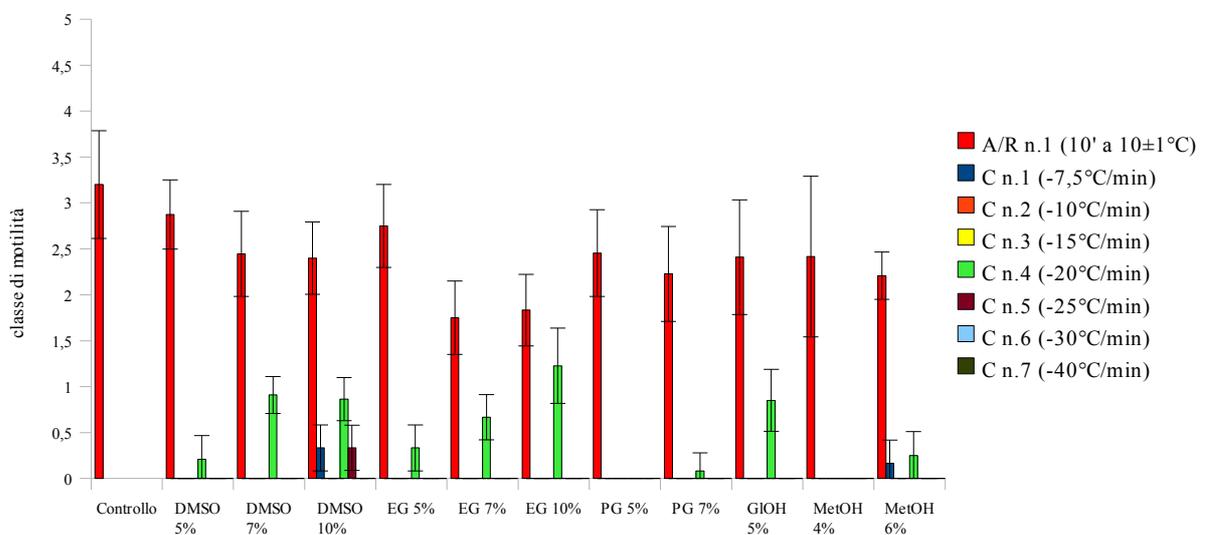


Figura 32. Motilità post-scongelamento di spermatozoi sottoposti a differenti gradienti di congelamento (C).

Andamento nel tempo della motilità degli spermatozoi scongelati

La verifica della motilità spermatica nei 60 minuti successivo allo scongelamento (con spermatozoi mantenuti a 10±1°C) ha fatto registrare i risultati riportati in Figura 33 (sono mostrati solo i valori di motilità spermatica dopo un'ora dallo scongelamento poiché i controlli intermedi hanno fatto registrare valori di motilità statisticamente simili, $p < 0,05$, a quelli registrati allo scongelamento).

I crioprotettivi hanno mostrato effetti differenti sulla durata della motilità spermatica post-scongelamento: se infatti il DMSO e il MetOH non sono stati in grado di garantire agli spermatozoi il mantenimento della motilità mostrata subito dopo lo scongelamento, l'EG ha permesso agli spermatozoi di mantenere per almeno 60 minuti la motilità registrata allo scongelamento.

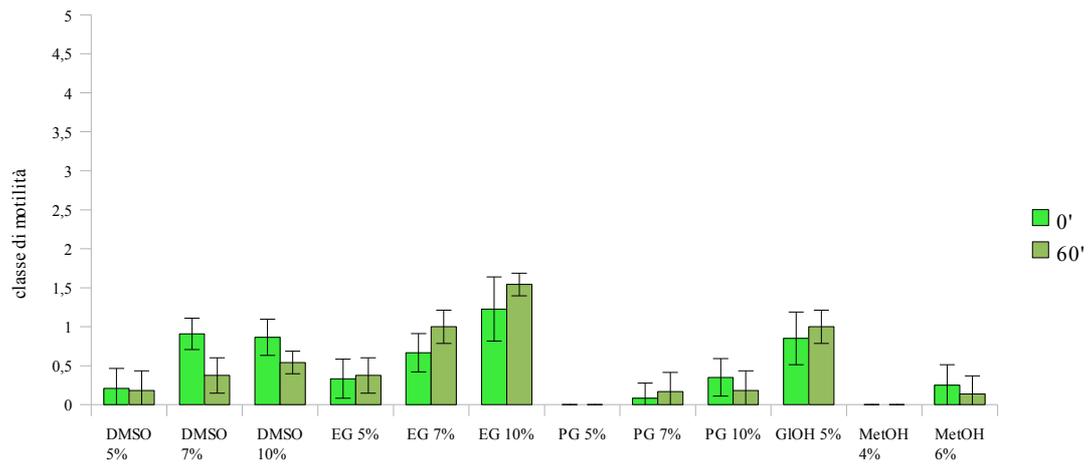


Figura 33. Motilità spermatica registrata 60 minuti dopo lo scongelamento mantenendo gli spermatozoi a $10\pm^{\circ}\text{C}$.

Paracentrotus lividus

Acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico

Analisi del pattern di motilità del seme fresco

L'andamento della motilità di spermatozoi di *Paracentrotus lividus* attivati subito dopo la costituzione del pool (t_0) è riportato in Figura 34.

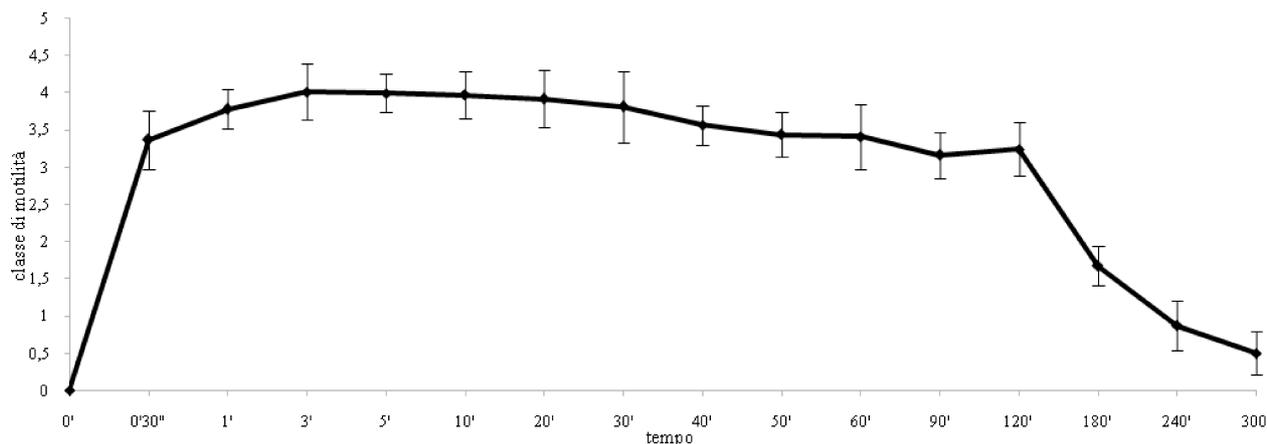


Figura 34. Andamento della motilità di spermatozoi di *Paracentrotus lividus* attivati subito dopo la formazione del pool (t_0) e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Gli spermatozoi, addizionati con acqua di mare, hanno raggiunto intensità di motilità superiori a classe 3 già 30 secondi dopo l'attivazione ed hanno mantenuto tali livelli qualitativi (con valori massimi superiori a classe 4) per quasi 120 minuti, subendo in seguito una graduale riduzione della motilità spermatica e facendo registrare 300 minuti dopo l'attivazione la presenza di una minima percentuale di spermatozoi RVL (classe 0,5).

In Tabella VII sono riassunti i parametri della motilità relativi al seme attivato subito dopo il prelievo.

Parametro	Attivazione a t_0
Tempo di attivazione	1'
Massima motilità	$4,01\pm 0,37$
Durata della massima motilità	120'
Durata totale della motilità	>300'

Tabella VII. Parametri della motilità del seme attivato subito dopo la formazione del pool (t_0) e mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a differenti regimi termici

La prova di mantenimento del seme secco a differenti temperature ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) per 3 ore ha fatto registrare, a seguito dell'attivazione, gli andamenti della motilità spermatica riportati in Figura 35.

La conservazione a secco per 3 ore, a tutti i regimi termici testati, ha indotto valori di massima motilità spermatica risultati significativamente più bassi rispetto al controllo ($p < 0,05$), costituito dal

seme attivato subito dopo il prelievo biotico. Comunque, lo stoccaggio a secco non ha indotto grosse alterazioni dell'andamento della motilità spermatica, indipendentemente dal regime termico di mantenimento: se infatti differenze tra i tre trattamenti sono state registrate nella classe all'attivazione (3 quando il seme è stato mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$, 2 negli altri due casi), la conservazione a tutti i regimi termici ha indotto valori di massima motilità raggiunti risultati statisticamente simili ($p>0,05$).

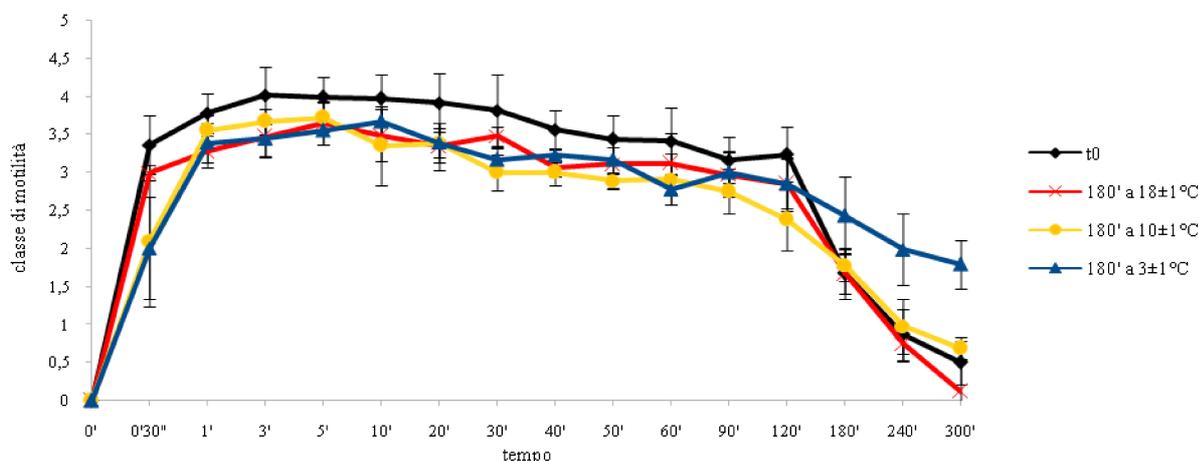


Figura 35. Andamenti della motilità di spermatozoi di *Paracentrotus lividus* mantenuti inattivi per 180 minuti a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) ed inseguito attivati e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$. In nero (t0) l'andamento della motilità degli spermatozoi attivati subito dopo la formazione del pool e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Il mantenimento a differenti regimi termici ha indotto variazioni in termini di durata della motilità superiore uguale a classe 3 e di durata totale della motilità; per questi due parametri, infatti, i migliori risultati sono stati ottenuti mantenendo il seme inattivo a $3\pm 1^\circ\text{C}$, regime termico che ha permesso di estendere, anche rispetto al controllo t0, la durata della motilità spermatica (con valori di motilità, registrati al termine del monitoraggio, superiori a classe 1,5).

In Tabella VIII sono riassunti i parametri della motilità spermatica del seme mantenuto 3 ore ai differenti regimi termici testati

Parametro	180' a $18\pm 1^\circ\text{C}$	180' a $10\pm 1^\circ\text{C}$	180' $3\pm 1^\circ\text{C}$
Tempo di attivazione	3'	3'	3'
Massima motilità	$3,65\pm 0,28$	$3,72\pm 0,25$	$3,67\pm 0,17$
Durata della massima motilità	60'	40'	90'
Durata totale della motilità	240'	300'	>300'

Tabella VIII. Parametri della motilità del seme mantenuto inattivo per 180 minuti a differenti regimi termici a differenti regimi termici ($18\pm 1^\circ\text{C}$, $10\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$) ed inseguito attivati e mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

La verifica della capacità fecondante degli spermatozoi mantenuti inattivi a differenti regimi termici ed in seguito attivati ha fatto registrare i risultati riportati in Figura 36.

La conservazione per 3 ore, indipendentemente dalla temperatura, non ha alterato la capacità fecondante degli spermatozoi: le percentuali di fecondazione ottenute, infatti, sono risultate statisticamente omogenee al controllo, con valori sempre superiori all'80%.

Anche le differenze in termini di percentuale di plutei normoformati tra i diversi trattamenti sono

risultate statisticamente non significative ($p > 0,05$).

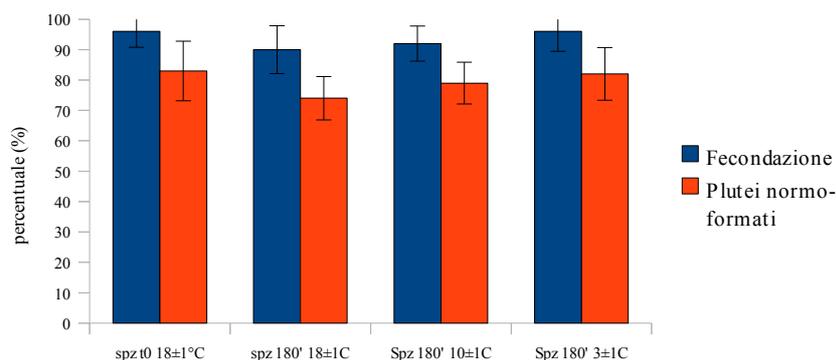


Figura 36. Capacità fecondante degli spermatozoi attivati dopo 180 minuti di conservazione a secco a differenti regimi termici (18±1°C, 10±1°C e 3±1°C).

Selezione degli agenti crioprotettivi

La prova preliminare di fecondazione in presenza della massima concentrazione di crioprotettivo utilizzata nelle prove di tossicità con gli spermatozoi (10-20% per gli spermatozoi, 0,025-0,05% nell'ambiente di fecondazione, 0,005-0,01% nell'ambiente di sviluppo) ha indotto risultati statisticamente non differenti rispetto al controllo ($p > 0,05$) per tutti i crioprotettivi testati, sia in termini di percentuale di fecondazione, sia in termini di percentuale di plutei normoformati (Figura 37).

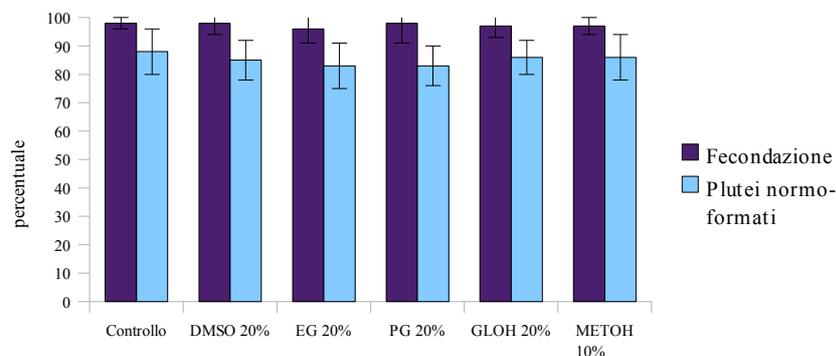


Figura 37. Capacità fecondante degli spermatozoi esposti alle concentrazioni iniziali indicate dei crioprotettivi testati, e relativo corretto sviluppo embrionale.

DMSO

In Figura 38 sono riportati gli effetti dell'incubazione in DMSO sulla motilità e la capacità fecondante di spermatozoi e le percentuali di plutei normoformati ottenuti a seguito della fecondazione.

Il DMSO ha avuto effetti negativi sulla motilità spermatica già alla più bassa concentrazione testata (5%) e dopo soli 10 minuti di incubazione, facendo registrare valori di motilità spermatica inferiori a classe 3. L'effetto tossico è aumentato proporzionalmente sia all'aumentare della concentrazione

sia all'aumentare del tempo di esposizione.

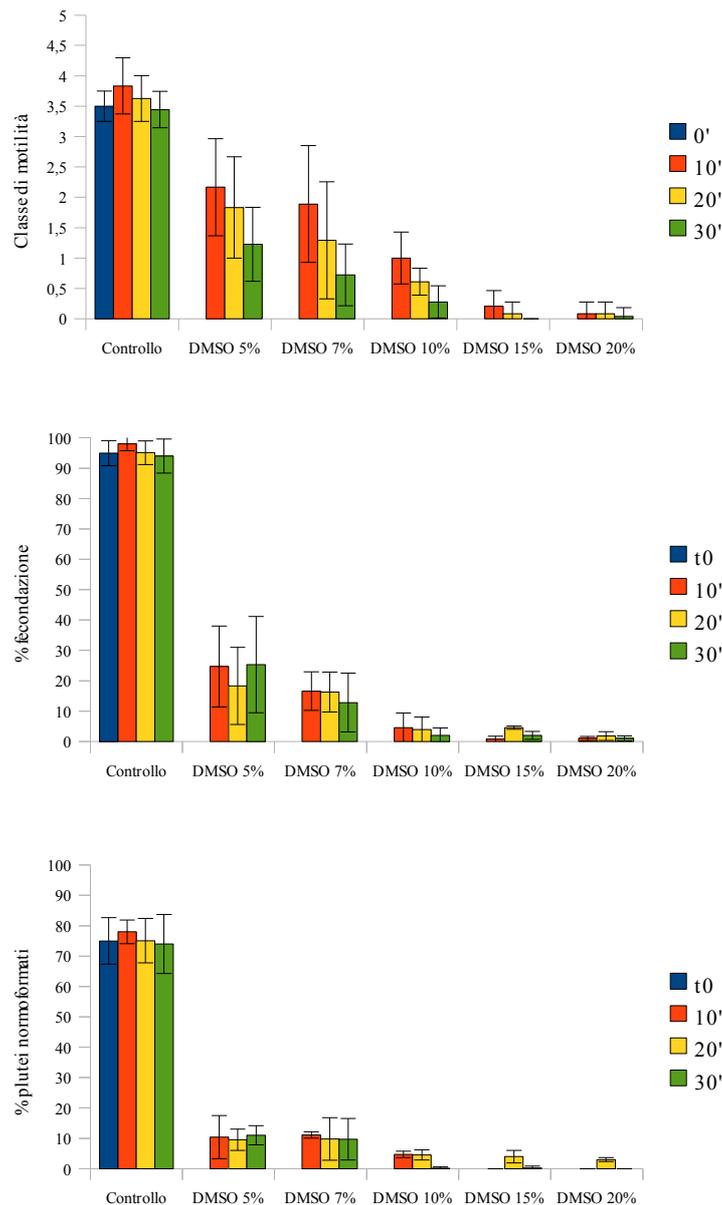


Figura 38. Effetti dell'esposizione degli spermatozoi al DMSO: motilità spermatica in classi, capacità fecondante e sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle fecondazioni.

Gli effetti tossici del DMSO sugli spermatozoi di *Paracentrotus lividus* si sono estesi anche alla loro capacità fecondante: a seguito dell'esposizione al 5% sono stati registrati percentuali di fecondazione inferiori al 50% e l'aumentare della concentrazione di crioprotettivo ha indotto ulteriori riduzioni delle percentuali di fecondazione, mentre l'aumento del tempo di esposizione non ha avuto effetti.

Le prove di sviluppo degli embrioni ottenuti dalle procedure di fecondazione hanno fatto registrare percentuali di plutei normoformati sul totale degli embrioni intorno al 40% solo nel caso di spermatozoi incubati in DMSO 5%; una minima presenza di plutei morfologicamente normali è stata ottenuta con spermatozoi trattati con DMSO 7%, mentre in tutti gli altri casi i livelli di corretto sviluppo embrionale sono stati inferiori al 20%.

EG

Gli effetti dell'incubazione in EG sulla motilità e la capacità fecondante di spermatozoi e le percentuali di plutei normoformati ottenuti a seguito della fecondazione sono riportati in Figura 39.

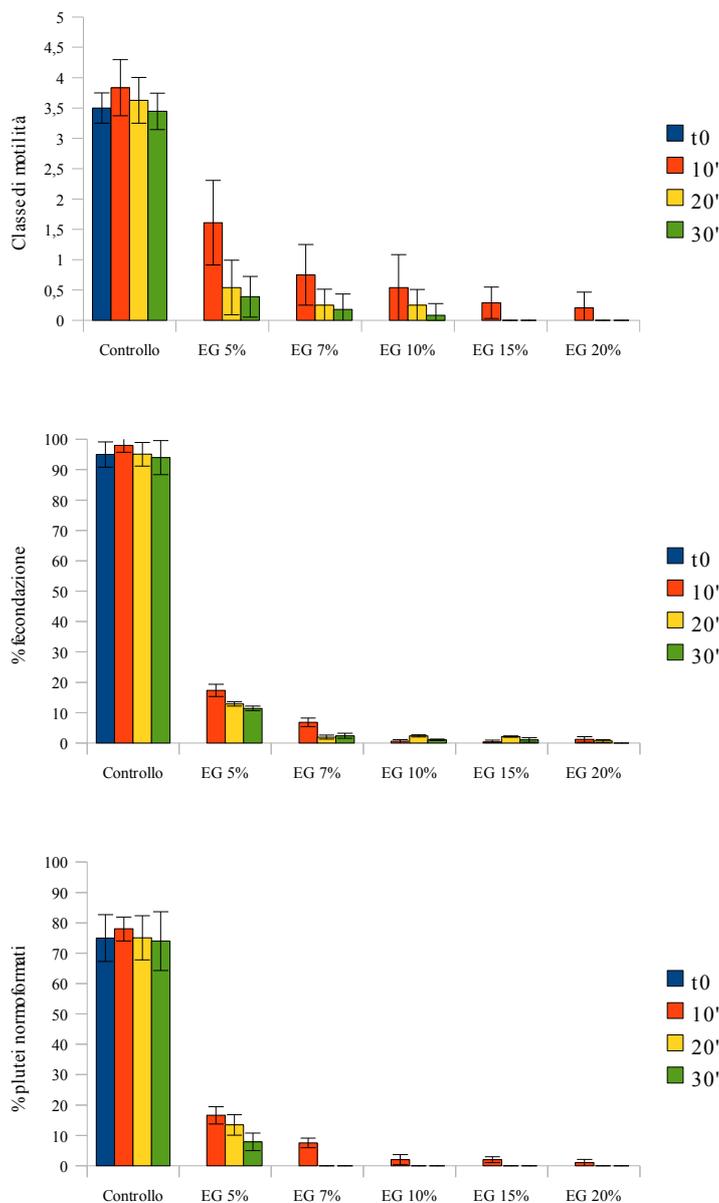


Figura 39. Effetti dell'esposizione degli spermatozoi all'EG: motilità spermatica in classi, capacità fecondante e sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle fecondazioni.

L'EG si è dimostrato per tale sistema biologico estremamente tossico, inducendo elevate riduzioni della qualità spermatica sia in termini di motilità, sia in termini di capacità fecondante già alla più bassa concentrazione testata ed dopo il più breve tempo di incubazione. La tossicità di tale crioprotettivo per gli spermatozoi di *P. lividus* ha avuto effetti anche sugli embrioni ottenuti dalle prove di fecondazione, facendo registrare percentuali di plutei normoformati sempre inferiori al 20%.

PG

In Figura 40 sono riportati gli effetti dell'incubazione in PG sulla motilità e la capacità fecondante di spermatozoi e le percentuali di plutei normoformati ottenuti a seguito della fecondazione.

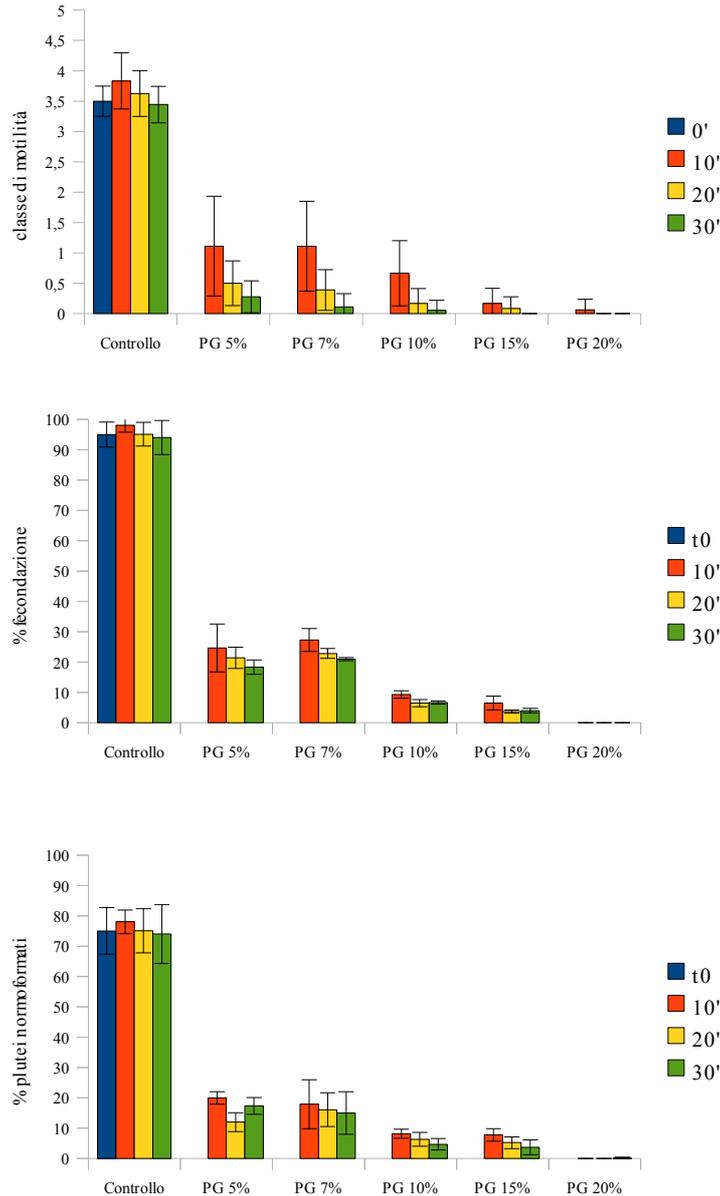


Figura 40. Effetti dell'esposizione degli spermatozoi al PG: motilità spermatica in classi, capacità fecondante e sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle fecondazioni.

Anche l'esposizione al crioprotettivo PG ha indotto riduzioni significative di motilità spermatica, capacità fecondante e percentuale di larve normoformate, già alla più bassa concentrazione testata e dopo 10 minuti di incubazione: l'effetto tossico comunque si è manifestato con maggiore intensità sulla capacità di fecondazione degli spermatozoi, facendo registrare per tale parametro valori che hanno di poco superato il 20%, mentre un minore effetto è stato riscontrato per la motilità spermatica (per la quale l'incubazione per 10 minuti ha fatto registrare una ampia variabilità di risposta) e per lo sviluppo a larve normoformate (con valori di plutei morfologicamente normali che, nel caso di PG 5% e 7%, hanno raggiunto il 20%).

GIOH

Gli effetti dell'incubazione in GIOH sulla motilità e la capacità fecondante di spermatozoi e le percentuali di plutei normoformati ottenuti a seguito della fecondazione sono riportati in Figura 41.

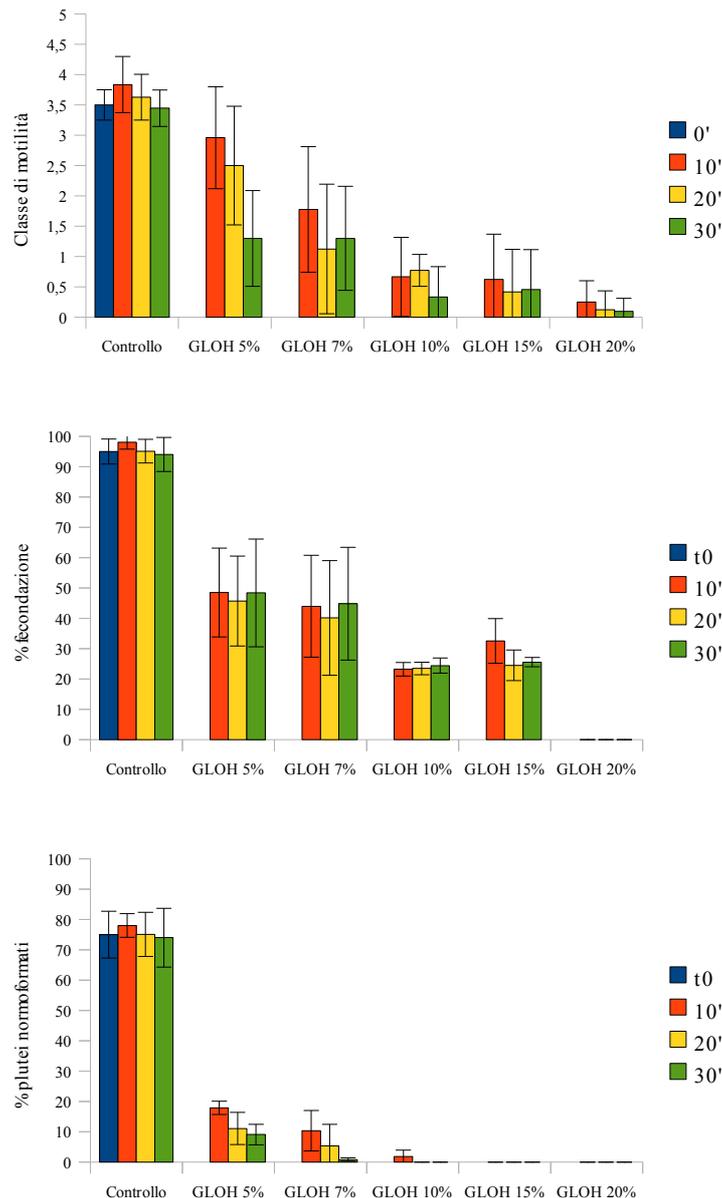


Figura 41. Effetti dell'esposizione degli spermatozoi al GLOH: motilità spermatica in classi, capacità fecondante e sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle fecondazioni.

L'esposizione degli spermatozoi di *Paracentrotus lividus* a tale crioprotettivo ha indotto una ampia variabilità di risposta in termini di motilità spermatica, con valori molto elevati di deviazioni standard. Tale crioprotettivo alle concentrazioni 5% e 7% ha fatto registrare riduzioni della motilità spermatica crescenti all'aumentare del tempo di incubazione, mentre l'aumento della concentrazione (al 10%) ha indotto risposte che sono diventate costanti all'aumentare del tempo di incubazione. Anche in termini di capacità fecondante le perdite più contenute rispetto al controllo sono state registrate con le concentrazioni più basse, con una risposta, in questo caso, costante all'aumentare del tempo di esposizione. Effetti tossici sono stati registrati per la percentuale di plutei normoformati che è sempre stata inferiore al 20%.

MetOH

In Figura 42 sono riportati gli effetti dell'incubazione in MetOH sulla motilità e la capacità

fecondante di spermatozoi e le percentuali di plutei normoformati ottenuti a seguito della fecondazione.

L'esposizione degli spermatozoi al metanolo ha fatto registrare, rispetto a quanto ottenuto con gli altri crioprotettivi, riduzioni meno marcate rispetto ai controlli per tutti i parametri analizzati. In particolare, gli spermatozoi esposti alla concentrazione 4% hanno mostrato anche per il tempo di incubazione più elevato valori di motilità spermatica superiori a classe 2, mentre le percentuali di fecondazione e sviluppo a pluteo normoformato sono risultate statisticamente comparabili ($p > 0,05$) a quelle di controllo, con una costanza di risposta all'aumentare del tempo di incubazione.

Il raddoppio della concentrazione (dal 4% all'8%) ha indotto perdite di motilità statisticamente più significative, che sono aumentate all'aumentare del tempo di incubazione; anche per i parametri capacità fecondante e sviluppo a pluteo normoformato, le perdite a seguito dell'incubazione in MetOH 8% sono risultate più elevate, anche se tali perdite sono risultate meno significative rispetto a quelle registrate con gli altri crioprotettivi testati.

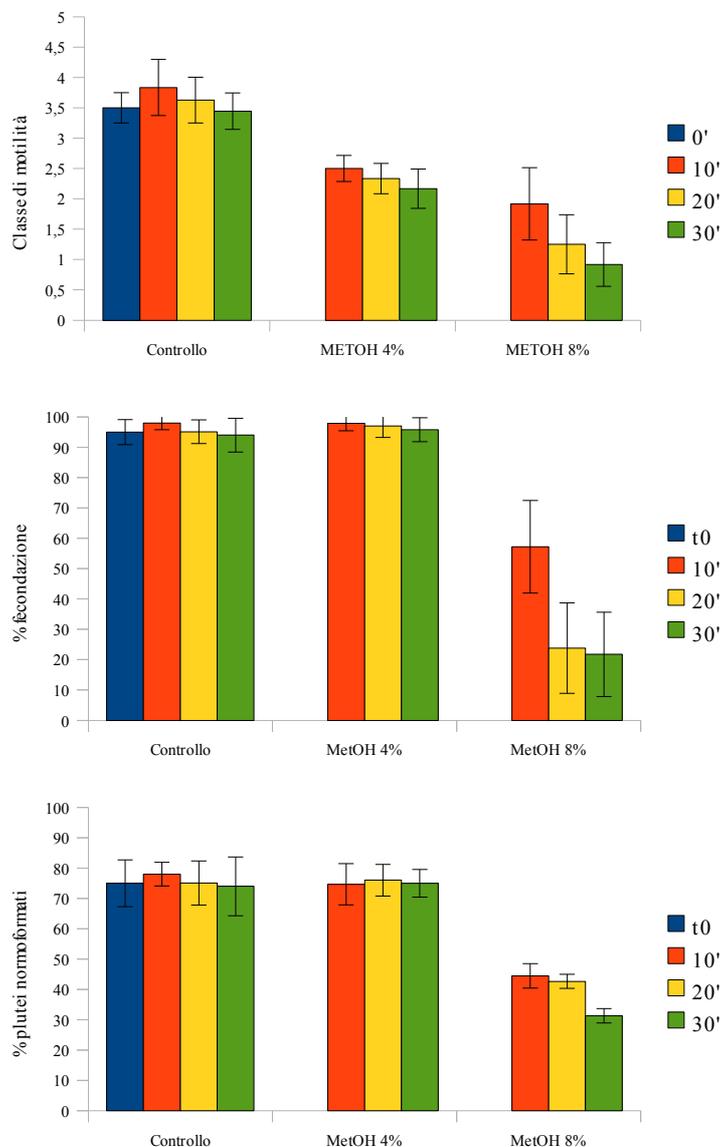


Figura 42. Effetti dell'esposizione degli spermatozoi al MetOH: motilità spermatica in classi, capacità fecondante e sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle fecondazioni.

Alla luce dei risultati ottenuti i crioprotettivi selezionati per le fasi successive della sperimentazione sono stati DMSO 5%, PG 5%, GIOH 5%, GIOH 7%, MetOH 4% e MetOH 6%, che, rispetto alle concentrazioni non incluse, hanno mostrato una minore tossicità.

Selezione del gradiente di Adattamento/Raffreddamento

I valori di motilità spermatica di spermatozoi addizionati con i crioprotettivi selezionati nella fase precedente ed adattati secondo i due i gradienti di adattamento/raffreddamento (A/R) testati, sono riportati di seguito.

A/R n. 1: (10' a 10±1°C)

L'incubazione degli spermatozoi con i crioprotettivi per 10 minuti a 10±1°C ha fatto registrare i valori di motilità spermatica, percentuale di fecondazione e percentuale di sviluppo a plutei normoformati riportati in Figura 43.

Il mantenimento degli spermatozoi a 10±1°C ha indotto riduzioni significative della motilità spermatica rispetto al controllo t0 anche in assenza di crioprotettivo (Controllo A/R n.1), mentre le percentuali di fecondazione e sviluppo non sono state alterate dal mantenimento a 10±1°C. L'incubazione in presenza di crioprotettivo ha indotto perdite di motilità spermatica rispetto al controllo A/R n.1 meno marcate nel caso di MetOH (4% e 8%) ed a seguire GIOH (5 % e 10%), mentre elevate riduzioni sono state registrate quando gli spermatozoi sono stati incubati in DMSO 5% e PG 5%.

In termini di percentuali di fecondazione e di sviluppo a plutei normoformati, l'incubazione in MetOH ha confermato risultati migliori rispetto agli altri crioprotettivi testati: in particolare l'aggiunta di MetOH 4% ha indotto una riduzione significativa della percentuale di fecondazione ma valori di sviluppo a plutei normoformati statisticamente non differenti dal controllo.

Tutti gli altri crioprotettivi hanno fatto registrare elevate perdite di capacità fecondante e di sviluppo a larve morfologicamente normali.

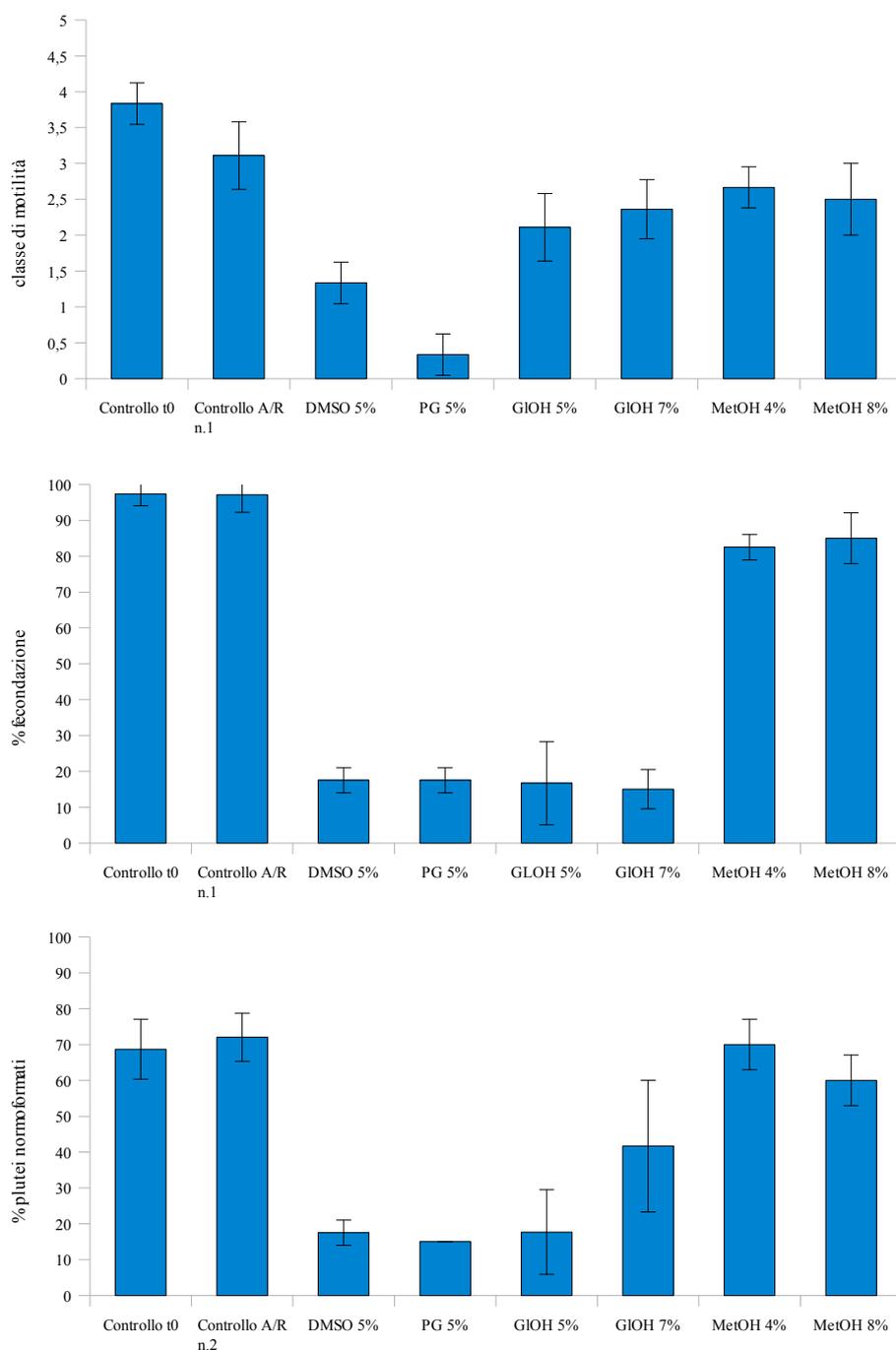


Figura 43. Effetti del gradiente di adattamento/raffreddamento A/R n.1 (10' a 10±1°C): motilità spermatica in classi, capacità fecondante e sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle fecondazioni.

A/R n. 2: (10' a 18±1°C)

In Figura 44 sono riportati gli effetti indotti dall'incubazione degli spermatozoi con i crioprotettivi selezionati per 10 minuti a 18±1°C.

Tale adattamento ha indotto le minori perdite di motilità spermatica in presenza di GIOH 5% ed a seguire MetOH 4%, DMSO 5%, MetOH 8% e GIOH 7%, mentre, in termini di percentuale di fecondazione i migliori risultati sono stati ottenuti trattando gli spermatozoi con MetOH 4%, che ha indotto valori statisticamente non differenti dal controllo ($p>0,05$).

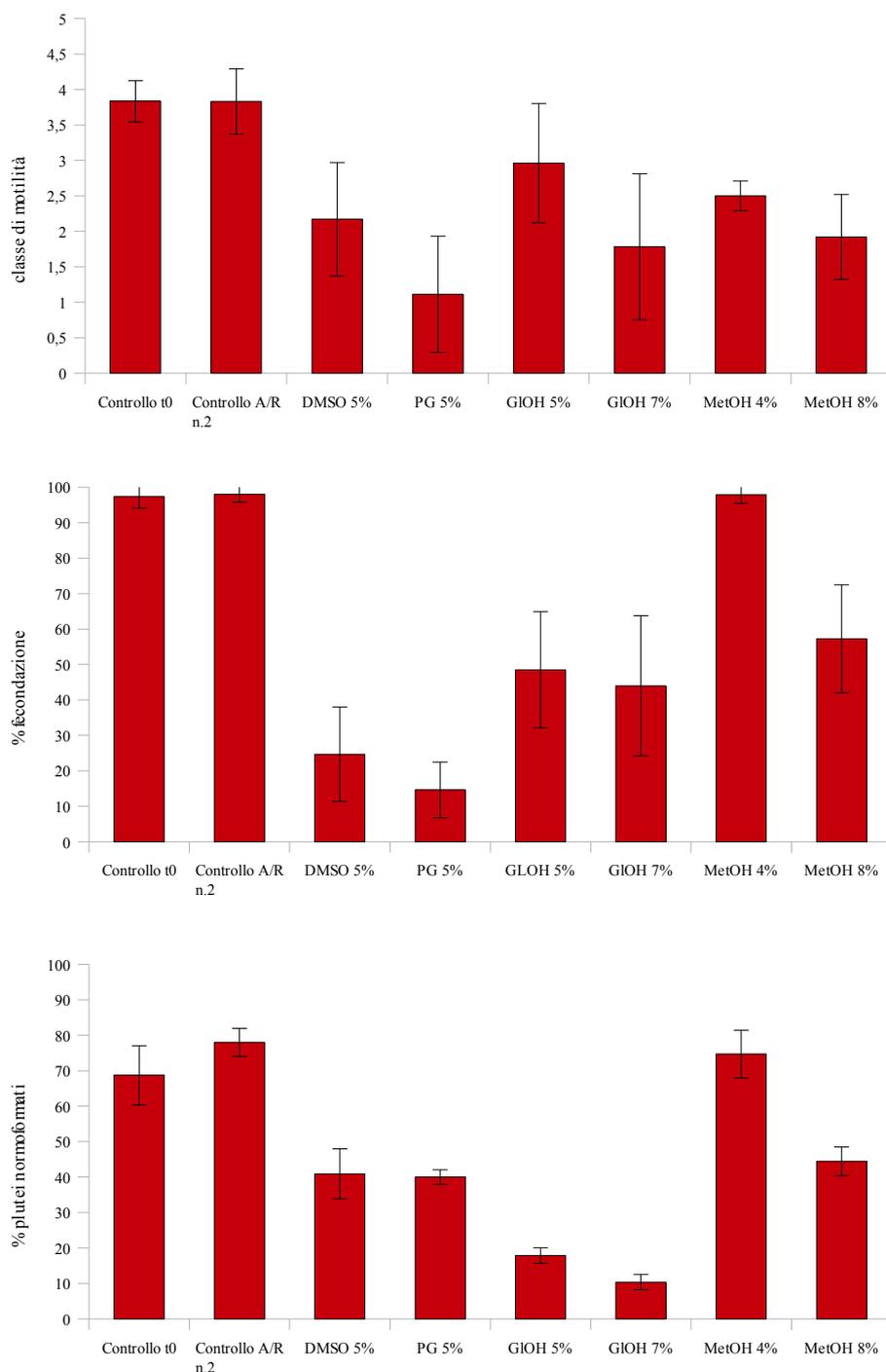


Figura 44. Effetti del gradiente di adattamento/raffreddamento A/R n.1 (10' a 10±1°C): motilità spermatica in classi, capacità fecondante e sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle fecondazioni.

MetOH 8% e GIOH ad entrambe le concentrazioni testate hanno fatto registrare un dimezzamento della percentuale di fecondazione, mentre valori inferiori al 40% di fecondazione sono stati ottenuti incubando gli spermatozoi in DMSO 5% e PG 5%.

In termini di sviluppo a plutei normoformati degli embrioni ottenuti dalle procedure di fecondazione, i migliori risultati sono stati ottenuti, anche in questo caso, con il MetOH 4%, che ha fatto registrare variazioni non significative rispetto al controllo ($p > 0,05$), mentre le percentuali di plutei normoformati registrate in tutti gli altri trattamenti sono state sempre inferiori al 50%.

Sulla base dei differenti risultati ottenuti con in due trattamenti di Adattamento /Raffreddamento testati, che nel caso del MetOH 4% si sono dimostrati entrambi efficaci nel permettere al sistema biologico di mantenere le proprie caratteristiche qualitative, si è deciso di non effettuare una selezione tra i due gradienti, bensì di utilizzarli entrambi per testare le curve di congelamento.

Per quanto riguarda la tipologia di crioprotettivo, è stato deciso di non scartare quelli che hanno dato scarsi risultati dopo i trattamenti A/R, per verificare se, nonostante abbiano indotto riduzioni significative della qualità degli spermatozoi durante la fase di adattamento, non potessero comunque avere un effetto protettivo durante il congelamento.

Selezione della curva di congelamento

A/R n.1

Nelle Figure 45 e 46 sono riportati i risultati di motilità spermatica registrati sottoponendo gli spermatozoi, addizionati con i crioprotettivi selezionati e raffreddati secondo i due gradienti A/R, a differenti gradienti di congelamento.

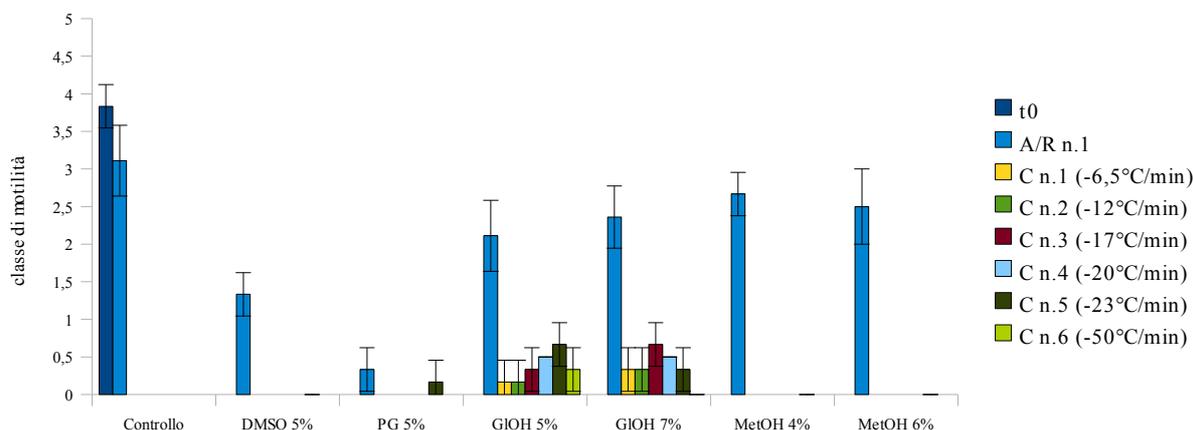


Figura 45. Motilità post-scongelo di spermatozoi adattati ai crioprotettivi secondo il gradiente A/R n.1 e sottoposti a differenti gradienti di congelamento (C).

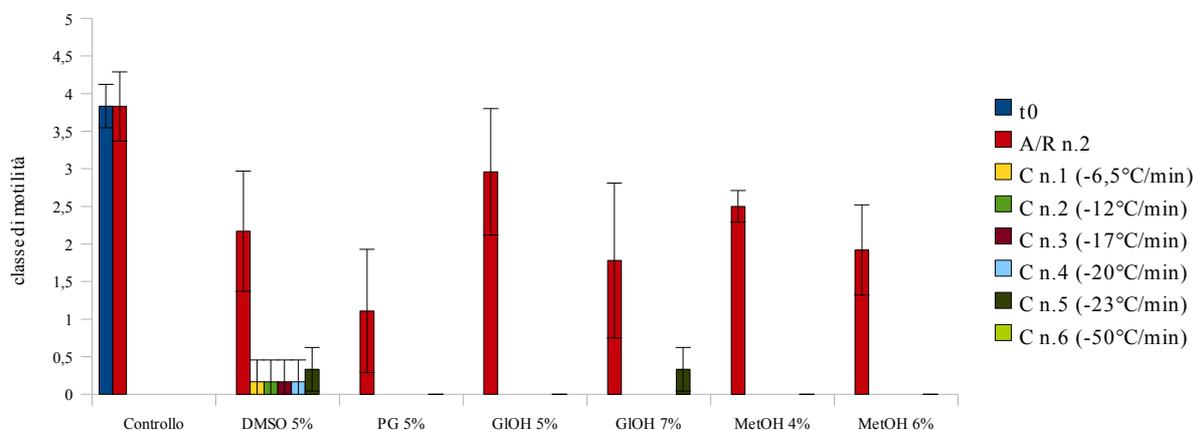


Figura 46. Motilità post-scongelo di spermatozoi adattati ai crioprotettivi secondo il gradiente A/R n.2 e sottoposti a differenti gradienti di congelamento (C).

Tutti i gradienti di congelamento testati, indipendentemente dal tipo di adattamento/raffreddamento effettuato, hanno fatto registrare, allo scongelamento, valori di motilità spermatica sempre inferiori a classe 1 (10% di spermatozoi RVL). Tutti le condizioni testate comunque non hanno preservato la capacità fecondante degli spermatozoi (grafici di fecondazione e sviluppo embrionale non presentati).

Tuttavia da notare sono le differenze riscontrate con i differenti crioprotettivi, in base alla curva A/R utilizzata: l'adattamento/raffreddamento a $10\pm 1^{\circ}\text{C}$ ha fatto registrare allo scongelamento i migliori risultati di motilità spermatica in presenza di GIOH, mentre l'adattamento condotto a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ha indotto la presenza di spermatozoi RVL, seppur in bassissima percentuale, nel caso del DMSO 5%. Confrontando i risultati ottenuti con le differenti curve di congelamento testate si evince che sia per il DMSO 5% che per il GIOH 7% il gradiente che ha fatto registrare i migliori risultati è stato il C n.5 ($-23^{\circ}\text{C}/\text{min}$), mentre, per il GIOH 5% il gradiente relativamente più efficace è stato il C n.3 ($-17^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Il MetOH, che, con entrambe le tipologie di adattamento testate, era stato il crioprotettivo che aveva fatto registrare risultati più positivi, si è dimostrato incapace di svolgere una funzione di difesa dai danni indotti della procedura di congelamento.

Ostrea edulis

Ottimizzazione delle conoscenze sul sistema biologico

Effetto della temperatura sulla motilità spermatica

In Figura 47 a sono mostrate le classi di motilità degli spermatozoi attivati subito dopo la costituzione del pool e mantenuti a differenti regimi termici.

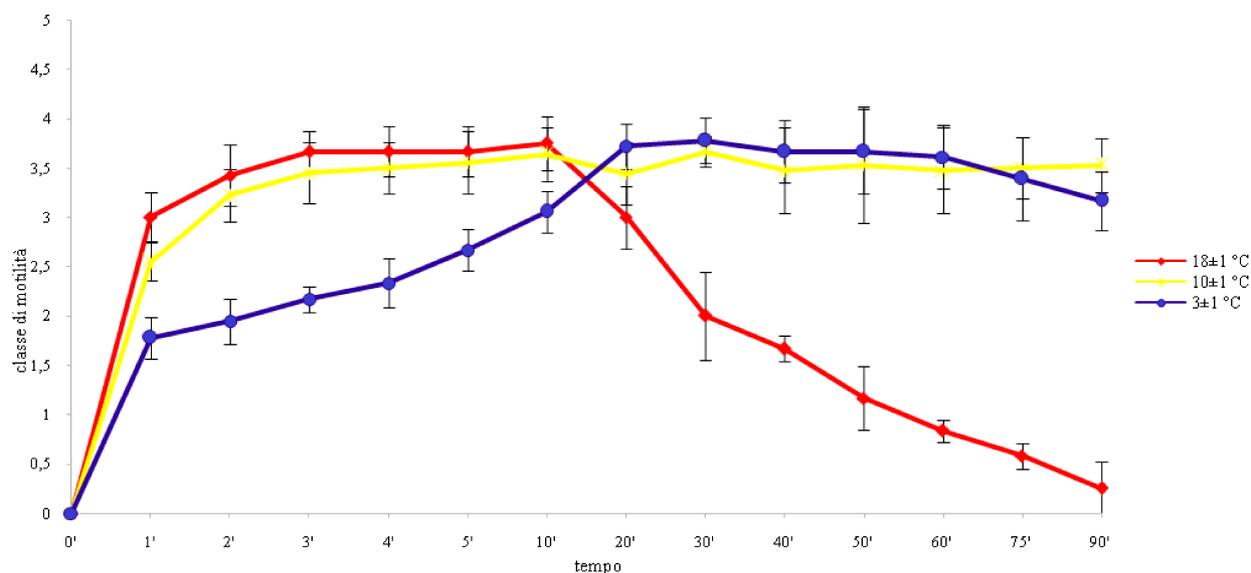


Figura 47. Andamento della motilità di spermatozoi di *Ostrea edulis* attivati subito dopo il prelievo biotico e mantenuti a differenti regimi termici (18±1°C, 10±1°C e 3±1°C).

L'aliquota di seme mantenuta a 18±1 °C ha fatto registrare la sua massima motilità spermatica (classe 3,5) 5 minuti dopo l'attivazione, ma la motilità è rapidamente scesa perdendo una classe di motilità 20 minuti dopo l'attivazione.

Gli spermatozoi mantenuti a 10±1 °C hanno raggiunto classe 3,5 dopo 5 minuti ed hanno mantenuto tale livello di motilità per tutta la durata del monitoraggio (90 minuti).

Al regime termico 3±1 °C gli spermatozoi hanno raggiunto la loro massima motilità solo 20 minuti dopo l'attivazione, mantenendo tale motilità per 45 minuti e raggiungendo classe 3 90 minuti dopo l'attivazione.

Effetto della conservazione del seme secco a differenti regimi termici sulla motilità spermatica

Le Figure 48 e 49 mostrano l'andamento della motilità del seme mantenuto inattivo per 120 e 180 minuti ai regimi termici testati, attivato e poi mantenuto allo stesso regime termico di conservazione pre-attivazione.

Per il seme mantenuto a 18±1°C l'attivazione effettuata un'ora dopo il prelievo ha fatto registrare un crollo della motilità (classe 0,5), mentre all'attivazione effettuata 3 ore dopo la raccolta gli spermatozoi sono risultati immobili.

Al regime termico 10±1°C le attivazioni effettuate un'ora e tre ore dopo il prelievo hanno fatto registrare un risultato statisticamente simile all'attivazione effettuata subito dopo la costituzione del pool (0h, Figura 47) sia in termini di motilità massima raggiunta che in termini di andamento nel tempo ($p>0,05$).

Nel caso del seme mantenuto a 3±1 °C nessuna differenza significativa nell'andamento della

motilità è stata registrata con le attivazioni effettuate un'ora e tre ore dopo il prelievo ($p > 0,05$) rispetto al seme subito attivato subito dopo la costituzione del pool (0h, Figura 47).

La motilità degli spermatozoi attivati a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ crolla nell'arco di 20 minuti. Tale tempo risulta insufficiente per la conduzione dei test di selezione dei crioprotettivi, considerando che le procedure utilizzabili per il congelamento sono condotte in un tempo di circa 30 minuti,. Pertanto tale regime termico è stato scartato per le fasi successive. Poiché la curva a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ha mostrato una variabilità al limite della significatività a partire dal minuto 40, per principio di precauzione, non essendovi differenze tra le curve di motilità presentate tra $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $3 \pm 1^\circ\text{C}$, si è preferito utilizzare questo regime termico per la conservazione del seme, per una più comoda gestione del sistema biologico nelle fasi successive.

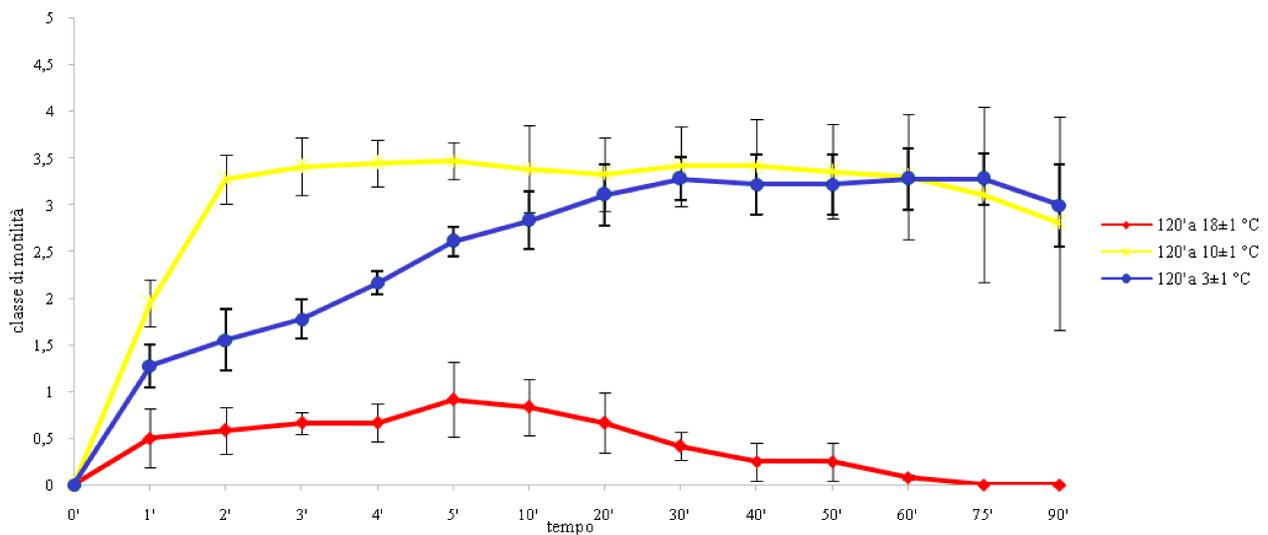


Figura 48. Andamento della motilità di spermatozoi di *Ostrea edulis* mantenuti inattivi per 120 minuti a differenti regimi termici ($18 \pm 1^\circ\text{C}$, $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $3 \pm 1^\circ\text{C}$), in seguito attivati e mantenuti allo stesso regime termico di conservazione pre-attivazione.

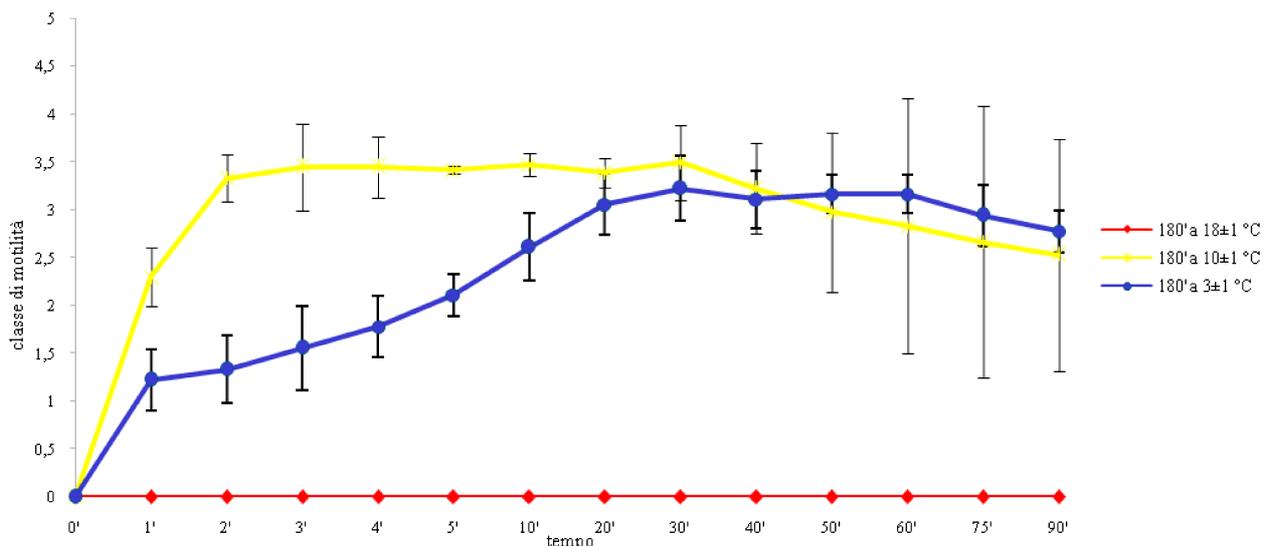


Figura 49. Andamento della motilità di spermatozoi di *Ostrea edulis* mantenuti inattivi per 180 minuti a differenti regimi termici ($18 \pm 1^\circ\text{C}$, $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e $3 \pm 1^\circ\text{C}$), in seguito attivati e mantenuti allo stesso regime termico di conservazione pre-attivazione.

Ottimizzazione della curva di Congelamento per nunc da 2mL

In Figura 50 sono riportati i risultati in termini di motilità spermatica registrati dopo il congelamento del seme con i differenti gradienti di congelamento testati.

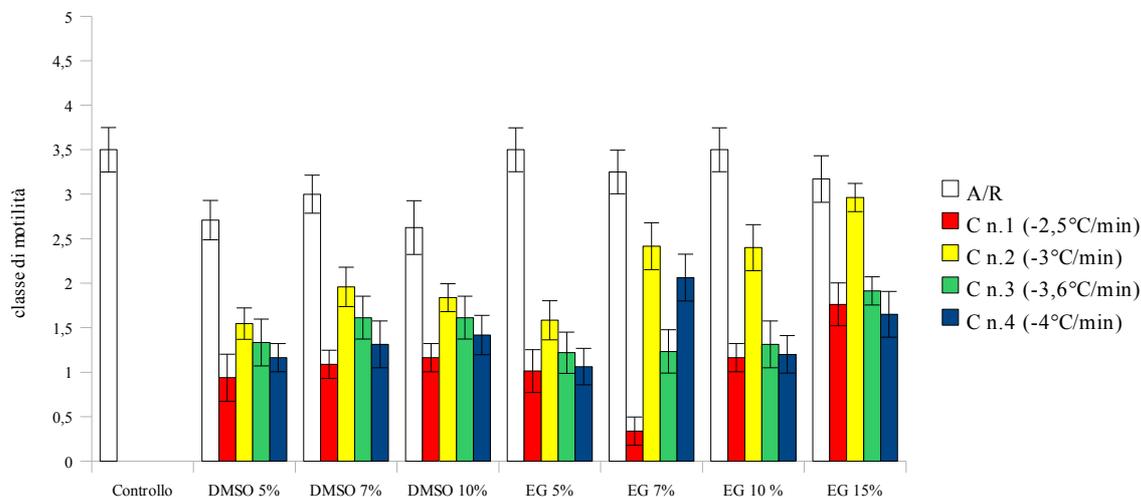


Figura 50. Motilità post-scongelo di spermatozoi sottoposti a differenti gradienti di congelamento (C).

Il congelamento degli spermatozoi con tutti i gradienti ed i crioprotettivi testati ha fatto registrare una generale riduzione delle motilità spermatica significativa rispetto al controllo ($p < 0,05$).

Comunque, il gradiente $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in presenza dell'EG 15% ha fatto registrare una motilità post-scongelo pari a classe 3: gli spermatozoi criopreservati mediante tali condizioni hanno mostrato allo scongelamento una buona motilità, con elevate percentuali (50%) di esemplari con movimento rapido, vigoroso e lineare (RVL).

Confronto tra i risultati post-scongelo ottenuti con paillettes e nunc

In Figura 51 sono riportati i valori di motilità registrati subito dopo lo scongelamento con le curve di congelamento ottimizzate per i differenti contenitori criogenici (paillettes e nunc).

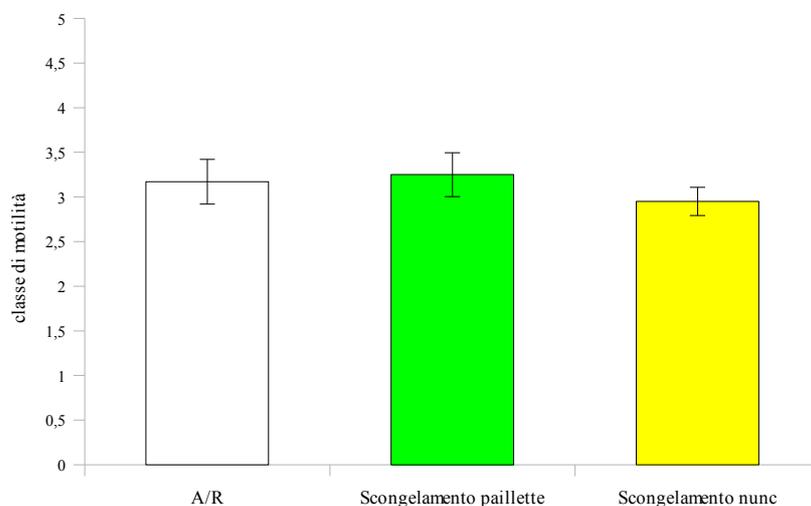


Figura 51. Motilità post-scongelo ottenute con paillette e nunc (EG 15%),

La differenza registrata tra motilità post-scongelo paillette e la motilità post-Adattamento/Raffreddamento è risultata statisticamente non significativa ($p>0,05$).

Tale risultato potrebbe indurre concludere che la curva ottimizzata con le paillette è risultata più efficace rispetto alla curva che ha dato i migliori risultati con i nunc.

Tuttavia dal monitoraggio della motilità nel tempo degli spermatozoi scongelati è emerso che gli spermatozoi criopreservati in nunc hanno mostrato una maggiore durata della motilità rispetto al seme congelato in paillette (Figura 52), con migliori performances in termini di durata di classe di motilità maggiore di 3 e durata totale della motilità (Tabella IX).

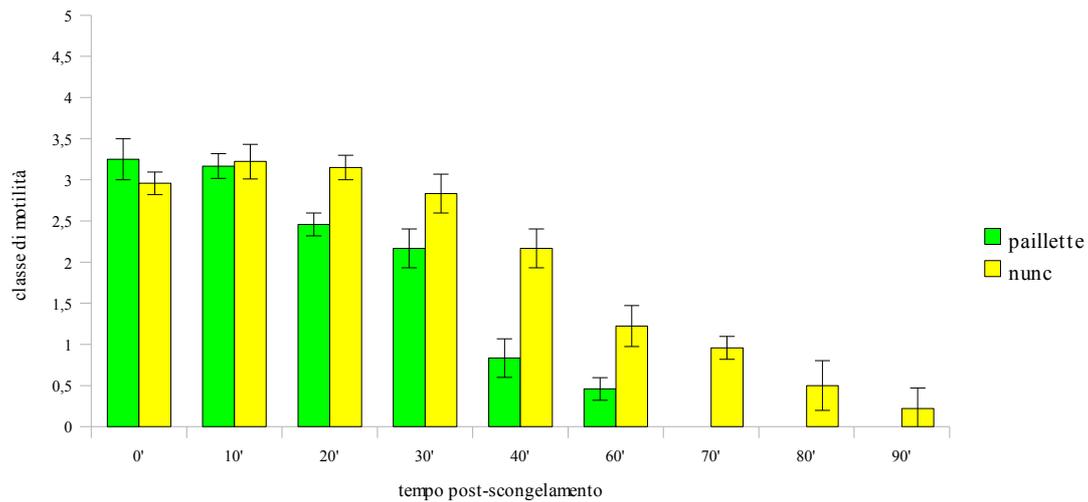


Figura 52. Motilità post-scongelo di spermatozoi di *Ostrea edulis* mantenuti a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Parametro	Paillette	Nunc
Massima motilità	$3,25\pm 0,25$	$3,22\pm 0,21$
Durata della massima motilità	10'	20'
Durata totale della motilità	60'	90'

Tabella IX. Parametri della motilità del seme scongelato di *Ostrea edulis* mantenuto a $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Fase B. Validazione della qualità dei gameti prodotti in sistemi RAS (Recirculating Aquaculture Systems) mediante l'applicazione di protocolli di criopreservazione standardizzati

Mytilus galloprovincialis

Spermatozoi

L'applicazione del protocollo di criopreservazione messo a punto da Di Matteo et al (2009) su spermatozoi ottenuti in RAS presso la Stazione Sperimentale CRIAcq di Salerno ha portato ai risultati, espressi in termini di motilità e capacità fecondante degli spermatozoi scongelati, nonché di sviluppo a larve D normoformate degli embrioni ottenuti dalla fecondazione con ovociti freschi, riportati nella Figura 53.

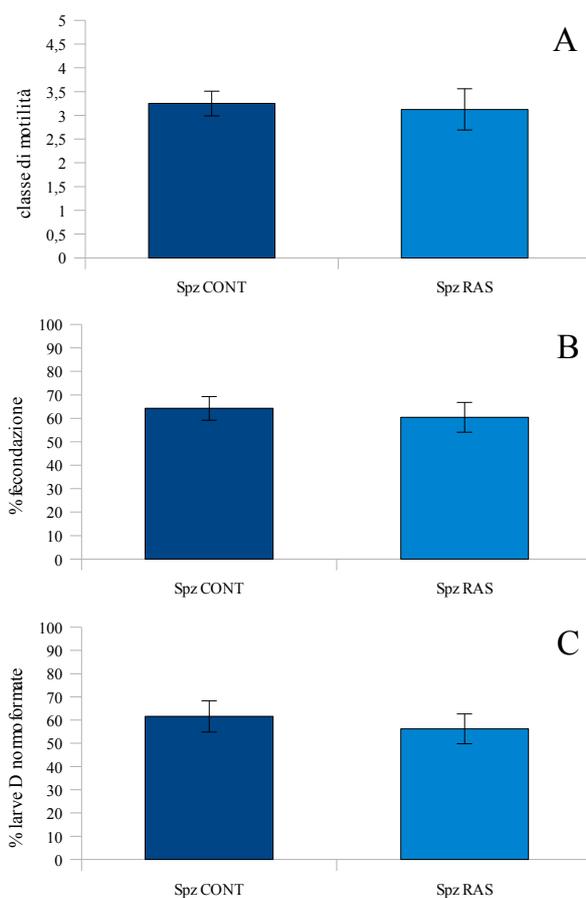


Figura 53. Spermatozoi criopreservati di *Mytilus galloprovincialis*: motilità (A), capacità fecondante (B) e sviluppo a larve D normoformate (C) in spermatozoi prodotti in RAS (Spz RAS) e spermatozoi ottenuti da organismi allevati a mare (Spz CONT).

Gli spermatozoi ottenuti da organismi maturati in RAS system presso il CRIAcq (Spz RAS) e sottoposti alla procedura di criopreservazione hanno fatto registrare allo scongelamento una motilità spermatica intorno a classe 3 ($3,13 \pm 0,43$, corrispondente al 50% di spermatozoi RVL) e una buona capacità fecondante, con tassi di fecondazione superiori al 50% ($54,42 \pm 6,39\%$), mostrando una risposta alla criopreservazione comparabile a quella registrata da Di Matteo et al 2009. La valutazione dello sviluppo degli embrioni ottenuti dalla procedura di fecondazione ha fatto registrare tassi di larve D normoformate intorno al 50% ($54,33 \pm 6,41\%$).

Per tutti i parametri analizzati gli spermatozoi ottenuti in RAS system hanno fatto registrare un tasso di criopreservabilità statisticamente non differente rispetto agli spermatozoi reperiti da aziende produttive ($p>0,05$).

Trocofore

I risultati di motilità post-scongelo e sviluppo larvale di trocofore ottenute in RAS system (Trc RAS) e di trocofore ottenute da organismi reperiti da allevamenti (Trc CONT) sono riportati in Figura 54.

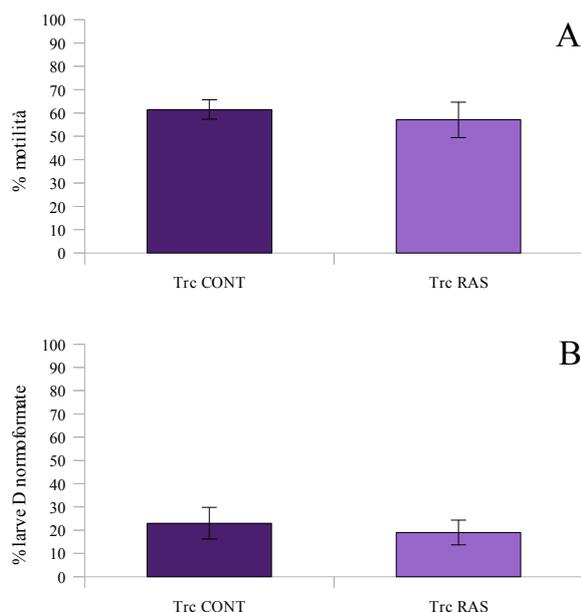


Figura 54. Trocofore criopreservate di *Mytilus galloprovincialis*: motilità (A) e sviluppo a larve D normoformate (B) post-scongelo di trocofore ottenute da organismi maturati in RAS (Trc RAS) e di trocofore ottenute da organismi reperiti da allevamenti (Trc CONT).

Le trocofore prodotte in RAS (Trc RAS) hanno mostrato allo scongelamento buoni tassi di motilità ($57,08\pm 7,6$); alla valutazione post-sviluppo a larva D sono invece stati registrati bassi tassi di larve normoformate ($19\pm 5,34$ %) così come per le trocofore ottenute da organismi allevati in mare (trc CONT).

Per entrambi i parametri analizzati, comunque, la risposta alla criopreservazione delle trocofore RAS è risultata comparabile a quella registrata con le trocofore controllo, con differenze statisticamente non significative ($p>0,05$).

Crassostrea gigas

Spermatozoi

In Figura 55 sono riportati i risultati in termini di motilità e capacità fecondante post-scongelo di spermatozoi di *Crassostrea gigas* ottenuti da organismi maturati presso il RAS system del CRIACq (Spz RAS) e da organismi reperiti da aziende produttive (Spz CONT).

Gli spermatozoi RAS scongelati hanno fatto registrare una motilità spermatica pari a $2,96\pm 0,45$

(corrispondente a valori di spermatozoi RVL intorno al 50%) e tassi di fecondazione e sviluppo a larva D normoformata rispettivamente di $63,00 \pm 9,99\%$ e $56,33 \pm 6,41\%$). Il risultato in termini di sviluppo larvale è comparabile a quanto riportato da Ieropoli et al (2004).

Per tutti parametri analizzati le differenze tra i risultati ottenuti con spermatozoi Spz RAS e spermatozoi Spz CONT sono risultate statisticamente non significative ($p > 0,05$).

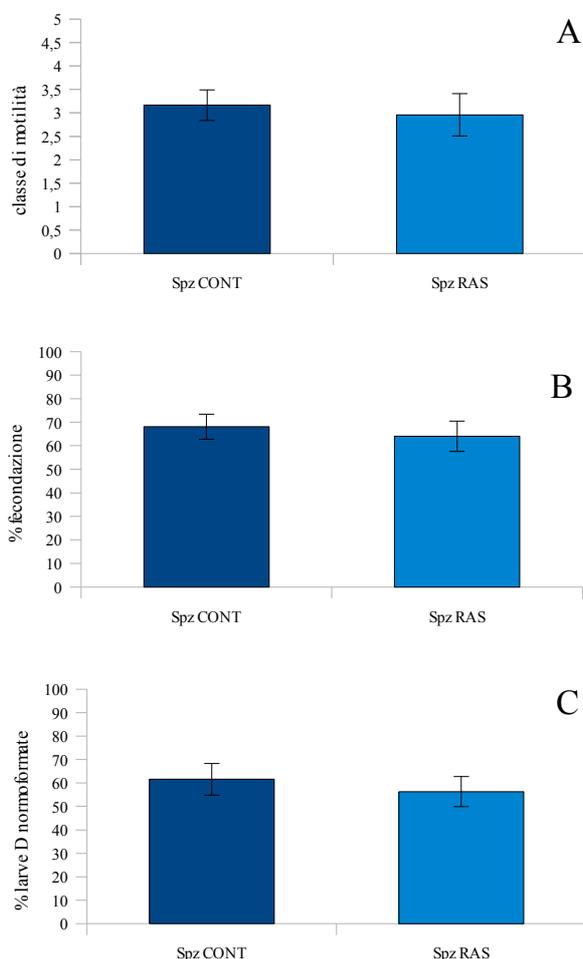


Figura 55. Spermatozoi criopreservati di *Crassostrea gigas*: motilità (A), capacità fecondante (B) e sviluppo a larve D normoformate (C) di spermatozoi ottenuti da organismi maturati presso il CRIAcq (Spz RAS) e spermatozoi ottenuti da organismi reperiti da allevamenti (Spz CONT).

Ovociti

I risultati ottenuti applicando il protocollo di criopreservazione messo a punto da Tervit et al (2005) sono riportati in Figura 56.

Gli ovociti ottenuti in RAS system (Ovoc RAS) hanno mostrato allo scongelamento una buona qualità morfologica ($81,42 \pm 4,23\%$ di ovociti di forma regolare e struttura omogenea). Le procedure di fecondazione con spermatozoi freschi hanno fatto registrare tassi di fecondazione di $69,25 \pm 8,40\%$; l'analisi della qualità morfologica delle larve ottenute ha invece dato basse percentuali di larve D normoformate ($17,92 \pm 5,25\%$), comunque comparabili con i risultati riportati da Tervit et al (2005) (da 0,1 a 30,1% di larve D).

Le differenze registrate per tutti i parametri analizzati tra le due tipologie di ovociti (RAS e CONT) sono risultate statisticamente non significative ($p > 0,05$).

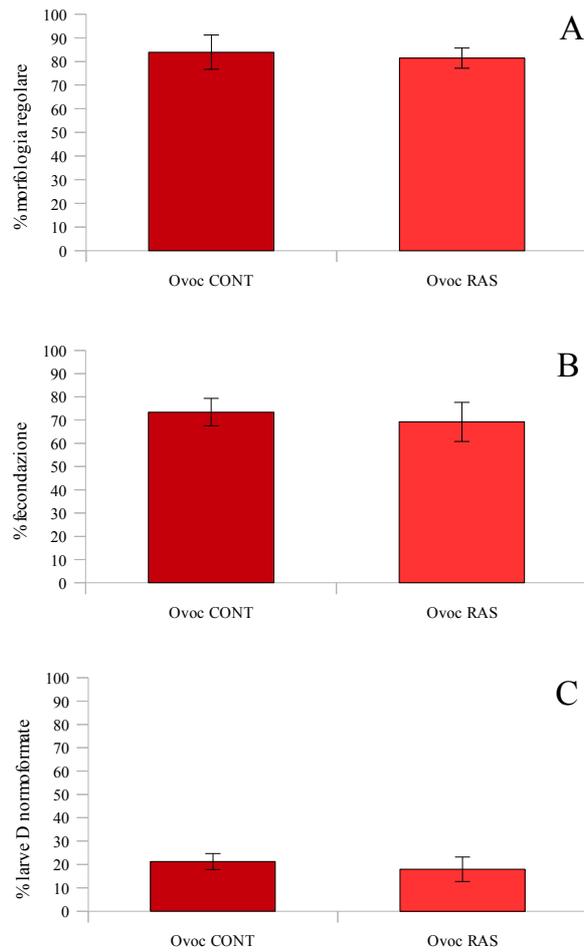


Figura 56. Ovociti criopreservati di *Crassostrea gigas*: morfologia (A), fecondazione (B) e sviluppo a larve D normoformate (C) post-scongelo di ovociti ottenuti da organismi maturati presso il CRIAcq (Spz RAS) e ovociti ottenuti da organismi reperiti da allevamenti (Spz CONT).

Trocofore

In Figura 57 sono riportati i risultati di motilità post-scongelo e sviluppo a larve D normoformate di trocofore di *Crassostrea gigas* ottenute da organismi maturati in RAS comparati con i risultati ottenuti con trocofore derivanti da organismi reperiti da allevamenti.

Le trocofore ottenute in RAS system (Trc RAS) hanno mostrato allo scongelamento un tasso di motilità di $75,17 \pm 4,37\%$ ed hanno fatto registrare l' $11,92 \pm 5,47\%$ di larve D normoformate. I risultati di motilità registrati sono comparabili a quanto ottenuto da Fabbrocini et al, (1999).

Le differenze registrate per tutti i parametri analizzati tra i due gruppi di trocofore (RAS e CONT) sono risultate statisticamente non significative ($p > 0,05$).

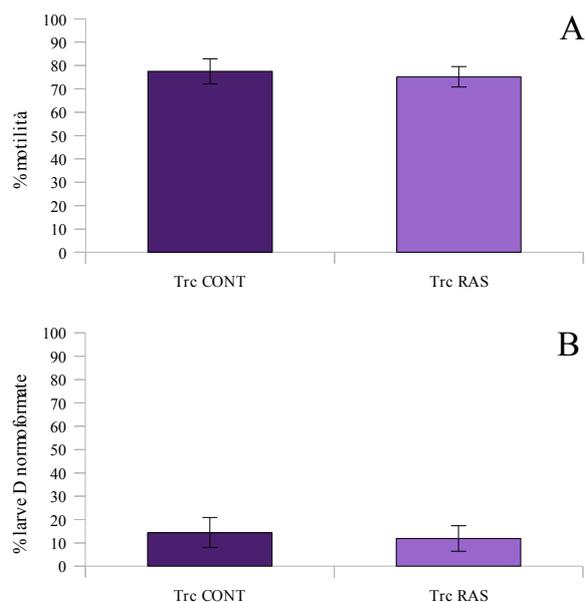


Figura 57. Trocofore criopreservate di *Crossostrea gigas*: motilità (A) e sviluppo a larve D normoformate (B) post-scongelo di trocofore ottenute da organismi maturati presso in RAS (Spz RAS) e organismi reperiti da allevamenti (Spz CONT).

Ostrea edulis

Spermatozoi

In Figura 58 sono riportati i risultati di motilità spermatica post-scongelo registrati con spermatozoi ottenuti da ostriche mantenute in stand-by pre-emissivo presso il RAS system del CRIAcq (Spz RAS), confrontati con la motilità post-scongelo di spermatozoi ottenuti da ostriche reperite da allevamenti (Spz RAS).

Gli spermatozoi degli animali mantenuti in stand-by pre-emissivo in RAS (Spz RAS) e sottoposti al protocollo di criopreservazione ottimizzato nella Fase A della sperimentazione hanno mostrato allo scongelamento una motilità spermatica pari a classe $3,13 \pm 0,38$; la differenza con gli spermatozoi ottenuti da organismi provenienti da allevamenti (Spz CONT) è risultata statisticamente non significativa ($p > 0,05$).

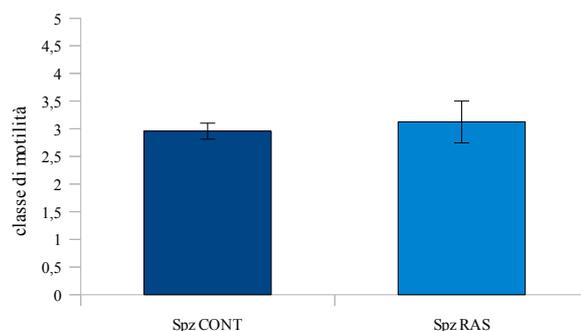


Figura 58. Spermatozoi criopreservati di *Ostrea edulis*: motilità post-scongelo di spermatozoi ottenuti da organismi mantenuti in stand-by pre-emissivo in RAS (Spz RAS) e spermatozoi ottenuti da organismi reperiti da allevamenti (Spz CONT).

Pecten jacobaeus

Spermatozoi

L'applicazione del protocollo di criopreservazione messo a punto nella Fase A della sperimentazione ha portato a risultati di motilità post-scongelo, riportati in Figura 59, statisticamente non differenti per le due tipologie di spermatozoi ($p > 0,05$) con valori di motilità di $1,54 \pm 0,5$ per gli spermatozoi prodotti in RAS system (Spz RAS) e $1,25 \pm 0,4$ per gli spermatozoi ottenuti da organismi pescati (Spz CONT).

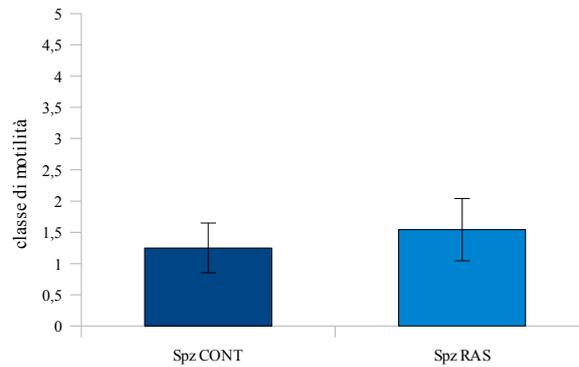


Figura 59. Spermatozoi criopreservati di *Pecten jacobaeus*: motilità post-scongelo di spermatozoi da organismi ottenuti mantenuti in stand-by pre-emissivo in RAS (Spz RAS) e spermatozoi ottenuti da organismi reperiti da pesca (Spz CONT).

Fase C. Progettazione di biosaggi innovativi con sistemi criopreservati

Effetto dello stoccaggio in criobanca sulla qualità di spermatozoi criopreservati di Sparus aurata

In Figura 60 è riportato l'andamento della motilità post-attivazione di spermatozoi criopreservati e conservati in azoto liquido per tempi differenti (1 giorno e 6 mesi).

Lo stoccaggio per un lungo tempo a -196°C non ha alterato la qualità degli spermatozoi criopreservati: le differenze tra i valori di motilità registrati sono risultate per tutti i tempi di valutazione (tempo post-attivazione) statisticamente non significative ($p>0,05$).

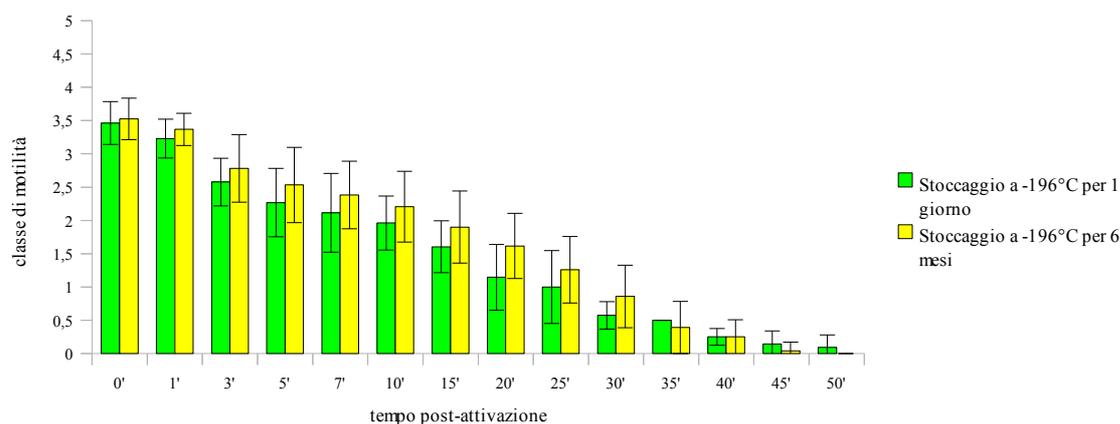


Figura 60. Andamento della motilità di spermatozoi criopreservati di *Sparus aurata* stoccati in criobanca per tempi differenti.

Il mantenimento in azoto liquido si è confermato quindi una metodologia affidabile per lo stoccaggio degli spermatozoi, in grado di preservarne le caratteristiche qualitative di motilità.

Effetto della diluizione con NaCl 1% del seme scongelato mantenuto a differenti regimi termici ($18\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $3\pm 1^{\circ}\text{C}$)

La prova di diluizione 1:6 del seme scongelato con una soluzione di NaCl 1% e di incubazione a differenti regimi termici ($18\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $3\pm 1^{\circ}\text{C}$) ha fatto registrare i risultati riportati in Figura 61.

La diluizione del seme scongelato con una soluzione di NaCl 1% tenuta a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ per tempi fino a 30' ha fatto registrare valori di motilità spermatica all'attivazione ed andamenti della motilità statisticamente non differenti dal controllo ($p>0,05$); l'incubazione in tali condizioni ma per tempi superiori (60' e 90') ha invece indotto una significativa riduzione della motilità spermatica all'attivazione ($p<0,05$), facendo registrare valori di motilità spermatica sempre inferiori a classe 3, con percentuali di spermatozoi RVL inferiori al 50%.

L'incubazione a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ non ha indotto una riduzione significativa della motilità spermatica all'attivazione ($p>0,05$) anche quando l'incubazione è durata 90 minuti, facendo registrare valori iniziali di motilità spermatica costanti (dell'ordine di classe 3) ed anche l'andamento della motilità si è mantenuto costante.

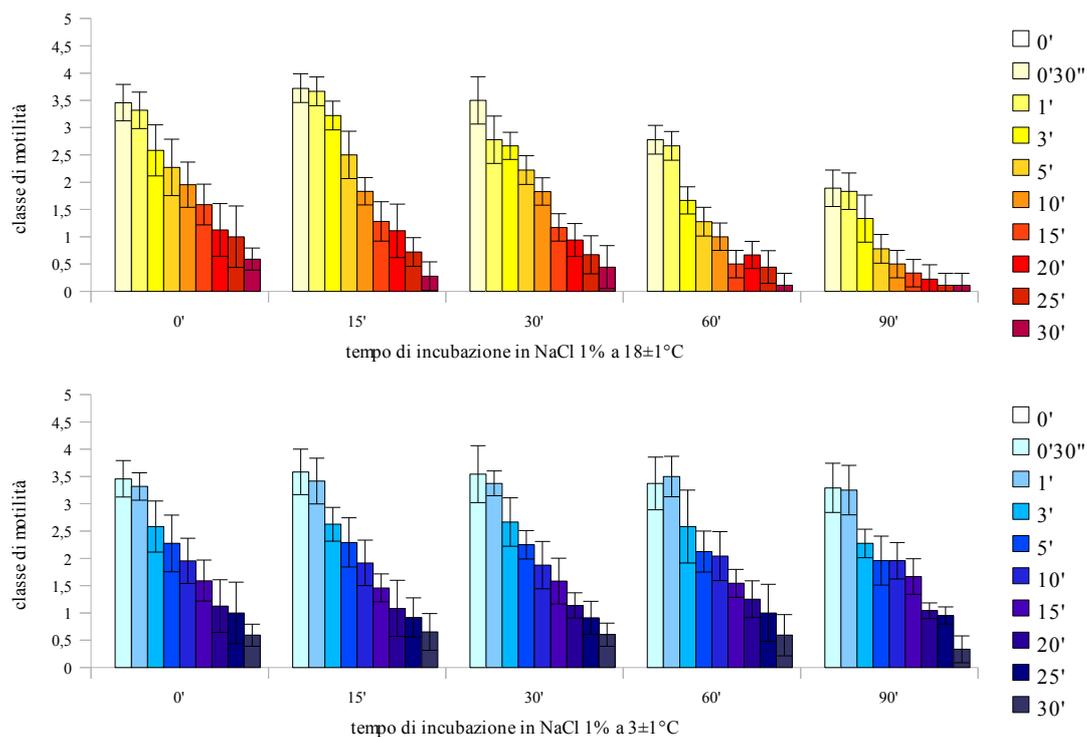


Figura 61. Andamento della motilità spermatica di spermatozoi di *Sparus aurata* scongelati, diluiti 1:6 con una soluzione di NaCl 1%, mantenuti a differenti regimi termici (18±1°C e 3±1°C) ed attivati dopo 15, 30, 60 e 90 minuti di incubazione.

Il trattamento a 3±1°C non ha alterato la qualità spermatica, ed è stato quindi selezionato per le prove in esposizione del seme agli xenobiotici di riferimento.

Indicazioni bibliografiche su test di spermiossicità standardizzati e/o proposti su differenti specie acquatiche (spermatozoi freschi) (Dinnel and Stober, 1987; Geffard et al, 2001; Hamoutene et al, 2000) hanno indotto a scegliere per il biosaggio messo a punto un'incubazione di 60 minuti.

Biosaggi con spermatozoi freschi e criopreservati di Sparus aurata

Di seguito sono riportati i risultati preliminari ottenuti dai biosaggi effettuati con gli spermatozoi di orata, sia freschi che criopreservati, testando xenobiotici di riferimento di differente natura chimica.

Metalli pesanti

Cadmio

In Figura 62 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme fresco e del seme criopreservato e scongelato in presenza di cadmio a differenti concentrazioni.

Il sistema biologico criopreservato ha mostrato una riduzione statisticamente significativa ($p < 0,05$) della motilità all'attivazione rispetto al controllo a partire dalla concentrazione di 0,2 mg/l.

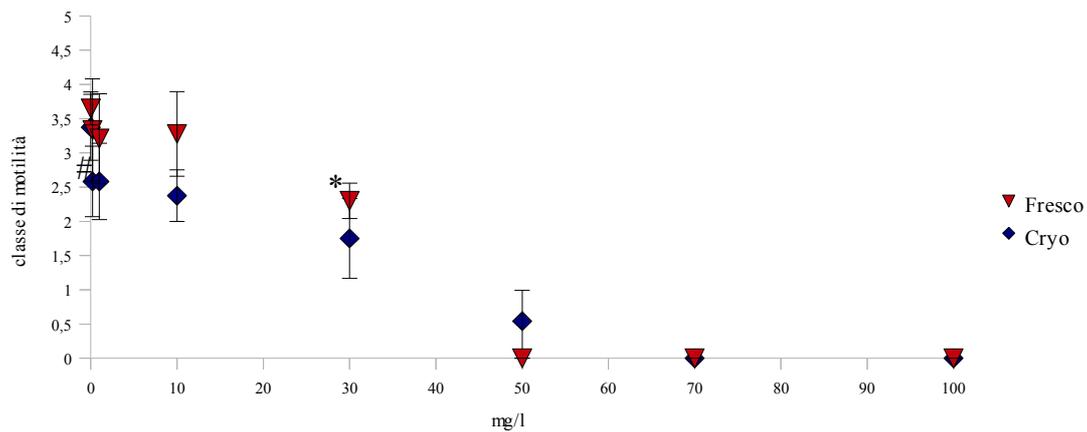


Figura 62. Effetti dell'incubazione in Cadmio/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

Il confronto tra i risultati ottenuti con le due tipologie di spermatozoi ha evidenziato una maggiore sensibilità del sistema criopreservato rispetto al sistema fresco, che ha subito una riduzione di motilità spermatica rispetto al controllo statisticamente significativa ($p < 0,05$) solo a partire da 30 mg/l di cadmio.

Cromo

Le curve di tossicità del cromo registrate per i due sistemi biologici utilizzati sono riportate in Figura 63.

Gli spermatozoi criopreservati hanno mostrato le prime riduzioni di motilità statisticamente significative rispetto al controllo ($p < 0,05$) quando incubati alla concentrazione di 30 mg/l.

In questo caso il sistema criopreservato ha mostrato una sensibilità comparabile a quella del sistema fresco che ha anch'esso fatto registrare riduzioni di motilità spermatica statisticamente significative ($p < 0,05$) rispetto al controllo a 30 mg/l di cromo. Tale concentrazione di tossico comunque ha indotto riduzioni della motilità spermatica più marcate con il sistema fresco piuttosto che con quello criopreservato.

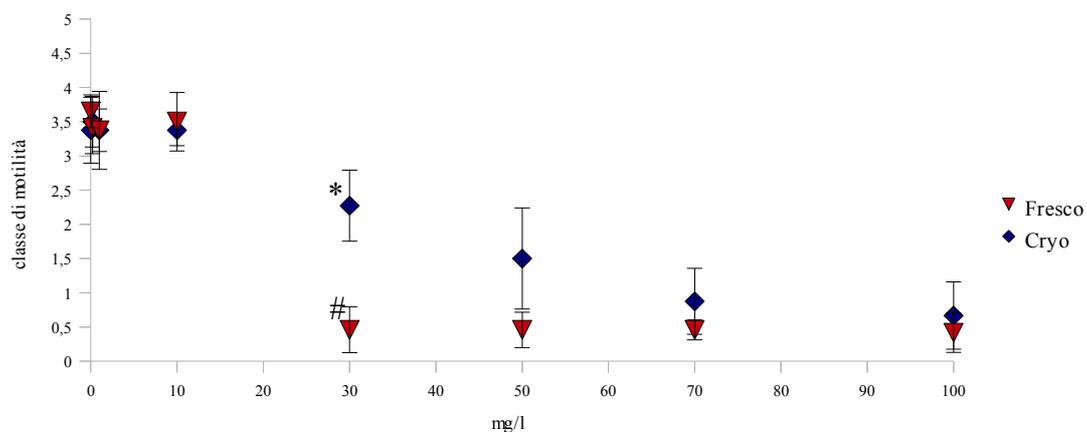


Figura 63. Effetti dell'incubazione in Cromo/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

Piombo

In Figura 64 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme fresco e del seme incubato in soluzioni di NaCl 1% a concentrazioni crescenti di piombo.

Il sistema criopreservato si è dimostrato sensibile a tale xenobiotico alla concentrazione di 1 mg/l, con riduzioni della motilità spermatica rispetto al controllo statisticamente significative ($p < 0,05$). I due sistemi hanno mostrato una sensibilità a tale xenobiotico molto simile, poiché anche il sistema fresco ha fatto registrare perdite di motilità spermatica statisticamente significative rispetto al controllo ($p < 0,05$) alla concentrazione di 1 mg/l.

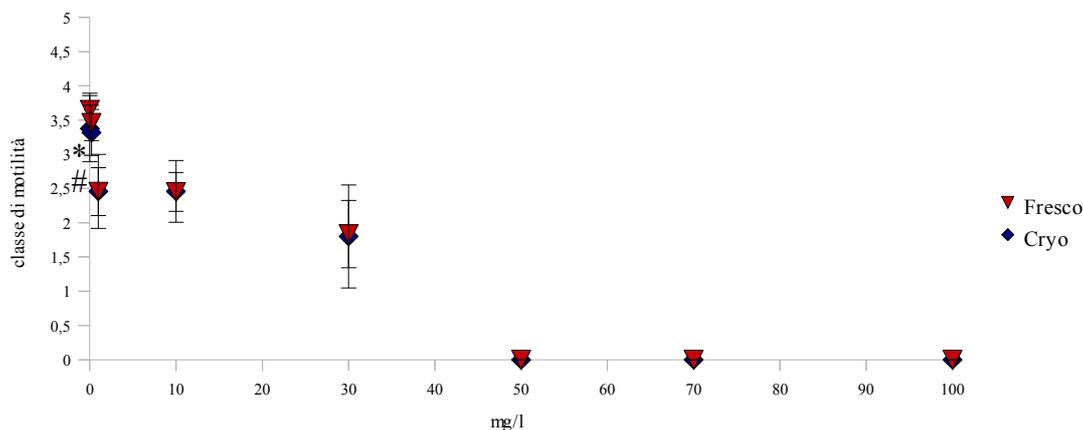


Figura 64. Effetti dell'incubazione in Piombo/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

Pesticidi

Azinfos-metile

In Figura 65 sono riportate le curve di tossicità del pesticida azinfos-metile registrate per gli spermatozoi freschi e criopreservati di orata.

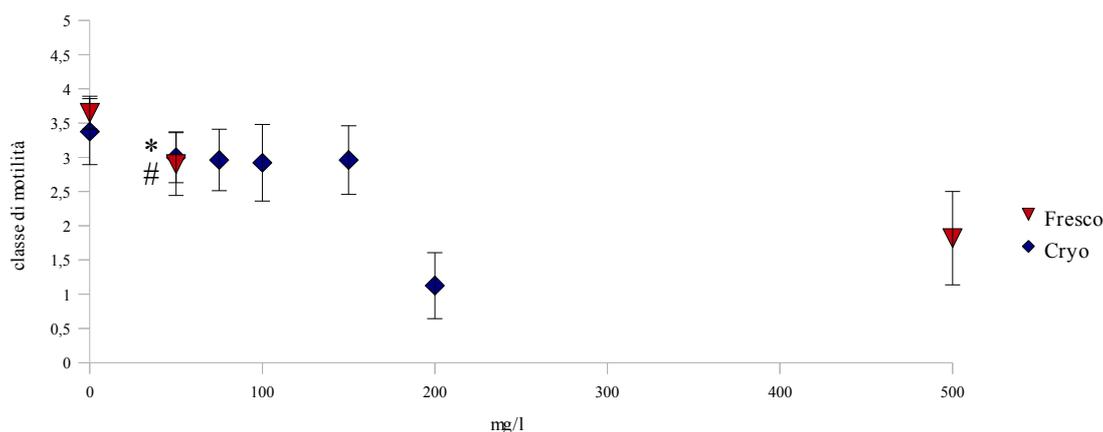


Figura 65. Effetti dell'incubazione in Azinfos-metile/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

Il sistema criopreservato ha mostrato una riduzione della motilità spermatica statisticamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,05$) alla concentrazione di 50 mg/l; anche con il sistema

fresco i primi effetti significativi ($p < 0,05$) sulla motilità spermatica sono stati registrati a questa stessa concentrazione.

Clorpirifos

L'esposizione degli spermatozoi freschi e criopreservati di orata a concentrazioni crescenti del pesticida clorpirifos ha indotto le curve di tossicità sulla motilità spermatica riportate in Figura 66.

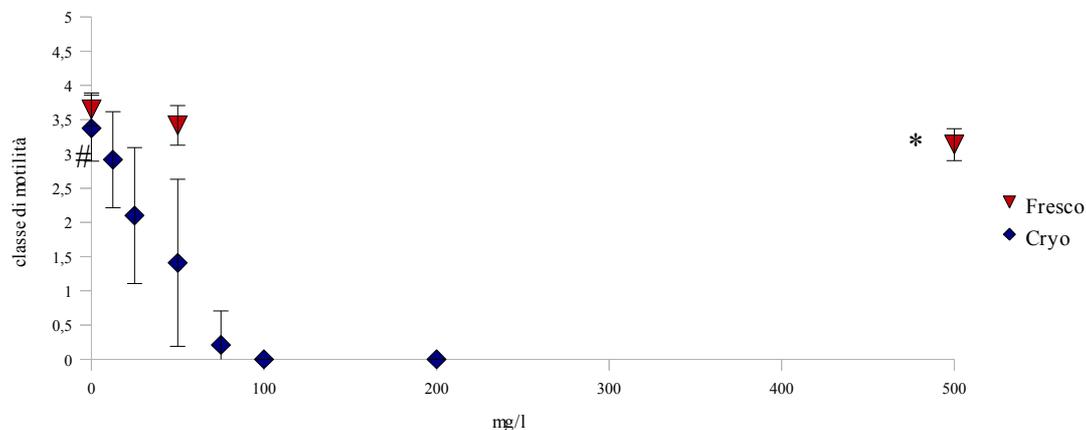


Figura 66. Effetti dell'incubazione in Clorpirifos/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

Gli spermatozoi criopreservati di *Sparus aurata* hanno manifestato una maggiore sensibilità al clorpirifos rispetto agli spermatozoi freschi: infatti, mentre il sistema scongelato ha mostrato una motilità significativamente più bassa rispetto al controllo ($p < 0,05$) già a 25 mg/l, la riduzione della motilità spermatica con gli spermatozoi freschi, con riduzioni della motilità spermatica significative ($p < 0,05$) rispetto al controllo che sono registrate solo in presenza di 500 mg/l di clorpirifos.

Pentaclorofenolo

In Figura 67 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme fresco e del seme incubato in soluzioni di NaCl 1 % a concentrazioni crescenti di pentaclorofenolo.

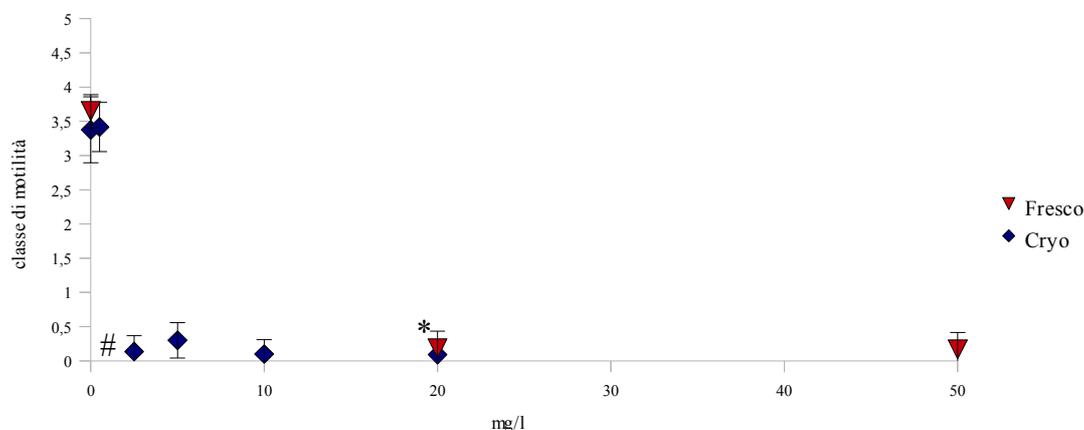


Figura 67. Effetti dell'incubazione in Pentaclorofenolo/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

L'esposizione del sistema criopreservato al pentaclorofenolo alle concentrazioni riportate ha fatto registrare perdite di motilità spermatica statisticamente significative rispetto al controllo ($p < 0,05$) alla concentrazione di 2,5 mg/l.

Le prove di incubazione del sistema fresco, svolte con concentrazioni più elevate (a partire da 20 mg/l) non hanno permesso una comparazione tra i risultati di sensibilità dei due sistemi considerati verso questo pesticida.

Idrocarburi Policiclici Aromatici

Le prove di tossicità del dimetilsolfossido (DMSO), utilizzato per solubilizzare gli idrocarburi, condotte sia sugli spermatozoi freschi che su quelli scongelati, al fine di verificare l'effetto della massima concentrazione di DMSO cui gli spermatozoi sono stati esposti durante l'incubazione nelle massime concentrazioni di idrocarburi testati, ha fatto registrare perdite di motilità statisticamente non significative ($p > 0,05$) rispetto al (dati non riportati).

Antracene

L'esposizione degli spermatozoi freschi e criopreservati di orata a concentrazioni crescenti dell'idrocarburo antracene ha indotto le curve di tossicità sulla motilità spermatica riportate in Figura 68.

Il sistema criopreservato ha subito una riduzione della motilità spermatica statisticamente significativa ($p < 0,05$) quando è stato incubato in presenza di 100 mg/l, mentre l'esposizione a 25 mg/l di antracene non ha indotto effetti significativi. Anche il sistema fresco, incubato alla concentrazione di 25 mg/l, non ha subito perdite significative di motilità spermatica, registrate invece alla concentrazione di 50 mg/l ($p < 0,05$).

La differente scala di concentrazioni di antracene utilizzata per i due sistemi biologici non ha permesso un confronto diretto tra i risultati ottenuti alle concentrazioni intermedie (50 e 100 mg/l), tuttavia il confronto tra i risultati ottenuti con 250 mg/l per il sistema fresco e 100 mg/l di antracene per il sistema criopreservato, nonché la differente risposta all'incubazione in presenza di 250 mg/l, risultata statisticamente significativa ($p < 0,05$), lascia ipotizzare una maggiore sensibilità a tale xenobiotico del sistema criopreservato rispetto a quello fresco.

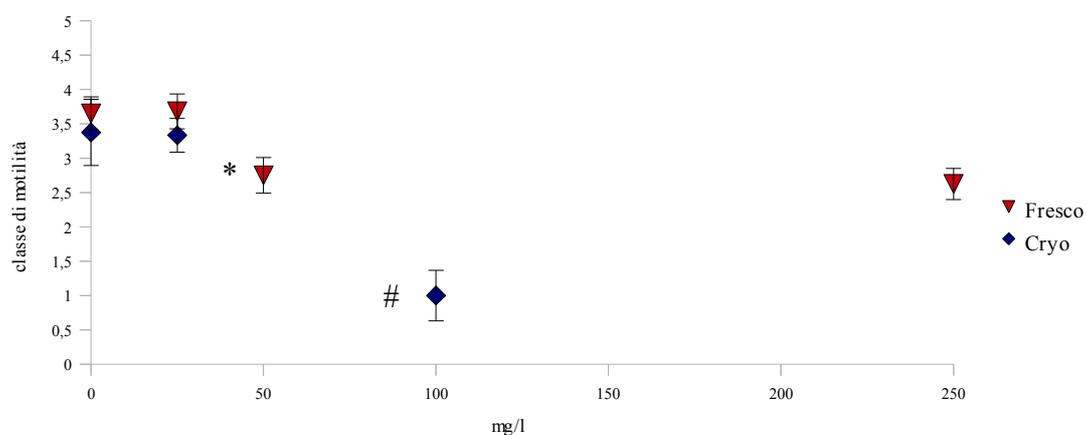


Figura 68. Effetti dell'incubazione in Antracene/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

Fenantrene

In Figura 69 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme fresco e del seme incubato in soluzioni di NaCl 1 % a concentrazioni crescenti di fenantrene.

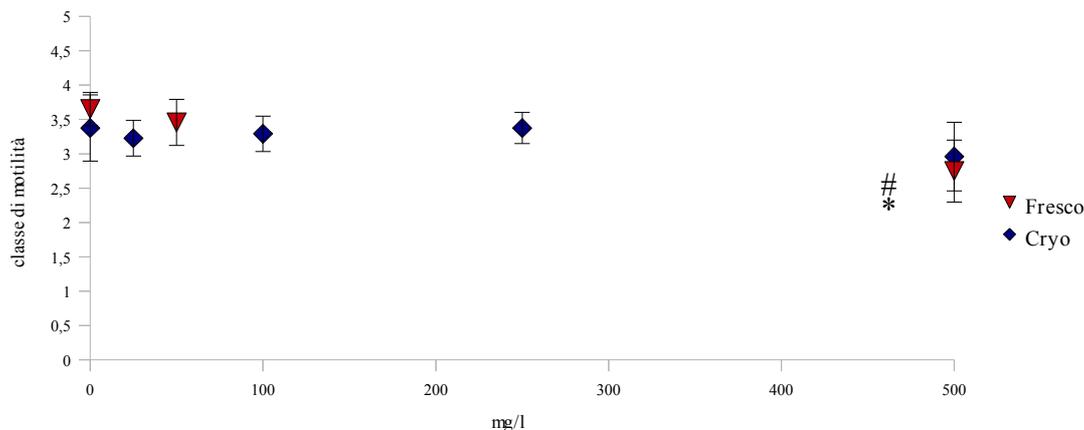


Figura 69. Effetti dell'incubazione in Fenantrene/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p<0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p<0,05$) rispetto al controllo.

Il fenantrene, alle concentrazioni testate, si è dimostrato scarsamente tossico per gli spermatozoi criopreservati di *S. aurata*, facendo registrare le prime differenze in termini di classe di motilità statisticamente significative rispetto al controllo ($p<0,05$) solo alla concentrazione di 500 mg/l.

Il sistema criopreservato ha rivelato una sensibilità comparabile a quella del sistema fresco che ha fatto registrare una riduzione statisticamente significativa ($p<0,05$) della motilità quando esposto a 500 mg/l.

Pirene

In Figura 70 sono riportati i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme fresco e del seme criopreservato e scongelato in presenza di pirene a differenti concentrazioni.

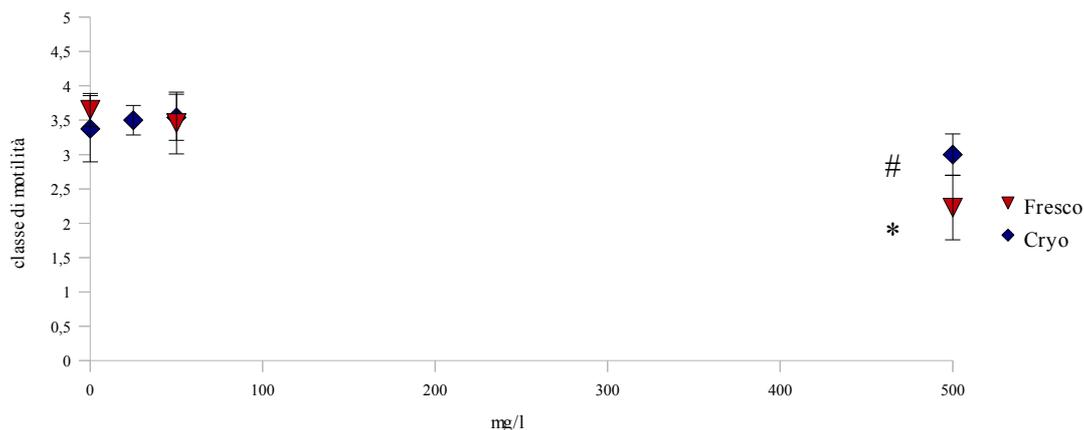


Figura 70. Effetti dell'incubazione in Pirene/NaCl 1% sulla motilità di spermatozoi freschi (Fresco) e scongelati (Cryo) di *Sparus aurata*. * Fresco= primi effetti significativi ($p<0,05$) rispetto al controllo; # Cryo: primi effetti significativi ($p<0,05$) rispetto al controllo.

Anche in questo caso, il sistema criopreservato si è dimostrato poco sensibile all'esposizione, alle condizioni sperimentali qui considerate, all'idrocarburo pirene, che, solo alla più elevata concentrazione testata (500 mg/l), ha fatto registrare una riduzione statisticamente significativa

($p < 0,05$) della motilità spermatica rispetto al controllo. Un livello di sensibilità simile è stato registrato con il sistema fresco, che ha mostrato riduzioni statisticamente significative ($p < 0,05$) della motilità solo quando esposto a 500 mg/l di pirene.

In Tabella X sono riportati i risultati in termini di sensibilità degli spermatozoi criopreservati per ogni xenobiotico testato.

Classe	Xenobiotico	Concentrazioni (mg/l) di xenobiotico che hanno fatto registrare i primi effetti significativi ($p < 0,05$)	
		Sistema fresco	Sistema criopreservato
Metalli pesanti	Cadmio	30	0,2
	Cromo	30	30
	Piombo	1	1
Pesticidi	Azinfos-metile	50	50
	Clorpirifos	500	25
	Pentaclorofenolo	20	2,5
Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	Antracene	50	100
	Fenantrene	500	500
	Pirene	500	500

Tabella X. Concentrazioni di xenobiotici che hanno fatto registrare i primi effetti significativi ($p < 0,05$) sugli spermatozoi criopreservati rispetto al controllo scongelato.

Il sistema criopreservato ha mostrato una maggiore sensibilità rispetto al seme fresco per tutti gli xenobiotici testati, ad eccezione del piombo (per il quale i livelli di sensibilità tra i due sistemi sono risultati simili) e per l'antracene.

Valori di sensibilità comparabili tra sistema fresco e criopreservato per alcune delle sostanze testate costituisce una valida prova della stabilità del sistema biologico criopreservato.

Una maggiore sensibilità è stata registrata nei confronti dei metalli pesanti, per i quali i risultati sono comparabili con quelli registrati esponendo il seme fresco di altre specie acquatiche al cadmio (Au *et al.*, 2000; Kime *et al.*, 1996); la sensibilità è risultata minore verso i pesticidi e molto bassa verso gli idrocarburi.

Capitolo V

Conclusioni

Fase A. Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone emergenti per l'acquacoltura

- Gli spermatozoi di *Pagellus erythrinus* hanno mostrato una buona criopreservabilità generale, dimostrandosi particolarmente resistenti ai danni da congelamento; il risultato migliore, relativamente al rapporto efficienza-tossicità, è stato assicurato da un adattamento al crioprotettivo EG, a tutte le concentrazioni, a freddo per 15 minuti e da una curva rapida di congelamento (-24°C/min), condizioni che hanno permesso di ottenere allo scongelamento valori di motilità spermatica superiori a quelli di controllo.
Il protocollo messo a punto può costituire un valido strumento per gli allevatori e contribuire allo sviluppo della produzione di tale specie, in programmi di differenziazione della produzione ittica.
- Il seme di *Pecten jacobaeus* si è dimostrato estremamente sensibile alla conservazione anche a breve termine ed a freddo. Il protocollo di criopreservazione messo a punto è da ottimizzare per minimizzare la perdita di motilità registrata durante la fase di Adattamento/Raffreddamento. Per tale specie, considerata da qualche anno a rischio di estinzione a causa di decimazioni di popolazioni naturali operate negli ultimi anni da fenomeni di pesca eccessiva, un protocollo di criopreservazione ottimizzato può costituire un importante strumento adiuvante nella difesa della biodiversità.
- Nel caso degli spermatozoi di *Ostrea edulis*, l'ottimizzazione delle condizioni di gestione del sistema nelle fasi precedenti il congelamento e delle procedure di criopreservazione ha permesso di definire un protocollo ottimizzato, pronto per l'utilizzo in campagne di miglioramento genetico e selezione di genotipi bonomiasa resistenti, a supporto dell'attività produttiva. L'alta qualità degli spermatozoi criopreservati, in termini di classe di motilità e durata, potrà inoltre permettere lo sviluppo nella pratica acquacolturale di procedure di fecondazione artificiale, essendo quest'ultima una specie ovovivipara a fecondazione interna.
- Gli spermatozoi di *Paracentrotus lividus* si sono rivelati un sistema estremamente delicato e di difficile criopreservabilità; sono necessari ulteriori studi per comprendere i processi fisiologici che caratterizzano gli spermatozoi di tale specie durante tutte le fasi della sperimentazione, al fine di selezionare i gradienti di raffreddamento e congelamenti più idonei per tale sistema biologico.

Fase B. Validazione della qualità dei gameti prodotti in sistemi RAS (Recirculating Aquaculture Systems) mediante l'applicazione di protocolli di criopreservazione già standardizzati

Per tutte le specie qui considerate, i gameti prodotti da organismi mantenuti in stand-by pre-emissivo e/o indotti alla maturazione sessuale in RAS presso la Stazione Sperimentale CRIAcq di Salerno hanno mostrato una qualità, in termini di risposta alla criopreservazione,

statisticamente non differente rispetto ai gameti ottenuti da organismi sessualmente maturi reperiti in natura o da aziende produttive.

In considerazione della elevata influenza della qualità iniziale (pre-congelamento) del sistema analizzato sulla sua risposta a protocolli standardizzati di criopreservazione, i risultati registrati in questa fase sperimentale confermano la validità del sistema RAS per la produzione e la fornitura di sistemi biologici di buona qualità, da utilizzare per vari scopi.

Fase C. Progettazione di biosaggi innovativi con sistemi criopreservati

L'applicazione del protocollo di criopreservazione reperito in bibliografia ha permesso la preparazione di uno stock omogeneo di spermatozoi in paillettes, mantenuto in azoto liquido per tutta la durata della sperimentazione. Lo scongelamento di campioni effettuato a distanza di sei mesi dalla preparazione ha fatto registrare una qualità spermatica che, sia in termini di classe all'attivazione che di durata della motilità, è risultata statisticamente non differente dal controllo, costituito da campioni scongelati dopo 1 giorno di permanenza in azoto liquido.

I risultati preliminari ottenuti dai biosaggi effettuati con gli spermatozoi, sia freschi che criopreservati, hanno mostrato scarse differenze in termini di risposta fisiologica alla esposizione e che, quindi, il processo di criopreservazione non ha alterato la sensibilità agli xenobiotici sperimentati del sistema biologico analizzato.

Tali risultati incoraggiano a proseguire tali ricerche per migliorare ed ottimizzare il protocollo del criosaggio e consegnare agli addetti del controllo ambientale un altro strumento utile, dotato di buona sensibilità generale, facilità d'uso, qualitativamente omogeneo e soprattutto sempre disponibile, per un suo futuro utilizzo per la valutazione della qualità di acque e sedimenti, sia marini che di ambienti di transizione, in ecosistemi acquatici.

Bibliografia

- Acosta-Salmón H., Jerry D.J., Southgate P.C. 2007. Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa. *Cryobiology* 54: 13-18
- Adam M., Rana K.J. & McAndrew B.J. 1995. Effects of cryoprotectants on the activity of selected embryonic enzymes in fish embryos. *Cryobiology* 32 (1): 92-104
- Aman R.R. & Parks J.E. 1994. Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 50: 103-110
- APAT. 2006. Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma. Manuali e linee guida. Vol. 37
- Ashwood-Smith M.J. 1980. Low-temperature preservation of cells, tissues and organs. In: Ashwood-Smith, M.J., Farrant, J. (eds), *Low temperature preservation in Medicine and Biology*. Pitman Medical, Turnbridge Wells: 19-45
- Asturiano J. F. 2008. Different protocols for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species Biology Series*. E. Cabrita, V. Robles, M. P. Herráez (Eds), CRC Press (Taylor and Francis group), pp. 345-350. 415–420
- Au D.W.T., Chiang M.W.L. & Wu R.S.S. 2000. Effect of cadmium and phenol on motility and ultrastructure of sea urchin and mussel spermatozoa. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 455-463
- Babiak I., Ottesen O., Rudolfsen G. & Johnsen S. 2006. Chilled storage of semen from Halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: optimizing the protocol. *Theriogenology* 66: 2025-2035
- Bart A.N., Wolfe D.F. & Dunham R.A. 1998. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of channel catfish eggs. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127: 819-824
- Benhra A., Radetski C. & Féraud J.F. 1997. Cryoalgotox: use of cryopreserved algae in a semistatic microplate test. *Environ. Toxicol. Chem.* 163: 505-508
- Bonnet J. L., Guiraud P., Dusser M., Kadri M., Laffosse J., Steiman R. & Bohatier J. 2005. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 87-100
- Bougrier S. & Rabenomanana L.D. 1986. Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 58: 277-280
- Bracke C. & Niemann H. 1995. New aspect in the freezing of embryos from livestock. In: *Proc. 11th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon France; 101-111

- Brown G.G. & Mims S.D. 1999. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt. J. World Aquacult. Soc. 30: 245-249
- Cabrita E., Engrola S., Conceição S., Lacuisse M., Pousão-Ferreira P. & Dinis M.T. 2009. Preliminary attempts on the cryopreservation of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) sperm. Aquaculture 287: 152-157
- Cabrita E., Robles V., Alvarez R. & Herráez M.P. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture 201: 301-314
- Cabrita E., Robles V., Cuñado S., Wallace J.C., Sarasquete C. & Herráez M.P. 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5mL macrotubes. Cryobiology 50: 273-284
- Chao N-H. & Liao I.C. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. Aquaculture 197 (1-4): 161-189
- Chen S.-L., Ji X.-S., Yu G.-C., Tian Y.-S. & Sha Z.-X. 2003. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. Aquaculture 236: 547-556
- Chereguini O., Garcia de la Banda I., Herrera M., Martinez C. & De la Hera M. 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. Aquac. Res. 34: 739-747
- Conget P., Fernandez M., Herrera G. & Minguell J.J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 144: 319-329
- Di Matteo O., Langellotti A.L., Masullo P. & Sansone G. 2009. Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. Cryobiology 58: 145-150
- Dinnel P.A. & Stober Q.J. 1987. Application of the Sea Urchin Sperm Bioassay to Sewage Treatment Efficiency and Toxicity in Marine Waters. Marine Environmental Research 21: 121-133
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR. & Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol. Reprod. 62: 564-570
- Elder K. & Brian D. 2000. Cryopreservation In: In vitro fertilization. 2nd edition. Cambridge University Press: 192-228
- Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 40: 427-433
- Fabbrocini A., Lubrano Lavadera S., Rispoli S. & Sansone G. 2000. Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology 40: 46-53

- Fabbrocini A., Rispoli S. & Sansone G. 1999. Cryopreservation of trocophores of the oyster *Crassostrea gigas*. In: International Conference Aquaculture Europe 99. Trondheim-Norway. July 1999.
- Fahning M.L. & Garcia M.A. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals, *Criobiology* 29: 1-18
- Fauvel C., Suquet M., Dreanno C., Zonno V. & Menu B. 1998. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquat. Living Resour.* 11: 387-394
- Felix F. 1985. Biophysics and biochemistry at low temperature. Cambridge University Press., New York, pp. 210
- Franks, F. 1982. Physiological water stress. In: Franks, F., Matthios S., editors. Biophysics of water. Chichester: John Wiley: 279-294
- Geffard O., Budzinski H., Augagneur S., Seaman M.N.L. & His E. 2001. Assessment of sediment contamination by spermotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(7): 1605-1611
- Glenister P.H. & Thornton C.E. 2000. Cryoconservation- archiving for the future. *Mammalian Genome* 11: 565-571
- González-Benito M.E. 1998. Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. *Acta Hort.*, 457: 133-142
- Gwo J.C. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Theriogenology* 39: 1331-1342
- Gwo J.C. 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research* 33: 259-271
- Gwo J.C., Chen C.W. & Cheng H.Y. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology* 58: 1563-1578
- Gwo J.C., Straws C.K., Longnecker M.T. & Arnold C.R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94: 355-376
- Hagedorn M., Hsu E., Kleinhans F.W. & Wildt D.E. 1997. New Approaches for Studying the Permeability of Fish Embryos: Toward Successful Cryopreservation. *Cryobiology* 34: 335-347
- Hamoutene D., Rahimtula A & Payne J. 2000. Development of a new biochemical assay for assessing toxicity in invertebrate and fish sperm. *Water Research* 34(16): 4049-4053
- Harvengt L., Meier-Dinkel A., Dumas E. & Collin E. 2004. Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 43-55
- He S.Y. & Woods L.C. III 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation

- induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 48: 254-262
- Hirano T., Godo T., Mii M. & Ishikawa K. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports* 23: 534-539
- His E., Beiras R. & Seaman M. 1999. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae. *Advances in Marine Biology* 37: 1-178
- His E., Heyvang I., Geffard O. & De Mountadouin X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassay for toxicological studies. *Water Research* 7: 1706-1718
- His E., Seaman R.N.L. & Beiras R. 1997. A simplified bivalve larval bioassay method for seawater quality assessment. *Water Research* 31: 351-355
- Ieropoli 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 (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology* 49: 250-257
- Ieropoli S., Vitiello V., Carlino P.A., do Espirito Santo M., Masullo P. & Sansone G., 2005. Effects of cryoprotectants on *Ostrea edulis* motility spermatozoa. *Notiziario S.I.M. Società Italiana di Malacologia* 23 (5-8): 65
- Isachenko V., Soler C., Isachenko E., Perez-Sanchez F. & Grishchenko V. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36: 250-253
- ISMEA, Il settore ittico in Italia. Check up ittico 2009, Roma, 2010.
- Jensen N.R., Zuccarelli M.D., Patton S.J., Williams S.R., Ireland S.C. & Cain K.D. 2008. Cryopreservation and Methanol Effects on Burbot Sperm Motility and Egg Fertilization. *North American Journal of Aquaculture* 70: 38-42
- Kawamoto T., Narita T., Isowa K., Aoki H., Hayashi M., Komaru A. & Ohta H. 2007. Effects of Cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 5: 19-26
- Kime D.E., Hebraimi M., Nysten K., Roelants I., Rurangwa E., More H.D.M. & Ollevier F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis for monitoring the effect of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metal. *Aquatic Toxicology* 36: 223-237
- Klößner K., Rosenthal H. & Willführ J. 1985. Invertebrate bioassays with North Sea water samples: Structural effects on embryos and larvae of serpulids, oysters and sea urchins. *Helgol Meeresunters* 39: 1-19
- Kumai H., Nakamura M., Seoka M., Takaoka O., Takii K. & Kurokura H. 1998. Fertilization using 11-year cryopreserved sperm of Chidai, *Evyinnis japonica*. Abstracts for the Meeting of the Japanese Society of Fisheries Science. April 4–5, 1998. No. 745 (in Japanese)

- Kwantong S. & Bart A.N. 2006. Cryopreservation of black ear catfish, *Pangasius larnaudii*, (Bocourt) sperm. Short Communication. *Aquaculture Research* 37: 955-957
- Lahnsteiner F., Patzner R.A. & Weismann T. 1996. Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research* 27(9): 659-671
- Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2mL and 5mL straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research* 28: 471-474
- Leibo S.P., Martino A., Kobayashi S. & Pollard J.W. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science* 42: 45-53
- Leung L.K.P. & Jamieson G.M. 1991. Live preservation of gametes. In *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*, Ed. by Jamieson, G.M., Cambridge University Press, Cambridge: 245-269
- Lubenz E., Daube N., Pekarsky I., Magnus Y., Cohen A., Yusefovich F. & Feigin P. 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks - strategies in research and application. *Aquaculture* 155: 13-30
- Maisse G., Labbé C., Ogier de Baulny B., Leveroni S. & Haffray P. 1998. Cryopreservation du sperme et des embryons de poissons. *INRA Prod. Anim.* 11: 57-65
- Martínez-Páramo S., Pérez-Cerezales S., Gómez-Romano F., Blanco G., Sánchez J.A. & Herráez M.P. 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 71: 594-604
- Martino A, Pollard A. & Leibo SP. 1996a. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Devel.* 45: 503- 512
- Martino A, Songsasen N. & Leibo SP. 1996b. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 4: 1059-1069
- Mazur P. 1963. Studies on rapidly frozen suspensions of yeast cells by differential thermal analysis and conductometry. *Biophys. J.* 3: 323-353
- Mazur P. 1964. Basic problems in cryobiology. In: Timmerhans KD (ed) *Advances in cryogenic engineering*. Vol 9. Plenum Press, New York, pp 28-37
- Mazur P. 1968. Physical and chemical changes during freezing and thawing of cells, with special reference to blood cells. *Bibl. Haematol.* 29: 764-277
- Mazur P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates. *Criobiology* 14(3): 251-272
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: C125-C142
- McFadzen I.R.B. 1992. Growth and survival of cryopreserved oyster and clam larvae along a

- pollution gradient in the German Bight. Mar. Ecol. Prog. Ser. 91: 215-220
- Miyamoto H. & Ishibashi T. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. J. Reprod. Fertil. 50: 373–375
- Morris G.J. & Clarke A. 1987. Cell at low temperatures. The effect of low temperature on biological system. Edwards Arnold ltd, London
- Narita T., Kawamoto T., Isowa K., Aoki H., Hayashi M., Komaru A. & Ohta H. 2008. Fertility of cryopreseved spermatozoa of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Aquaculture 275: 178-181
- Nicholas F.W. 1996. Genetic improvement through reproductive technology. Animal Reproduction Science 42: 205-214
- Notiziario SIET 2007, http://www.sietitalia.it/2007_notiziario_SIET.pdf)
- Ozden-Tokatli Y., Akdemir H., Tilkat E. & Onay A. 2010. Current status and conservation of Pistacia germplas. Biotechnology Advances 28: 130-141
- Paniagua-Chavez C.G. & Tiersch T.R. 2001. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. Cryobiology 43: 211-223
- Panis B., Swennen R. & Engelmann F. 2001. Cryopreservation of plant germplasm. Acta Hort. 560: 79-86
- Paredes E. & Bellas J. 2009. Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies. Cryobiology 59: 344-350
- Pegg, D.E. 1987. Ice Crystals in Tissues and Organs, in The Biophysics of Organ Preservation, Pegg, D.E. and Karow, A.M., Jr., Eds., Plenum, New York, pp. 117–140
- Perchec G., Cosson J., André F. & Billard R. 1993. Spermatozoa motility of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*). J. Appl. Ichthyol. 9: 129-149
- Perrucci G., Masullo P., Rendina M., Di Matteo O., Montanino I., do Espirito Santo M. & Sansone G. 2003. Cryogenic bank for the protection of the marine Mediterranean biodiversity. III International Symposium on Wild Fauna Waves, Ischia Maggio 24-28: 414-417
- Piironen J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Aquaculture 116(2-3): 275-285
- Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V. & Vysotskaya O.N. 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. International Journal of Refrigeration 29: 403-410
- Richardson G.F., Miller T.L. & McNiven M.A. 2000. Cryopreservation of Arctic charr *Salvelinus alpinus* semen in various extenders and in three sizes of straw. Aquaculture Research 31: 307-315

- Richardson G.F., Wilson C.E., Crim L.W. & Yao Z. 1999. Cryopreservation of yellowtail Xounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture* 174: 89-94
- Rideout R.M., Litvak M.K. & Trippel E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research* 34: 653-659
- Rideout R.M., Trippel E. A. & Litvak M.K. 2004. The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *J. Fish Biol.* 65: 299-311
- Sansone G., Fabbrocini A., Ieropoli S., Langellotti A.L., Occidente M. & Matassino D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44: 229-239
- Shalafer M. 1981. Pharmacological consideration in cryopreservation. Chapter 10. In organ preservation for Transplantation Marcell Dexver Inc. N.Y.: 177-212
- Sherman J. K. 1962. Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice. *The Anatomical Record* 144(3):171-189
- Singer S.J. & Nicholson G.L. 1972. Fluid mosaic model of structure of cell-membrane. *Science*, 175: 720-731
- 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. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 61: 31-34
- Staeger W.H. 1974. Cryobiological investigations of the gametes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. M.S. thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, 45
- Steinberg H., Hedder A., Baulain R. & Holtz W. 1995. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws, In: Proceeding of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas, Austin, 2-8 July, p. 146
- Stoss J. & Donaldson E.M. 1982. Preservation of fish gametes. In: International simposium on reproductive physiology of fish. Wageningen: 114-22
- Taddei A.R., Barbato F., Abelli L., Canese S., Moretti F., Rana K.J., Fausto A.M. & Mazzini M. 2001. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology* 42: 244-255
- Tanaka S., Zhang H., Horie N., Yamada Y., Okamura A., Utoh T., Mikawa N., Oka H.P. & Kurokura H. 2002. Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J. Fish Biol.* 60: 139-146
- Tervit H.R., Adams S.L., Roberts R.D., McGowan L.T., Pugh P.A., Smith J.F. & Janke A.R. 2005. Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes.

Cryobiology 51: 142-151

- Urbányi B., Szabó T., Miskolczi E., Mihálffy S., Vranovics K. & Horváth Á. .2006. Successful fertilization cryopreserved sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 22: 201-204
- Usuki H., Hamaguchi M. & Ishioka H. 1997. Long-term cryopreservation of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* sperm. *Bulletin Nansei National Fisheries Research Institute* 30: 115-123
- Van der Horst G., Dott H.M., Samuels J.E. & Genade A. 1985. Short-term and long-term storage of viable oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. *S. Afr. J. Sci.* 81: 404-405
- Wang C. & Croll R.P. 2006. Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* 256: 423-432
- Wheeler P.A. & Thorgaard G.H. 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture* 93: 95-100
- Womersley C., Uster P.S., Rudolph A.S. & Crowe J.H. 1986. Inhibition of dehydration-induced fusion between liposomal membranes by carbohydrates as measured by fluorescence energy transfer. *Cryobiology* 23: 245-255
- Yankson K. & Moyse J. 1991. Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters. *Aquaculture* 97: 259-267
- Yao Z., Crim L.M., Richardson G.F. & Emerson C.J. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture* 181: 361-375
- Zell S.R., Bamford M.H. & Hidu H. 1979. Cryopreservation of spermatozoa of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Cryobiology* 16: 448-460
- Zenzes M.T., Bielecki R., Caspera R.F. & Leibo S.P. 2001. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil. Steril.* 75: 769-777
- Zeron Y., Pearl M., Borochoy A. & Arav A. 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 38(1): 35-42

