



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Κρυοσυντήρηση σπέρματος κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*)
χρησιμοποιώντας μεγάλης χωρητικότητας δοχεία αποθήκευσης και
αυξημένες θερμοκρασίες απόψυξης**

Διαμαντής Ηλίας

ΒΟΛΟΣ 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

**Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*)
sperm using large-capacity storage containers and elevated thawing
temperatures**

Diamantis Ilias

VOLOS 2025

**Κρυοσυντήρηση σπέρματος κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*)
χρησιμοποιώντας μεγάλης χωρητικότητας δοχεία αποθήκευσης και αυξημένες
θερμοκρασίες απόψυξης**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Σεραφείμ Παπαδόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,

2) Δημήτριος Βαφείδης, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,

3) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Αφιέρωση

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αφιερώνεται στο φως της ζωής μου, στην κόρη μου Ευρυδίκη που νοσηματοδοτεί την ύπαρξή μου και αποτελεί αστείρευτη πηγή δύναμης και έμπνευσης για το κλινικό, ερευνητικό και συγγραφικό μου έργο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνετέλεσαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της παρούσας εργασίας κ. Σεραφείμ Παπαδόπουλο για την πολύτιμη αρωγή του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας.

Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να δοθεί και στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ.κ. Δημήτριο Βαφείδη και Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για τις χρήσιμες νουθεσίες τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου και στην επιστημονική συνεργάτη μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προπάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κρυοσυντήρηση του σπέρματος αποτελεί μία τελέσφορη τεχνολογία για τη διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας, την υποστήριξη και ενίσχυση των αναπαραγωγικών προγραμμάτων και την προώθηση της αειφόρου πλευράς του τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών.

Στην περίπτωση του κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*), ενός από τα πιο ευρέως εκτρεφόμενα ψάρια γλυκού νερού σε παγκόσμιο επίπεδο, η αποτελεσματική κρυοσυντήρηση σπέρματος δύναται να συντελέσει ουσιαστικά στη βελτίωση της ποιότητας των απογόνων, στη ελάττωση των γενετικών απωλειών και στην διατήρηση των επιθυμητών χαρακτηριστικών.

Παραδοσιακά, η κρυοσυντήρηση σπέρματος ιχθύων πραγματοποιείται σε μικρού όγκου δοχεία τα οποία επιτρέπουν την αυξημένη ταχύτητα ψύξης και την ομοιομορφία στην απόψυξη. Ωστόσο, η χρησιμοποίηση περιεκτών μεγαλύτερης χωρητικότητας συστήνεται ως μία πιο αποδοτική λύση προσφέροντας οικονομία χρόνου και πόρων. Παρόλα τα πλεονεκτήματα αυτά αναδύονται ποικίλες προκλήσεις, όπως η ελαττωμένη ομοιογένεια θερμοκρασίας κατά την ψύξη και η ενδεχόμενη επιδείνωση της ποιότητας του σπέρματος.

Η εν λόγω βιβλιογραφική εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη και αξιολόγηση της κρυοσυντήρησης σπέρματος του κυπρίνου σε περιέκτες αυξημένης χωρητικότητας, καθώς και στην επίπτωση αυξημένων θερμοκρασιών απόψυξης στην κινητικότητα, τη βιωσιμότητα και τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων μετά την διαδικασία της απόψυξης. Με σκοπό τη βαθύτερη ανασκόπηση του ζητήματος παρατίθενται το πειραματικό μέρος καθώς και τα αποτελέσματα της εργασίας των Sotnikov et al., (2024) όπου διερευνάται η αποτελεσματικότητα της κρυοσυντήρησης σπέρματος ατόμων κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) σε μεγάλα δοχεία (5 mL) με χαμηλό λόγο αραιώσης (1:1), σε συνθήκες απόψυξης υψηλής θερμοκρασίας (60°C).

Σε γενικότερο πλαίσιο, η μελέτη επισημαίνει και επιβεβαιώνει ότι η κρυοσυντήρηση σπέρματος του κυπρίνου σε δοχεία αυξημένης χωρητικότητας είναι εφικτή και αποδοτική, με την προϋπόθεση ότι συνδυάζεται με κατάλληλες θερμικές αποψυκτικές στρατηγικές. Μία μελλοντική ερευνητική δραστηριότητα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στη βελτιστοποίηση των ψυκτικών συνθηκών για μεγάλα δοχεία, στην επιλογή

αποδοτικότερων κρυοπροστατευτικών ουσιών και στην αξιολόγηση των μακροχρόνιων επιπτώσεων της κρυοσυντήρησης στην ποιότητα των απογόνων.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation represents a promising technology for the preservation of genetic diversity, the support and enhancement of reproductive programs, and the advancement of sustainability in aquaculture. In the case of the common carp (*Cyprinus carpio*), one of the most widely cultivated freshwater fish species globally, effective sperm cryopreservation can substantially contribute to improving offspring quality, minimizing genetic losses, and maintaining desirable phenotypic traits.

Traditionally, fish sperm cryopreservation has been carried out in small-volume containers, which enable rapid cooling rates and consistent thawing conditions. However, the application of larger-capacity containers has recently been proposed as a more efficient alternative, offering savings in labor, time, and resources. Despite these advantages, the use of such containers poses specific challenges, including decreased thermal homogeneity during freezing and a potential decline in sperm quality.

This literature-based study focuses on the evaluation of common carp sperm cryopreservation in larger-volume containers, along with the effects of elevated thawing temperatures on the motility, viability, and fertilization capacity of spermatozoa post-thaw.

To provide a more comprehensive understanding of this topic, experimental data and findings from Sotnikov et al. (2024) are reviewed, in which the efficacy of cryopreserving common carp sperm in large-volume straws (5 mL) using a low dilution ratio (1:1) and high-temperature thawing conditions (60 °C) was examined.

Overall, the study underscores and confirms that the cryopreservation of carp sperm in large-volume containers is both feasible and effective, provided it is paired with appropriately optimized thawing strategies. Future research directions may include the optimization of freezing protocols specifically for large-volume formats, the identification of more efficient cryoprotectants, and the long-term assessment of the impact of cryopreservation on offspring quality and reproductive performance.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 ΚΟΙΝΟΣ ΚΥΠΡΙΝΟΣ.....	13
1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ.....	15
1.3 ΕΙΔΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ <i>Cyprinus caprio</i>	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΩΑΡΙΩΝ.....	20
2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΑΩΡΙΩΝ.....	20
2.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	21
2.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΚΟΛΑΨΗΣ.....	21
2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	24
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
3.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	31
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	33

5. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κρυοσυντήρηση γενετικού υλικού αποτελεί μια από της σπουδαιότερες τεχνολογίες στον κλάδο της αναπαραγωγής, διότι αποδίδει δυνατότητες μακροχρόνιας διατήρησης και ταχείας διαθεσιμότητας γαμετών υψηλής ποιότητας (Martinez-Paramo et al., 2017). Στον τομέα των ιχθυοκαλλιέργειών, η συντήρηση σπέρματος αρσενικών ατόμων μέσω κατάψυξης καθιστά δυνατή την προκαθορισμένη γονιμοποίηση, την προάσπιση της γενετικής ποικιλομορφίας καθώς και την υποστήριξη προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης.

Ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) έχει αποτελέσει αντικείμενο ενδεδειγμένης ερευνητικής μελέτης όσον αφορά της αναπαραγωγικές τεχνικές και της διαδικασίες διατήρησης γενετικού υλικού. Εξάλλου, είδη ιχθύων της οικογένειας *Cyprinidae* αποτελούν το 50% της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών από ιχθυοκαλλιέργειες και πιο συγκεκριμένα ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) το 2020 αποτέλεσε το 8,6% της παγκόσμια παραγωγής ψαριών από ιχθυοκαλλιέργεια (FAO 2022). Η εφαρμογή τεχνικών κρυοσυντήρησης στο σπέρμα του επιτρέπει την αποτελεσματικότερη οργάνωση της παραγωγικής διαδικασίας αλλά και τη δημιουργία τραπεζών γενετικού υλικού που δύνανται να υποστηρίξουν και να ενισχύσουν την δραστηριότητα αφενός εμπορικών αφετέρου ερευνητικών προγραμμάτων. Στην ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια κυπρίνου με σκοπό τη βιωσιμότερη παραγωγή και την κάλυψη των αναγκών της αγοράς έχουν αξιοποιηθεί και αναπτυχθεί διάφορα στελέχη του είδους (Janssen et al., 2017). Επομένως τόσο η διατήρηση τράπεζας γονιδίων όσο και η κρυοσυντήρηση σπέρματος αποτελούν εργαλεία για περαιτέρω ανάπτυξη της ιχθυοκαλλιέργειας της αυτή την κατεύθυνση (Gorda et al., 1995; Flajshans et al., 1999).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της πρωτοκόλλου κρυοσυντήρησης είναι η σύνθεση του κατάλληλου κρυοπροστατευτικού μέσου, η αναλογία αραιώσης του σπέρματος με το κρυοπροστατευτικό μέσο, ο ρυθμός κατάψυξης και απόψυξης, καθώς και οι συνθήκες γονιμοποίησης (Sotnikov et al., 2024). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σύνθεση του κρυοπροστατευτικού μέσου, η αναλογία αραιώσης του σπέρματος και οι ρυθμοί κατάψυξης και απόψυξης επιλέγονται με κριτήριο και το μέγεθος του περιέκτη (Sotnikov et al., 2024). Η κρυοσυντήρηση σπέρματος πραγματοποιείται στην πραγματικότητα σε μικρού όγκου περιέκτες, γεγονός που

διευκολύνει τη γρήγορη ψύξη και την ομοιογενή απόψυξη. Ωστόσο, οι μεγαλύτερου όγκου περιέκτες προσφέρουν τη δυνατότητα γονιμοποίησης μεγαλύτερου αριθμού αυγών ανά δείγμα (Sotnikov et al., 2024) και οι ανάγκες αρκετών ιχθυογεννητικών μονάδων και εργαστηρίων καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για ανάπτυξη πρωτοκόλλων κρυοσυντήρησης σε δοχεία μεγαλύτερης χωρητικότητας. Τα μειονεκτήματα χρήσης περιεκτών μεγάλου όγκου της η μείωση του αριθμού δειγμάτων ανά αρσενικό γεννήτορα και η ενδεχόμενη σπατάλη σπέρματος επιφέρουν ποικίλες προκλήσεις οι οποίες χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Τέλος, σύμφωνα με της Kopeika et al., (2007) θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση περιεκτών όγκου μεγαλύτερου από 5ml.

Η απόψυξη επιδρά καθοριστικά στην επιβίωση των σπερματοζωαρίων. Ο ακατάλληλος ρυθμός απόψυξης μπορεί να οδηγήσει σε ανακρυσταλλοποίηση του κυτοπλάσματος και σε ωσμωτικό στρες του σπερματοζωαρίου (Henry et al., 1993). Σύμφωνα με της Baboo et al., (2019), ο τρόπος απόψυξης του δείγματος εξαρτάται από το είδος των κυττάρων, το κρυοπροστατευτικό μέσο και το ρυθμό κατάψυξης. Επιπλέον τόσο η θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και η μορφολογία του περιέκτη επηρεάζουν τον ρυθμό απόψυξης εντός του δείγματος καθιστώντας αναγκαία την εξατομίκευση της μεθόδου απόψυξης με κριτήριο την επιλεγόμενη μέθοδο κρυοδιατήρησης (Sotnikov et al., 2024). Η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για περιορισμένη διάρκεια έχει συσταθεί ως παράμετρος περιορισμού των φαινομένων επανακρυστάλλωσης, τα οποία δύνανται να επιφέρουν καταστροφή των κυτταρικών δομών (Lahnsteiner F., 2000). Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχουν επαρκή βιβλιογραφικά δεδομένα για την επίδραση αυτών των θερμικών στρατηγικών σε δοχεία αυξημένου όγκου.

Η εν λόγω βιβλιογραφική εργασία αποσκοπεί στη μελέτη της δυνατότητας αποτελεσματικής κρυοσυντήρησης σπέρματος κυπρίνου σε δοχεία 5 ml, καθώς και στην αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων θερμοκρασιών απόψυξης σε κρίσιμους δείκτες ποιότητας σπέρματος

Απώτερος σκοπός αποτελεί η συμβολή στη βελτιστοποίηση των υφιστάμενων και επί του παρόντος εφαρμοσμένων πρωτοκόλλων και στην ενίσχυση της εφαρμογής της σε ευρύτερο επίπεδο, δίνοντας έτσι ιδιαίτερη μνεία στην αποτελεσματικότητα και αποδοτικότητά της.

1.1 ΚΟΙΝΟΣ ΚΥΠΡΙΝΟΣ (*CYPRINUS CARPIO*)

Ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), γνωστός και ως κοινός κυπρίνος, αποτελεί ένα ψάρι του γλυκού νερού που ανήκει στην οικογένεια Cyprinidae. Η ιστορία εξημέρωσης του ξεκινά χιλιάδες χρόνια πριν από την αρχαία Κίνα (Balon, E. K., 1995), είναι ευρέως διαδεδομένος στην Ευρώπη και την Ασία και έχει εισαχθεί σε της περιοχές του κόσμου, κυρίως για λόγους αλιείας και υδατοκαλλιέργειας, καθώς και για διακοσμητικούς σκοπούς.

Το σώμα του είναι παχουλό, με λέπια που καλύπτουν όλη την επιφάνειά του, αν και υπάρχουν και ποικιλίες με ελαττωμένο αριθμό λεπιών ή και εντελώς άσπρες περιοχές, της οι γυμνοκυπρίνοι. Μπορεί να φτάσει σε μήκος το 1 μέτρο και να ζυγίσει έως και 30 κιλά. Είναι παμφάγος, με διατροφή που περιλαμβάνει φυτικά υλικά, μικροοργανισμούς, έντομα, σκουλήκια και οργανικά υπολείμματα στον βυθό. Προτιμά ήρεμα νερά, της λίμνες, υδάτινους ταμιευτήρες και αργόρρευστα ποτάμια με μαλακό υπόστρωμα και πλούσια υδρόβια βλάστηση (Freyhof, J. & Kottelat, M., 2007).

Η αναπαραγωγή του κυπρίνου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς το είδος είναι εξαιρετικά παραγωγικό. Φτάνει σε σεξουαλική ωριμότητα σε ηλικία 2 έως 4 ετών, ανάλογα με της περιβαλλοντικές συνθήκες και τη διατροφή. Η αναπαραγωγική περίοδος διαρκεί κυρίως από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο, όταν η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται μεταξύ 18 και 22°C. Κατά την περίοδο αυτή, οι κυπρίνοι μετακινούνται σε ρηχά, ζεστά νερά με πλούσια υδρόβια βλάστηση, όπου πραγματοποιείται και η αναπαραγωγική διαδικασία (Alikunhi, K. H., 1996).

Ο κυπρίνος είναι ωοτόκος, και η γονιμοποίηση των αυγών γίνεται εξωτερικά. Το θηλυκό απελευθερώνει από 100.000 έως και πάνω από 1.000.000 αυγά, τα οποία προσκολλώνται στη βλάστηση και σε της επιφάνειες. Τα αρσενικά απελευθερώνουν το σπέρμα στο νερό, ώστε να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση των αυγών. Η εκκόλαψη των αυγών διαρκεί από 3 έως 8 ημέρες, ανάλογα με τη θερμοκρασία του νερού. Τα νεογνήτα ψάρια έχουν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, αλλά όσα επιβιώσουν μπορούν να αναπτυχθούν γρήγορα σε κατάλληλες συνθήκες (Alikunhi, K. H., 1996; Freyhof, J. & Kottelat, M., 2007).

Ο κυπρίνος χαρακτηρίζεται από μια στρατηγική αναπαραγωγής τύπου *r*, δηλαδή παράγει μεγάλο αριθμό απογόνων χωρίς φροντίδα από της γονείς, στοιχείο που του

επιτρέπει να αποικίζει γρήγορα νέα περιβάλλοντα (Weber, M. J., & Brown, M. L., 2012). Εξαιτίας της ευκολίας αναπαραγωγής του, έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε ιχθυοκαλλιέργειες, και είναι από τα πρώτα είδη ψαριών που εξημερώθηκαν για αυτόν τον σκοπό.

Τέλος, υπάρχουν αναφορές για υβριδισμό του κυπρίνου με άλλα συγγενικά είδη, αλλά με περιορισμένη επιτυχία (Hulata, G., 1995).





Εικόνα 1.1: Ρεαλιστική (https://stock.adobe.com/gr_en/images/wild-common-carp-cyprinus-carpio/109202858) και σχηματογραφική απεικόνιση (https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species/cyprinus-carpio_el) του είδους *Cyprinus Carpio*.

1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

Η κρυοσυντήρηση του σπέρματος των ιχθύων αποτελεί μια προηγμένη βιοτεχνολογική μέθοδο που επιτρέπει τη μακροχρόνια διατήρηση του γενετικού υλικού σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες, κυρίως της -196°C με τη χρήση υγρού αζώτου (Rana, 1995). Η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την υποστήριξη της ιχθυοκαλλιέργειας, της γενετικής βελτίωσης, της διατήρησης της βιοποικιλότητας και της προστασίας απειλούμενων ειδών (Cabrita et al., 2010)

Η διαδικασία ξεκινά με τη συλλογή σπέρματος από ώριμα αρσενικά άτομα, η οποία γίνεται είτε μέσω ήπιας πίεσης στην κοιλιακή χώρα είτε με της μη επεμβατικές μεθόδους, ανάλογα με το είδος. Το σπέρμα στη συνέχεια αναμειγνύεται με ένα ειδικό αραιωτικό διάλυμα (extender), που προσφέρει σταθερότητα και θρεπτική υποστήριξη στα σπερματοζώαρια. Στο μείγμα προστίθεται ένα κρυοπροστατευτικό μέσο, της η γλυκερίνη ή το DMSO (dimethyl sulfoxide), που μειώνει την καταστροφική επίδραση των παγοκρυστάλλων κατά την κατάψυξη (Tiersch, 2001).

Η κατάψυξη πραγματοποιείται συνήθως με τη μέθοδο της αργής κατάψυξης (slow freezing), ώστε να μειωθεί η πιθανότητα σχηματισμού μεγάλων παγοκρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων (Zhang et al., 2005). Τα δείγματα τοποθετούνται σε μικροσωλήνες ή καλαμάκια και τοποθετούνται σταδιακά σε ψυχρό περιβάλλον πριν καταλήξουν στην τελική αποθήκευση σε υγρό άζωτο. Κατά την απόψυξη τα σπερματοζώαρια μεταφέρονται από την εξαιρετικά χαμηλή θερμοκρασία της κρυοσυντήρησης (-196 °C) σε θερμοκρασία κατάλληλη για γονιμοποίηση με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο. Κατά τη διάρκεια της απόψυξης, οι της φυσιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν κατά την κατάψυξη πραγματοποιούνται με αντίστροφη σειρά (Agarwal, N. K. 2011). Σε γενικές γραμμές για τα περισσότερα είδη γλυκού νερού η θερμοκρασία απόψυξης είναι 30–80 °C (Agarwal, N. K. 2011) ωστόσο σύμφωνα με τη μελέτη του Rana., (1995) η διαδικασία θα πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με το είδος.

Η κρυοσυντήρηση προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα στην ιχθυοκαλλιέργεια και την έρευνα (Sunarma et al., 2007). Επιτρέπει τον χρονικό διαχωρισμό της συλλογής σπέρματος και αυγών (Blaxter, 1953; Asturiano et al., 2017), διευκολύνει τον προγραμματισμό της αναπαραγωγής και μειώνει την ανάγκη διατήρησης μεγάλου αριθμού ζωντανών αρσενικών. Της, δίνει τη δυνατότητα διατήρησης γενετικού υλικού από σπάνια, απειλούμενα ή βελτιωμένα άτομα, συμβάλλοντας στη διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας και στην πρόοδο των προγραμμάτων γενετικής επιλογής (Agarwal, N. K. 2011).

Ωστόσο, η επιτυχία της κρυοσυντήρησης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: την ποιότητα του σπέρματος, τη σωστή επιλογή κρυοπροστατευτικών, της συνθήκες ψύξης και απόψυξης, καθώς και το είδος του ιχθύος (Maria et al., 2006). Κάθε είδος παρουσιάζει διαφορετική ευαισθησία στην κατάψυξη και απαιτεί προσαρμογή των πρωτοκόλλων.

Παρά της τεχνικές προκλήσεις, η κρυοσυντήρηση συνεχίζει να εξελίσσεται και αποτελεί βασικό εργαλείο στη διαχείριση των ιχθυοπληθυσμών και στη διατήρηση της υδατικής βιοποικιλότητας.

5.2ΕΙΔΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *CYPRINUS CARPIO*

Η κρυοσυντήρηση του σπέρματος του κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) αποτελεί μια σημαντική τεχνική στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας και της διατήρησης γενετικού υλικού. Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο όγκο παραγωγής και την εκτενή εκμετάλλευση των φυσικών αποθεμάτων η κρυοσυντήρηση του σπέρματος και η τεχνητή γονιμοποίηση αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για την ιχθυοκαλλιέργεια κυπρίνου (Irawan et al., 2010). Η διαδικασία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη διατήρηση γενετικών πόρων, την αναπαραγωγή επιλεγμένων γενετικών γραμμών και την υποστήριξη ελεγχόμενων προγραμμάτων αναπαραγωγής. Στην Ευρώπη έχουν παραχθεί διασταυρωμένα στελέχη του είδους με σκοπό την ανταπόκριση της απαιτήσεως της αγοράς και διατηρούνται τράπεζες γονιδίων για τη διατήρηση και την ανάπτυξη των διάφορων στελεχών (Jansen et al., 2017).

Απο τη δεκαετία του 1970 ξεκίνησε η ανάπτυξη μεθόδων κρυοσυντήρησης σπέρματος κυπρίνου (Horton & Ott, 1976), αλλά η πραγματική επιτυχία σημειώθηκε αρκετά αργότερα. Σήμερα είναι αποδεκτό ότι, για πρακτική εφαρμογή στην ιχθυοκαλλιέργεια, το σπέρμα πρέπει να καταψύχεται σε δοχεία σχετικά μεγάλου όγκου (4–10 ml), ώστε να επαρκεί για τη γονιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων αυγών (π.χ. 1kg αυγών απαιτεί 5–10 ml σπέρματος) (Urbanyi and Horvath, 2008). Επίσης, το σπέρμα του κυπρίνου διαθέτει ορισμένες ιδιαίτερες φυσιολογικές ιδιότητες, της η ενεργοποίηση της κινητικότητας μόνο σε υποτονικές συνθήκες που σχετίζονται με διόγκωση του σπερματοζωαρίου (Bondarenko et al., 2013) και η υψηλή πυκνότητα του σπέρματος (Cejko et al., 2011), ως εκ τούτου, τα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης που εφαρμόζονται διέπονται από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, για την αποφυγή πρόωρης ενεργοποίησης της κινητικότητας, χρησιμοποιούνται ισοτονικά ή υπερτονικά μέσα κρυοπροστασίας (Aygül et al., 2022), ενώ για την αποτροπή μηχανικής καταπόνησης των σπερματοζωαρίων κατά την κατάψυξη, εφαρμόζονται υψηλές αραιώσεις σπέρματος (Lahnsteiner et al., 2000).

Σε γενικές γραμμές έχουν αναπτυχθεί δύο κύριες προσεγγίσεις με τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την πρώτη

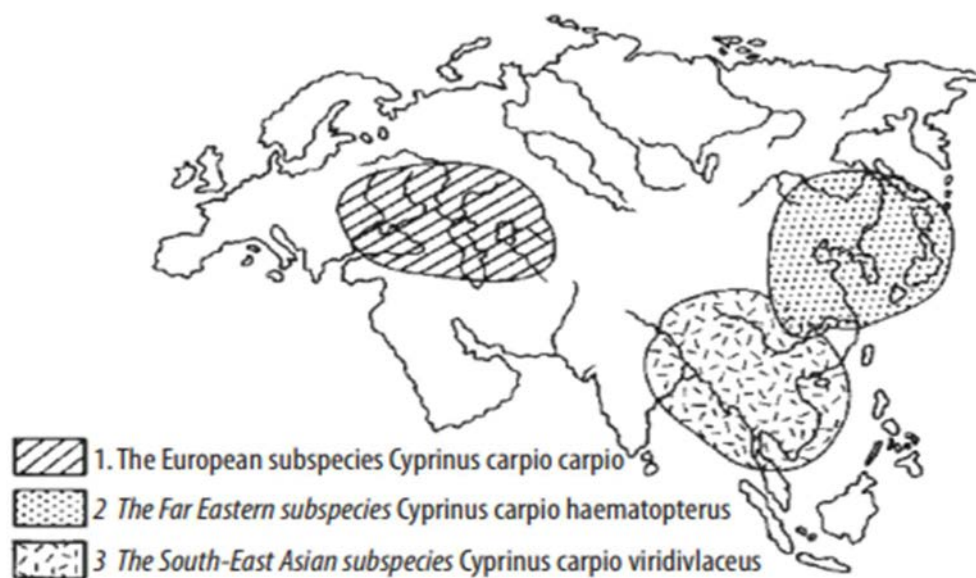
προσέγγιση χρησιμοποιούνται καλαμάκια των 4 ml με υψηλό λόγο αραίωσης σπέρματος της κρυοπροστατευτικό μέσο (1:9). Το κρυοπροστατευτικό μέσο που αξιοποιείται στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι συνήθως βασισμένο σε γλυκόζη-tris-μεθανόλη και η κατάψυξη γίνεται με απλές συσκευές χωρίς έλεγχο του ρυθμού κατάψυξης (Urbányi & Horváth, 2008). Η δεύτερη προσέγγιση αξιοποιεί σωληνίσκους χωρητικότητας 1.5 ml, με χαμηλό λόγο αραίωσης (1:1). Το κρυοπροστατευτικό μέσο που αξιοποιείται στη συγκεκριμένη περίπτωση αποτελείται από NaCl-γλυκόζη-μεθανόλη-αιθυλενογλυκόλη και η κατάψυξη γίνεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες (Dokina et al., 2019).

Προκειμένου να προκύψουν αποτελέσματα γονιμοποίησης συγκρίσιμα με αυτά του νωπού σπέρματος, για τη γονιμοποίηση ωαρίων ποσότητας 100γρ, κατά την πρώτη προσέγγιση απαιτείται ένα τουλάχιστον καλαμάκι χωρητικότητας 4ml και κατά τη δεύτερη προσέγγιση απαιτούνται τουλάχιστον 3 σωληνίσκοι χωρητικότητας 1,5ml. Ως αποτέλεσμα, και της 2 περιπτώσεις απαιτείται σχεδόν η ίδια ποσότητα κρυοδιατηρημένου σπέρματος για παρόμοιο αποτέλεσμα (Sotnikov et al., 2024). Επιπλέον η πρώτη μέθοδος εμφανίζει μειονεκτήματα, της χαμηλή αποδοτικότητα αποθήκευσης και φαινόμενα συγκόλλησης σπερματοζωαρίων (Bernáth et al., 2016), ενώ η δεύτερη δεν έχει ακόμη επαληθευτεί σε μεγαλύτερους όγκους. Σχεδόν της οι μέθοδοι βασίζονται στην απόψυξη σε λουτρό νερού με θερμοκρασία 40°C, με ελάχιστες παραλλαγές να έχουν διερευνηθεί (Yavaş & Bozkurt, 2011).

Επιπρόσθετα, έχει διερευνηθεί εκτενώς η αποτελεσματικότητα της κρυοσυντήρησης σπέρματος κυπρίνου με χρήση αλατούχων διαλυμάτων και διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) ή διμεθυλοακεταμίδης (DMA) με ποικίλα αποτελέσματα όσον αφορά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και τη γονιμοποιητική ικανότητα μετά την απόψυξη (Irawan et al., 2010). Επιπλέον, μελέτες έχουν εστιάσει στη δράση των σακχάρων και των κρυοπροστατευτικών ουσιών στην κινητικότητα και τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος (Babiak et al., 1997; Horváth et al., 2003). Ωστόσο, η αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων παραμένει δύσκολη, λόγω των διαφορών τους σε χρησιμοποιούμενους διαλύτες, κρυοπροστατευτικούς παράγοντες και πρωτόκολλα κατάψυξης.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της εκάστοτε μεθόδου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, της η ποιότητα του αρχικού σπέρματος, η σύνθεση του διαλύματος κρυοπροστασίας, η ταχύτητα κατάψυξης και απόψυξης, καθώς και οι συνθήκες

αποθήκευσης. Γι' αυτό, απαιτείται σωστός σχεδιασμός και εξειδικευμένη τεχνική γνώση για την επιτυχή εφαρμογή της.



Εικόνα 1.3: Κατανομή και εξάπλωση του είδους *Cyprinus carpio* στην γεωγραφική περιοχή της Ευρώπης και της Ασίας (Kirpitchenkov V.S., 1999)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγμα και συλλογή σπέρματος και ωαρίων

Τα πειράματα τεχνητής αναπαραγωγής του κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) πραγματοποιήθηκαν κατά τη φυσική περίοδο αναπαραγωγής (Μάιος–Ιούνιος) τα έτη 2021–2022 στο Vodňany της Τσεχίας. Αναπαραγωγικά ώριμα άτομα (μέσο μήκος 45 ± 9 cm, μέσο βάρος $4,2 \pm 0,7$ kg) συλλέχθηκαν από ιχθυοτροφικές λιμνοδεξαμενές και μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές εκτροφής με ανακυκλοφορούμενο νερό (παροχή 0,2 L/s, θερμοκρασία 20°C, Ph 7,9–8,0, διαλυμένο οξυγόνο 8,7–8,9 mg/L). Η αξιολόγηση των παραμέτρων κινητικότητας έγινε σε δείγματα σπέρματος από 30 άτομα ενώ σε δείγματα 4 ατόμων από αυτά έγινε αξιολόγηση της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπέρματος.

Οι αρσενικοί κυπρίνοι έλαβαν ενδοκοιλιακή ένεση εκχυλίσματος υπόφυσης κυπρίνου (1 mg/kg) 24 ώρες πριν από τη συλλογή σπέρματος. Πριν τη συλλογή, τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη (0,3 ml/L). Το σπέρμα συλλέχθηκε με ελαφρά κοιλιακή πίεση σε αποστειρωμένα δοχεία, χωρίς επιμόλυνση από ούρα, κόπρανα, βλέννες ή νερό και διατηρήθηκε σε πάγο της 4°C για λιγότερο από 2 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο δείγματα με κινητικότητα >80%. Η συγκέντρωση κυμάνθηκε από $25\text{--}32 \times 10^9$ σπερματοζωάρια/ml και ο όγκος από 7–25 ml.

Τα θηλυκά έλαβαν δύο ενέσεις εκχυλίσματος υπόφυσης (0,3 mg/kg και 2,7 mg/kg, με μεσοδιάστημα 12 ωρών) για πρόκληση ωοτοκίας. Η συλλογή των ωαρίων έγινε με ξηρή μέθοδο, μέσω κοιλιακής πίεσης.

2.2 Ανάλυση δεδομένων κινητικότητας σπερματοζωαρίων

Η κινητικότητα καταγράφηκε με κάμερα για 60 δευτερόλεπτα μετά την ενεργοποίησή της (σε δύο επαναλήψεις), για μελλοντική ανάλυση μέσω συστήματος υποβοηθούμενης ανάλυσης σπέρματος (CASA). Οι παράμετροι κινητικότητας καταγράφηκαν ανά 1 δευτερόλεπτο από τα 10 έως τα 60 δευτερόλεπτα μετά την ενεργοποίηση, με συνολικά 442.539 σπερματοζωάρια να αναλύονται.

Η ενεργοποίηση της κινητικότητας πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο καταμέτρησης σπέρματος ISAS SpermTrack-10 (PROISER, Ισπανία) με ενεργοποιητικό διάλυμα

αποτελούμενο από 30 Mm Tris, 45 Mm NaCl και 5 Mm KCl (Ph 8,0), σύμφωνα με τον Horváth et al. (2003), εμπλουτισμένο με 0,125% Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) για την αποφυγή προσκόλλησης των σπερματοζωαρίων στην επιφάνεια του παρασκευάσματος. Η παρατήρηση έγινε με μικροσκόπιο αρνητικής φασικής αντίθεσης ($\times 10$ μεγέθυνση, PROISER), ενώ η καταγραφή πραγματοποιήθηκε με ψηφιακή κάμερα IDS. Η ανάλυση των βίντεο έγινε με χρήση του CASA plugin για ImageJ. Οι παρακάτω παράμετροι αξιολογήθηκαν: ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων (%), VCL (καμπυλόγραμμη ταχύτητα, $\mu\text{m/s}$), VAP (μέση διαδρομική ταχύτητα, $\mu\text{m/s}$), VSL (ευθύγραμμη ταχύτητα, $\mu\text{m/s}$), LIN (γραμμικότητα διαδρομής = VSL/VAP), WOB (ταλάντωση διαδρομής = VAP/VCL) και BCF (συχνότητα διασταύρωσης ουράς, Hz).

2.3 Πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης σπέρματος

Τα δείγματα σπέρματος αραιώθηκαν σε αναλογία 1:1 με αραιωτικό διάλυμα σύμφωνα με της Dokina et al., (2019) (60 Mm NaCl, 3 Mm σακχαρόζη, με 5% v/v αιθυλενογλυκόλη και 22% v/v μεθανόλη) και τοποθετήθηκαν σε κρυοσωληνάρια των 4,5 Ml (Thermo Fisher Scientific). Μετά από 10 λεπτά επώασης σε πάγο ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), τα δείγματα ψύχθηκαν σε προγραμματιζόμενο καταψύκτη (PLANER Kryo 10 series III) με διαφασικό πρωτόκολλο: αρχικά με ρυθμό -2°C/min έως το σημείο κρυστάλλωσης και στη συνέχεια με ρυθμό -20°C/min έως της -140°C , πριν από την κατάψυξη σε υγρό άζωτο. Η απόψυξη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 60°C για 100 s. Μετά την απόψυξη, τα δείγματα ανακινήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε πάγο για έως 10 λεπτά πριν την ανάλυση κινητικότητας ή τη χρήση σε γονιμοποίηση.

2.4 Πρωτόκολλο γονιμοποίησης και εκκόλαψης

Για τα πειράματα γονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκε μείγμα ωαρίων από οκτώ θηλυκά ψάρια. Κάθε επανάληψη του πειράματος περιλάμβανε 200 g μικτού δείγματος ωαρίων. Όταν χρησιμοποιήθηκε φρέσκο σπέρμα (από τα ίδια αρσενικά που είχαν χρησιμοποιηθεί και ένα έτος νωρίτερα για κρυοσυντήρηση), η δόση ήταν 2,25 Ml. Στην περίπτωση των κρυοσυντηρημένων δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις δόσεις: ένα ολόκληρο

κρυοσωληνάριο (4,5 MI, δηλαδή 2,25 MI καθαρού σπέρματος), μισό κρυοσωληνάριο (1,125 MI σπέρματος), και δύο κρυοσωληνάρια (4,5 MI σπέρματος).

Μετά την ανάμιξη του σπέρματος με τα ωάρια, προστέθηκαν 50 MI ενεργοποιητικού διαλύματος. Μετά από 2 λεπτά ανάδευσης, το διάλυμα αφαιρέθηκε με πιπέτα και ακολούθησε φάση ελεγχόμενης διόγκωσης σε νερό εκτροφείου. Στη συνέχεια, τα ωάρια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με ταννικό οξύ για την αποφυγή συγκόλλησης. Τα επεξεργασμένα ωάρια τοποθετήθηκαν σε γυάλινες επωαστικές φιάλες Kannengieter (όγκος 2 L) και επώαστηκαν στους 20°C.

Για την παρακολούθηση των ποσοστών γονιμοποίησης και εκκόλαψης, δείγματα 150–200 ωαρίων από κάθε επανάληψη τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri και επώαστηκαν ξεχωριστά. Η αναλογία σπέρματος/ωάριο κυμάνθηκε από 60.000 σπερματοζωάρια/ωάριο (στην περίπτωση 0,5 κρυοσωληναρίου) έως 240.000 σπερματοζωάρια/ωάριο (στην περίπτωση 2 κρυοσωληναρίων). Μετά από 5 ημέρες επώασης, ο συνολικός αριθμός των εκκολαπτόμενων προνυμφών καταμετρήθηκε με τη μεθοδολογία όγκου κατά τη μεταφορά της δεξαμενής εκτροφής.

2.5 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μέσω της μεθόδου CASA ακολουθήθηκαν δύο προσεγγίσεις. Κατά την Εξερευνητική Πολυπαραγοντική Ανάλυση εφαρμόστηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για την οπτικοποίηση της γενικής δομής των δεδομένων CASA. Τρεις κύριες συνιστώσες χρησιμοποιήθηκαν για την παρουσίαση των μέσων τιμών των κινητικών παραμέτρων και του ποσοστού κινητικότητας μέσω διαγραμμάτων τύπου Wafer. Επιπλέον, αναλύθηκαν οι μεμονωμένες παρατηρήσεις στα 10 δευτερόλεπτα με την απεικόνιση των κεντροειδών των δεδομένων και ελλείψεων πρόβλεψης 95%. Κατά τη Συγκριτική Ποσοτική Ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές ποσοστό κινητικότητας, VCL (καμπυλόγραμμη ταχύτητα) και LIN (ευθυγράμμιση τροχιάς) για τη σύγκριση μεταξύ νωπού και κρυοσυντηρημένου σπέρματος. Εξαιτίας της ετερογένειας των διακυμάνσεων (βάσει του ελέγχου Levene), εφαρμόστηκε μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενα μέτρα (Friedman test), ενώ για συγκρίσεις κατά δύο χρησιμοποιήθηκε το τεστ Wilcoxon. Οι στατιστικές αναλύσεις εκτελέστηκαν με το λογισμικό Statistica v14.0.0.15 (TIBCO

Software Inc.) και τα στατιστικά όρια σημαντικότητας τέθηκαν στο $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως διάμεσος και 25^ο εκατοστημόριο.

Τα δεδομένα σχετικά με την ανάπτυξη και την εκκόλαψη προνυμφών σε τρυβλία Petri, καθώς και ο συνολικός αριθμός των προνυμφών που προέκυψαν από τα πειράματα, αναλύθηκαν με μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης Kruskal–Wallis ANOVA λόγω του μικρού αριθμού επαναλήψεων ($n = 4$), ακολουθούμενη από πολλαπλές συγκρίσεις μέσω των τιμών μεταξύ των ομάδων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

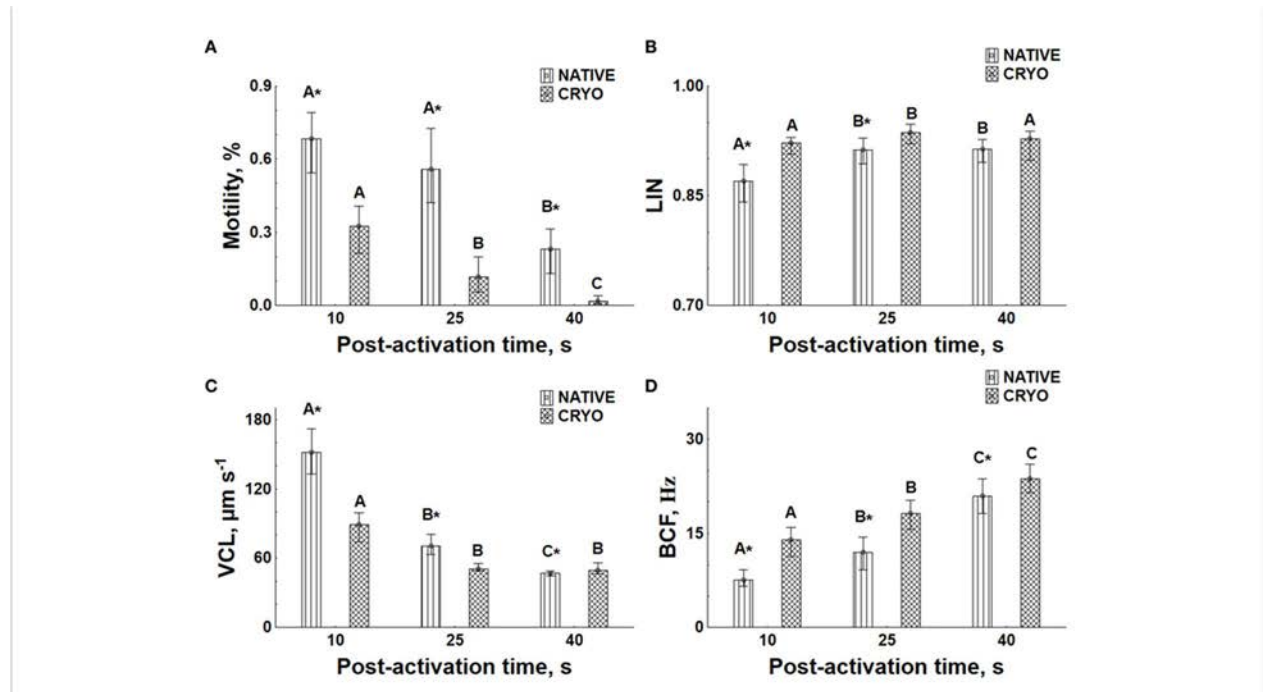
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την ποσοτική αξιολόγηση της κινητικότητας του νωπού και κρυοσυντηρημένου σπέρματος στα δείγματα από τα 30 αρσενικά άτομα με το σύστημα CASA σε χρονικά διαστήματα 10 έως 60 δευτερολέπτων μετά την ενεργοποίηση της κινητικότητας προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα. Η πολυπαραγοντική ανάλυση με κύριες συνιστώσες (PCA) έδειξε ότι η PC1 σχετίζεται θετικά κυρίως με το ποσοστό κινητικότητας και της παραμέτρους ταχύτητας (VCL, VSL, VAP), η PC2 σχετίζεται θετικά με την BCF και της VCL/VSL, ενώ αρνητικά με της LIN και STR, και η PC3 με την κινητικότητα και την ALH. Οι τρεις αυτές συνιστώσες εξηγούν συνολικά το 93% της διακύμανσης των δεδομένων.

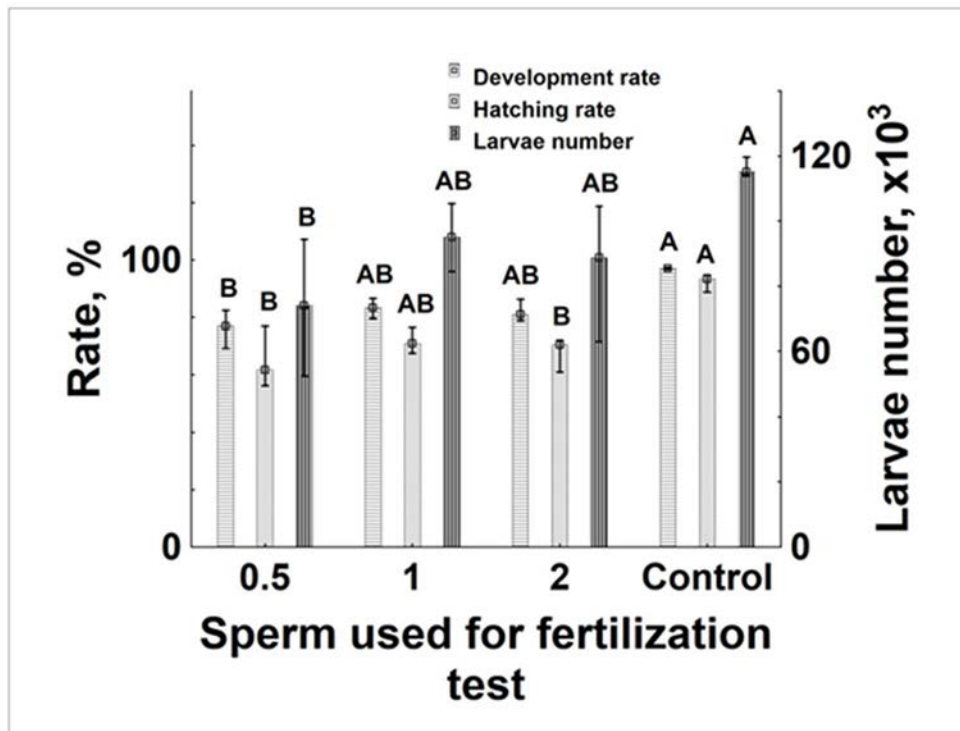
Η ανάλυση έδειξε ότι οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ νωπού και κρυοσυντηρημένου σπέρματος εμφανίζονται στα 10 δευτερόλεπτα μετά την ενεργοποίηση και μειώνονται μέχρι τα 40 δευτερόλεπτα (Εικόνα 3.1). Η κρυοσυντήρηση προκαλεί γενική μείωση των ταχυτήτων (VCL, VSL, VAP) και αύξηση των BCF και LIN. Σημαντικά στατιστικές διαφορές επιβεβαιώθηκαν με μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Friedman ANOVA) και το τεστ Wilcoxon για σύγκριση κατά ζεύγη. Επιπλέον, εντοπίστηκε υποπληθυσμός σπερματοζωαρίων στα κρυοσυντηρημένα δείγματα, ο οποίος παρουσίαζε κινητικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα του νωπού σπέρματος, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή διατήρηση λειτουργικών σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη.

Αναφορικά με της δοκιμές γονιμοποίησης, τα ποσοστά ανάπτυξης προνυμφών ήταν 77%–84% και τα ποσοστά εκκόλαψης ήταν 61%–69%. Από συνολική ποσότητα 200γρ ωαρίων προέκυψαν $83\text{--}108 \times 10^3$ προνύμφες. Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου η μοναδική στατιστικά σημαντική μείωση στο ποσοστό ανάπτυξης καθώς και στον συνολικό αριθμό εκκολαπτόμενων προνυμφών, παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ποσότητα σπέρματος ίση με μισό κρυοσωληνάριο (0.5 cryotube) για τη γονιμοποίηση 200 g ωαρίων (Εικόνα 3.2). Επιπλέον, το ποσοστό εκκόλαψης μειώθηκε σημαντικά τόσο στην περίπτωση χρήσης σπέρματος ποσότητας ίσης με μισό κρυοσωληνάριο όσο και όταν χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ίση με δύο κρυοσωληνάρια (Εικόνα 3.2). Αντίθετα, η

χρήση σπέρματος σε ποσότητα ίση με ένα ή δύο κρυοσωληνάρια διατήρησε τα ποσοστά σε επίπεδα συγκρίσιμα με εκείνα του νωπού σπέρματος (Εικόνα 3.2). Οι διαφορές αξιολογήθηκαν με μη παραμετρική ανάλυση Kruskal–Wallis και πολλαπλές συγκρίσεις μέσων τιμών.



Εικόνα 3.1 Παράμετροι κινητικότητας δειγμάτων σπέρματος υπό διαφορετικές συνθήκες ενεργοποίησης. **NATIVE**: πριν την κρυοσυντήρηση, **CRYO**: μετά την κρυοσυντήρηση και απόψυξη του σπέρματος. Η κινητικότητα του σπέρματος, η καμπυλόγραμμη ταχύτητα (VCL), η ευθυγραμμισμένη κίνηση (LIN) και η συχνότητα διασταύρωσης των χτυπημάτων της ουράς (BCF) παρουσιάζονται στα αντίστοιχα διαγράμματα (A–D). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος και διακυμάνσεις μεταξύ 25ου και 75ου εκατοστημορίου (n=30). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές μέσα στην ίδια πειραματική ομάδα σε διαφορετικούς χρόνους μετά την ενεργοποίηση (μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, $p < 0.05$). Το αστερίσκο υποδηλώνει σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στον ίδιο χρόνο μετά την ενεργοποίηση (δοκιμή συζευγμένων δειγμάτων Wilcoxon, $p < 0.05$).



Εικόνα 3.2: Ποσοστά ανάπτυξης και γονιμοποίησης, καθώς και ο συνολικός αριθμός προνυμφών που προέκυψαν από τα πειράματα. Οι ενδείξεις 0.5, 1 και 2 αντιστοιχούν στον αριθμό κρυοσωληναρίων (cryotubes) που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονιμοποίηση 200 g ωαρίων με κρυοσυντηρημένο σπέρμα. Στην ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 2,25 Μl νωπού σπέρματος, ποσότητα ισοδύναμη με τον όγκο σπέρματος της κρυοσωληναρίου 4,5 Μl. Δεδομένα που φέρουν διαφορετικά κεφαλαία γράμματα εντός της ομάδας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (ανάλυση διακύμανσης Kruskal–Wallis ακολουθούμενη από πολλαπλές συγκρίσεις μέσων τιμών, $p < 0.05$).

3.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαδικασία της απόψυξης είναι κρίσιμη για τη ποιότητα του σπέρματος και τη γονιμοποιητική του ικανότητα. Σε γενικές γραμμές θεωρείται ότι ο ρυθμός απόψυξης πρέπει να είναι υψηλός ώστε να αποφευχθεί η ανακρυστάλλωση (Lahnsteiner., 2000) και συγχρόνως να επιτραπεί η κίνηση του νερού και των κρυοπροστατευτικών ουσιών εντός του κυττάρου (Richardson et al., 2011).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η χρήση αυξημένων θερμοκρασιών απόψυξης (60°C για 100 s) έχει θετική επίδραση στην αποκατάσταση της ποιότητας του σπέρματος κυπρίνου μετά από κρυοσυντήρηση και αποδίδει ικανοποιητικά αποτελέσματα στη γονιμοποίηση. Σύμφωνα με τους Lahnsteiner et al., (1999) η βέλτιστη θερμοκρασία απόψυξης για το σπέρμα κυπρινιδών είναι 25 °C. Επιπλέον σύμφωνα με τους Bozkurt & Yavaş. (2017) η απόψυξη κατεψυγμένου σπέρματος της 30 °C οδήγησε σε επιτυχή κινητικότητα και γονιμοποιητική ικανότητα μετά την απόψυξη και πιο συγκεκριμένα η απόψυξη της 30 °C για 30 δευτερόλεπτα αποτέλεσε τη βέλτιστη συνθήκη για την επίτευξη ικανοποιητικής διάρκειας κινητικότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παραπάνω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν καλαμάκια χωρητικότητας 1,5ml με κρυοπροστατευτικό μέσο 10% μεθανόλη. Σύμφωνα με τους Baboo et al. (2019), ο καταλληλότερος ρυθμός απόψυξης εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, το ρυθμό κατάψυξης και το κρυοπροστατευτικό μέσο. Επομένως ο καταλληλότερος ρυθμός απόψυξης προσδιορίζεται σε συνάρτηση με το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης συμπεριλαμβανομένου και του μεγέθους του περιέκτη κρυοσυντήρησης (Sotnikov et al., 2024).

Αναφορικά με το μέγεθος των περιεκτών, σε γενικές γραμμές έχει μελετηθεί εκτενώς η χρήση δοχείων μεγαλύτερου όγκου σε σχέση με τα συμβατικά με όγκο 0,5ml σε διάφορα είδη ψαριών (Horvath et al., 2007). Εξάλλου ο μεγαλύτερος όγκος δοχείων αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τις ιχθυοκαλλιέργειες καθώς γονιμοποιείται μεγαλύτερος αριθμός αυγών ανά δείγμα. Ωστόσο, η χρήση δοχείων μεγάλου όγκου οδηγεί σε χαμηλότερους ρυθμούς κατάψυξης, μεγαλύτερης διάρκειας παραμονή στο σημείο πήξης και υψηλότερη ετερογένεια στο εσωτερικό του σωληναρίου, αυξάνοντας έτσι το ποσοστό κυτταρικής βλάβης (Bwanga et al., 1990, 1991). Σύμφωνα με τη μελέτη των Wheeler και Thorgaard. (1991) σε άτομα πέστροφας ουράνιο τόξο (*Oncorhynchus mykiss*) παρατηρήθηκε

ποσοστό γονιμοποίησης 49.3% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όταν χρησιμοποιήθηκαν περιέκτες όγκου 4,5ml. Επίσης, σε άτομα του ίδιου είδους (*Oncorhynchus mykiss*), η μελέτη των Cabrita et al. (2001) έδειξε ότι η χρήση δοχείων όγκου 5 ml οδήγησε σε μικρή μείωση της γονιμοποιητικής ικανότητας, η οποία θεωρήθηκε αποδεκτή λόγω της πρακτικότητας του μεγαλύτερου όγκου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Lahnsteiner et al. (1997) σε σαλμονοειδή, η χρήση σωληναρίων όγκου 1,2 ml έδωσε παρόμοια ποσοστά γονιμοποίησης με την ομάδα ελέγχου, σε αντίθεση με τα σωληνάρια όγκου 5 ml, που οδήγησαν σε φτωχά αποτελέσματα. Αναφορικά με τον κοινό κυπρίνο, στη μελέτη των Horváth et al. (2003) η χρήση συμβατικών σωληναρίων όγκου 0,5 ml είχε ως αποτέλεσμα ποσοστά εκκόλαψης $67 \pm 17\%$, παρόμοια με την ομάδα ελέγχου ($69 \pm 14\%$). Ωστόσο στη μελέτη των Horváth et al. (2007), επίσης σε άτομα κοινού κυπρίνου, τα σωληνάρια 1,2 ml έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα 5 ml, χωρίς της στατιστικά σημαντική διαφορά, εκτός από την περίπτωση κατάψυξης 3 λεπτών, όπου η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των σωληναρίων ήταν μεγάλη. Ο συγγραφέας απέδωσε τα χαμηλότερα ποσοστά εκκόλαψης στην περίπτωση των περιεκτών με όγκο 5 ml στους βραδύτερους ρυθμούς ψύξης, οι οποίοι παρατείνουν την έκθεση των σπερματοζωαρίων σε ωσμωτικά φαινόμενα πριν την πλήρη κατάψυξη. Στο πείραμα που παρατίθεται στη συγκεκριμένη ανασκόπηση (Sotnikov et al., 2024), η χρήση σωληναρίων όγκου 4,5ml δεν επηρέασε αρνητικά τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων με το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης που εφαρμόστηκε.

Σύμφωνα με τα ευρήματα του πειράματος που παραθέτουμε από τη μελέτη των Sotnikov et al. (2024), η κρυοδιατήρηση του σπέρματος κυπρίνου οδήγησε σε σημαντική μείωση του ποσοστού κινητών σπερματοζωαρίων και της καμπυλόγραμμης ταχύτητας (VCL), ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της γραμμικότητας της κίνησης (LIN) και της συχνότητας κτυπημάτων της ουράς (BCF). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε πρωτόκολλα κρυοδιατήρησης σπέρματος κυπρίνου παρατηρήθηκε αντίστοιχη μείωση στην παράμετρο κινητικότητας VCL και στη συνολική κινητικότητα και αύξηση στη παράμετρο LIN (Boryshpolets et al., 2009; Dzyuba et al., 2010; Dzyuba et al., 2013; Bernath et al., 2016; Boryshpolets et al., 2017; Marinovic et al., 2021). Ο παράγοντας BCF διαφέρει σε σχέση με προηγούμενες μελέτες όπου παρατηρείται μείωση και η αύξηση στην παρούσα μελέτη μπορεί να σχετίζεται με τον χρόνο που μεσολαβεί μετά την ενεργοποίηση και της επιδράσεις της της διαδικασίας της κρυοδιατήρησης

(Sotnikov et al., 2024). Δεδομένου ότι η γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων στο παρόν πείραμα διατηρήθηκε υψηλή, πιθανόν η παραπάνω διαφορά να μην επιδρά αρνητικά (Sotnikov et al., 2024).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκαν στα δείγματα κρυοσυντηρημένου σπέρματος, μετά την απόψυξη του, υποπληθυσμοί σπερματοζωαρίων με κινητικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του νωπού σπέρματος. Όμοιες παρατηρήσεις σημειώθηκαν και στις μελέτες των Gallego et al. (2017) και Marinovic et al. (2021) στο ταμπάκι (*Colossoma macropomum*) και στον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpio*) αντίστοιχα. Τέτοιες ομάδες σπερματοζωαρίων θα μπορούσε να είναι μια πολύ καλή πηγή πληροφοριών για την επίδραση της κρυοδιατήρησης και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του σπέρματος για μεγαλύτερη κρυοαντοχή.

Αναφορικά με τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος κυπρίνου εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης του πειράματος των Sotnikov et al. (2024) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά ανάπτυξης και εκκόλαψης, καθώς και στο συνολικό αριθμό προνυμφών που προέκυψαν από τα πειράματα όταν χρησιμοποιήθηκε όγκος κρυοσυντηρημένου σπέρματος ίση με 4,5ml (ίση με τον όγκο ενός κρυοσωληναρίου-2,25ml σπέρματος) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όπου χρησιμοποιήθηκε νωπό σπέρμα σε ποσότητα 2,25ml. Αντίθετα, στη μελέτη των Bokor et al. (2023) σε άτομα κοινού κυπρίνου στην περίπτωση κατεψυγμένου σπέρματος παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά εκκόλαψης και επιβίωσης των προνυμφών, της η μετέπειτα ανάπτυξη και βιωσιμότητα των προνυμφών ήταν παρόμοια με εκείνη που προήλθε από νωπό σπέρμα. Τέλος, σε άτομα κοινής πέστροφας (*Salmo trutta*) στη μελέτη των Nusbaumer et al. (2019), η κρυοδιατήρηση δεν επηρέασε σημαντικά τη γονιμοποίηση, την ανάπτυξη ή την επιβίωση στο εμβρυϊκό στάδιο, αλλά προκάλεσε μείωση της ανάπτυξης των προνυμφών μετά την εκκόλαψη.

Η σημασία αυτών των αποτελεσμάτων για την ιχθυοκαλλιέργεια είναι διττή, καθώς επιτυγχάνεται η αύξηση λειτουργικής αποδοτικότητας, δηλαδή οι μονάδες παραγωγής μπορούν να διαχειριστούν μεγαλύτερους όγκους σπέρματος με λιγότερη χειρωνακτική εργασία και μικρότερο κόστος ανά δείγμα ενώ επιπρόσθετα επιτρέπεται η διατήρηση αναπαραγωγικής ικανότητας, καθώς παρά τον μεγαλύτερο όγκο και τη σχετική καθυστέρηση στην απόψυξη, η υψηλή θερμοκρασία απόψυξης φαίνεται να εξουδετερώνει τα μειονεκτήματα του αυξημένου όγκου. Ωστόσο, η μέθοδος απαιτεί

περαιτέρω βελτιστοποίηση. Στοιχεία της, όπως η διάρκεια απόψυξης, η γεωμετρία του δοχείου και η ταχύτητα μεταφοράς θερμότητας ενδέχεται να επηρεάσουν την ομοιομορφία απόψυξης και την τελική ποιότητα. Επιπλέον, απαιτείται μακροχρόνια μελέτη για την αξιολόγηση της επίδρασης της διαδικασίας στη βιωσιμότητα των απογόνων, καθώς και ενδεχόμενες επιγενετικές μεταβολές.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει ότι η κρυοσυντήρηση σπέρματος *Cyprinus carpio* σε δοχεία αυξημένης χωρητικότητας είναι εφικτή και αποδοτική, υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται κατάλληλα για το είδος πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης.

Επιπροσθέτως, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση της γονιμοποιητικής ικανότητας, γεγονός που ενδυναμώνει την ένδειξη χρησιμοποίησης των περιεκτών αυξημένης χωρητικότητας σε βιομηχανική κλίμακα. Εξάλλου, η μέθοδος αυτή προσφέρει πλεονεκτήματα στη διαχείριση μεγάλων ποσοτήτων σπέρματος μειώνοντας έτσι το χρόνο και το κόστος διαχείρισης ανά μονάδα.

Με βάση τα παραπάνω, συνίσταται το συμπέρασμα ότι η ενσωμάτωση αυτών των βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας κρίνεται επιβεβλημένη, ενώ επισημαίνεται η ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της μακροχρόνιας επίπτωσης της κρυοσυντήρησης στη γονιμότητα και ποιότητα των απογόνων.

Η εν λόγω μελέτη ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω εμβάθυνση στην κατανόηση των βιολογικών και τεχνολογικών παραμέτρων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της κρυοσυντήρησης σπέρματος στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), ένα είδος υψηλής σημασίας για την υδατοκαλλιέργεια.

Στο πλαίσιο αυτό, μία ιδιαίτερα υποσχόμενη κατεύθυνση για μελλοντική έρευνα είναι η συστηματική αξιολόγηση του ρόλου διαφορετικών ρυθμών και προφίλ απόψυξης (της σταδιακής απόψυξης, υπερταχείας απόψυξης και απόψυξης με παλμικά θερμικά κύματα) στη διατήρηση της λειτουργικότητας και της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, η ενσωμάτωση νέων, βιοσυμβατών και λιγότερο τοξικών κρυοπροστατευτικών παραγόντων (π.χ. φυσικοί πολυσακχαρίτες, συνδυασμοί DMSO με αντιοξειδωτικά, ή νανοσωματίδια με ρυθμιστική δράση) θα μπορούσε να συμβάλει στη βελτίωση της μακροχρόνιας βιωσιμότητας του σπέρματος, ελαχιστοποιώντας παράλληλα της βλάβες που προκαλούνται από τον σχηματισμό παγοκρυστάλλων και την οξειδωτική καταπόνηση.

Τέλος, κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω εφαρμογή των υπό μελέτη πρωτοκόλλων σε πειραματικές διαδικασίες γονιμοποίησης και εκκόλαψης, ώστε να αξιολογηθεί η πραγματική αναπαραγωγική απόδοση σε επίπεδο απογόνων (π.χ. ποσοστά εκκόλαψης,

επιβίωση προνυμφών, ρυθμοί ανάπτυξης). Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και η μελέτη ατομικών ιδιοτήτων των αρσενικών ατόμων που μπορεί να επηρεάζουν την ανθεκτικότητά της στην κρυοσυντήρηση, της οι παράμετροι κινητικότητας και η σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, σε συνάρτηση με τα εφαρμοζόμενα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης.

Η συστηματική μελέτη των παραπάνω παραμέτρων θα μπορούσε όχι μόνο να ενισχύσει τη χρήση της κρυοσυντήρησης ως εργαλείο για την αναπαραγωγή και γενετική διατήρηση του κυπρίνου, αλλά και να αποτελέσει πρότυπο για την εφαρμογή αντίστοιχων τεχνολογιών σε άλλα σημαντικά είδη ιχθυοκαλλιέργειας.

Συμπερασματικά, η συνδυασμένη εφαρμογή δοχείων αυξημένης χωρητικότητας και υψηλότερων θερμοκρασιών απόψυξης αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για εφαρμογή σε εμπορική ή ερευνητική κλίμακα, χωρίς ουσιαστικούς συμβιβασμούς στην ποιότητα του σπέρματος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, N. K. (2011). *Cryopreservation of fish Gametes.pdf*. 104–127.
- Alikunhi, K. H. *Synopsis of Biological Data on Common Carp Cyprinus Carpio (Linnaeus), 1758 (Asia and the Far East)*. Vol. 31. Quebec: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1966.
- Asturiano, Juan, F., Elsa Cabrita, and Ákos Horváth. "Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review." *General and comparative endocrinology* 245 (2017): 69-76.
- Aygül, E., Günes, Y., and Menekse Didem, D. (2022). "Cryopreservation Studies in Aquaculture from Past to Present: Scientific Techniques and Quality Controls for Commercial Applications," in *Cryopreservation*. Ed. Q. Marian (Rijeka: IntechOpen).
- Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J., Adamek, J., 1997. Cry opreservation of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquacult. Res.* 28, 567–571.
- Baboo, J., Kilbride, P., Delahaye, M., Milne, S., Fonseca, F., Blanco, M., et al. (2019). The impact of varying cooling and thawing rates on the quality of cryopreserved human peripheral blood T cells. *Sci. Rep.* 9 (1), 3417. doi: 10.1038/s41598-019-39957-x
- Balon, E. K. (1995). *The common carp, Cyprinus carpio: its wild origin, domestication in aquaculture, and selection as colored nishikigoi*. *Environmental Change and the Culture of Common Carp in Medieval Europe*.
- Bernath, G., Zarski, D., Kasa, E., Staszny, A., Varkonyi, L., Kollar, T., et al. (2016). Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation using a programable freezer. *Gen. Comp. Endocrinol.* 237, 78–88. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.08.013
- Blaxter, J.H.S (1953). Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172, 1189-1190.
- Bokor Z, Láng ZL, Várkonyi L, Fodor F, Nagy B, Csókás E, Molnár J, Csorbai B, Csenki-Bakos Z, Ivánovics B, Griffiths JD, Urbányi B, Bernáth G. The growth performance of pond-reared common carp (*Cyprinus carpio*) larvae propagated using cryopreserved sperm. *Fish Physiol Biochem.* 2024 Oct;50(5):2001-2012. doi: 10.1007/s10695-023-01245-x. Epub 2023 Oct 3. PMID: 37787908; PMCID: PMC11576788.
- Bondarenko, O., Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Prokopchuk, G., Psenicka, M., et al. (2013). Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: interspecies differences. *Theriogenology* 79 (5), 872–881. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.01.005

- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Li, P., Hulak, M., Gela, D., et al. (2009). Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology* 59 (3), 291–296. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.08.005
- Boryshpolets, S., Sochorova, D., Rodina, M., Linhart, O., and Dzyuba, B. (2017). Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm: impact of seeding and freezing rates on post-thaw outputs. *Biopreservation Biobanking* 15 (3), 234–240. doi: 10.1089/bio.2016.0065
- BOZKURT, Y., & YAVAŞ, İ. (2017). Effect of Different Straw Volumes and Thawing Rates on Post-Thaw Quality and Fertilization Ability of Cryopreserved Common Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 3(1), 25–25. <https://doi.org/10.17216/limnofish.277835>
- Bwanga, C.O., de Braganca, M.M., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H., 1990. Cryopreservation of boar semen in mini and maxi-straws. *Zentralbl. Veterinaermed., A* 37, 651–658.
- Bwanga, C.O., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H., 1991. Cryopreservation of boar semen: II. Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.* 32, 455–461.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., & Herraéz, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives.
- Cejko, B. I., Kowalski, R. K., Kucharczyk, D., Narski, D., Targonska, K., and Glogowski, J. (2011). Effect of time after hormonal stimulation on semen quality indicators of common carp, *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). *Acta Ichthyologica Piscatoria* 41 (2), 75–80. doi: 10.3750/aip2011.41.2.01
- Dokina, O., Pronina, N., Kovalev, K., Milenko, V., and Tsvetkova, L. (2019). Improved technology of carp sperm cryopreservation in a large-scale cryobank. *Fisheries* 5 (5), 97–105
- Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., Gela, D., and Linhart, O. (2010). Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze-thawing in different fish species. *J. Appl. Ichthyology* 26 (5), 720–725. doi: 10.1111/j.1439-0426.2010.01553.x
- Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Bondarenko, O., Rodina, M., Gela, D., et al. (2013). Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Cryobiology* 66 (2), 192–194. doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.12.003
- E. Cabrita, V. Robles, R. Alvarez, M.P. Herra 'ez, Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization, *Aquaculture* 201 (2001) 301–314.

F. Lahnsteiner, T. Weismann, R.A. Patzner, Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes, *Aquacult. Res.* 28 (1997) 471–479.

FAO (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022* (Rome: FAO)

Flajshans, M., Linhart, O., Slechtová, V., and Slechta, V. (1999). Genetic resources of commercially important fish species in the Czech Republic: present state and future strategy. *Aquaculture* 173 (1), 471–483. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00477-3

Freyhof, J. & Kottelat, M., 2007. *Handbook of European Freshwater Fishes*, IUCN: International Union for Conservation of Nature. IUCN Species Survival Commission (SSC), Freshwater Fish Specialist Group, North of England Zoological Society, UK, Wetlands International. Retrieved from <https://coillink.org/20.500.12592/gbmsr0> on 22 Jun 2025. COI: 20.500.12592/gbmsr0.

Gallego, V., Cavalcante, S. S., Fujimoto, R. Y., Carneiro, P. C. F., Azevedo, H. C., and Maria, A. N. (2017). Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology* 87, 16–24. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.08.001

Gorda, S., Bakos, J., Liska, J., and Kakuk, C. (1995). Live gene bank of common carp strains at the fish-culture-research-institute, szarvas. *Aquaculture* 129 (1-4), 199–202. doi: 10.1016/0044-8486(94)00248-M

Henry, M. A., Noiles, E. E., Gao, D., Mazur, P., and Critser, J. K. (1993). Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility Sterility* 60 (5), 911–918. doi: 10.1016/S0015-0282 (16)56296-7

Horton, H. F., and Ott, A. G. (1976). Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *J. Fisheries Res. Board Canada* 33 (4), 995–1000. doi: 10.1139/f76-126

Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resource*, 16, 457–460.

Horváth, Á., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Osz, K., Szabó, K., & Urbányi, B. (2007). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2- and 5-ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54(2), 251–257

Hulata, G. (1995). A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture*, 129(1), 143–155. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00244-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00244-1)

Irawan, H., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 122(3–4), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.017>

Janssen, K., Chavanne, H., Berentsen, P., and Komen, H. (2017). Impact of selective breeding on European aquaculture. *Aquaculture* 472 (1-4), 8–16. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.012

Kirpichnikov V.S. (1999) *Genetics and Breeding of Common Carp*. Paris: INRA, 97 pp.

Kopeika, E., Kopeika, J., and Zhang, T. (2007). “Cryopreservation of Fish Sperm,” in *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Eds. J. G. Day and G. N. Stacey (Totowa, NJ, USA: Humana Press).

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T. 1999. Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *J Exp Zool*. 284(4):454–465. doi: 10.1002/(SICI)1097-010X(19990901)284:43.0.CO;2-O

Lahnsteiner F. 2000. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. *Aquacult Res*. 31(3):245–258. doi: 10.1046/j.1365-2109.2000.00452.x

Maria A.N., Viveiros A.T.M., Orfao L.H., Oliveira A.V., Moraes G.F., 2006. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish *piracanjuba* *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Animal Reproduction*, 3(1), pp.55-60.

Marinovic, Z., Scekcic, I., Lujic, J., Urbanyi, B., and Horvath, A. (2021). The effects of cryopreservation and cold storage on sperm subpopulation structure of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology* 99, 88–94. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.01.007

Martinez-Paramo, S., Horvath, A., Labbe, C., Zhang, T., Robles, V., Herraiez, P., et al. (2017). Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture* 472, 156–177. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.05.042

Nusbaumer, D., Marques da Cunha, L., and Wedekind, C. (2019). Sperm cryopreservation reduces offspring growth. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 286 (1911), 20191644. doi: 10.1098/rspb.2019.1644

P.A. Wheeler, G.H. Thorgaard, Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws, *Aquaculture* 93 (1991) 95–100

Rana K. 1995. Preservation of gametes. In : *Broodstock management and egg and larval quality* (ed. by Bromage N.R. & Roberts R.J.), pp. 53- 76, Cambridge University Press, Cambridge

Richardson GF, McNiven MA, Mansour N. 2011. Effect of methanol concentration and thaw rate on the viability and fertility of cryopreserved Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. *Aquacult Res.* 42(8):1096-1100.

Sunarma A., Hastuti D.W.B., Sistina Y., 2007. Utilization of honey as an Extender Combined to Different Cryoprotectant on Sperm Cryopreservation of Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842). *Indoorcommunity. Files. Wordpress.com.*

Tiersch T. R., 2001. Cryopreservation in Aquarium Fishes. *Marine Biotechnology*, 3, pp.212 -223.

Urbanyi, B., and Horvath, A. (2008). "Cryopreservation of common carp sperm," in *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Eds. E. Cabrita, V. Robles and P. Herraiez (Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group), 351–356.

Weber, M. J., & Brown, M. L. (2012). Maternal effects of common carp on egg quantity and quality. *Journal of Freshwater Ecology*, 27(3), 409–417.
<https://doi.org/10.1080/02705060.2012.666890>

Yavas, I., and Bozkurt, Y. (2011). Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 25 (1), 2254–2257. doi: 10.5504/BBEQ.2011.0018

Zhang, T., Plachinta, M., Isayeva, A., & Rawson, D. M. (2005). "Membrane integrity and cathepsin activities of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to –196 °C using controlled slow cooling." *Cryobiology*, 51, 385–386.

