



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας
Περιβαλλοντική βιολογία

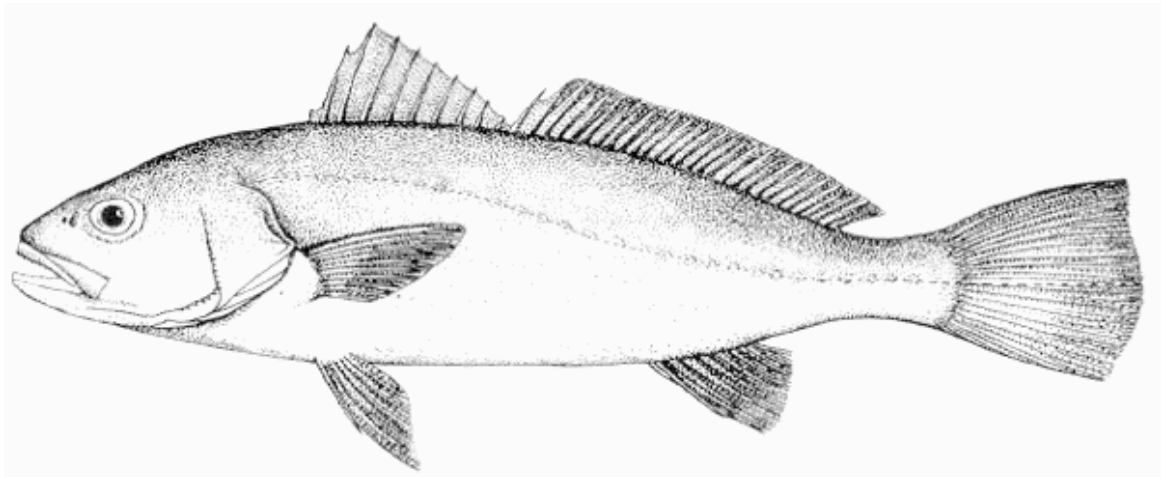


διαχείριση χερσαίων και θαλάσσιων βιολογικών πόρων

Μεταπτυχιακή διατριβή

Νικόλαος Μητριζάκης

Μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου του κρανιού, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) και ορμονική πρόκληση της αναπαραγωγής του με χρήση εμφυτευμάτων GnRHα



Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Μυλωνάς

Ηράκλειο, 2011



University of Crete
Department of Biology
M.Sc. Management of

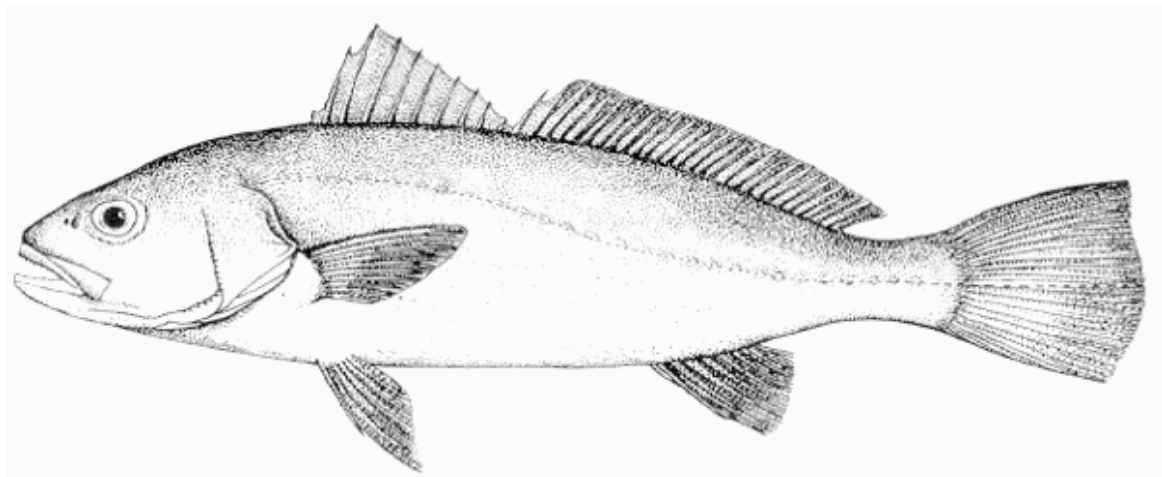


terrestrial and marine resources

M.Sc. Thesis

Nikolaos Mitrizakis

Reproductive biology of meager, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) and induction of spawning using GnRH α implants



Supervisor: Costantinos C. Mylonas

Heraklion, 2011

Επιβλέπων:

Κωνσταντίνος Μυλωνάς (Ερευνητής Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών)

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Μαρουδιώ Κεντούρη (Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Μιχαήλ Παυλίδης (Επίκουρος καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Κωνσταντίνος Μυλωνάς (Ερευνητής Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών)

Στην οικογένεια μου...

Πρόλογος

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας πολλοί είναι αυτοί που θα ήθελα να ευχαριστήσω. Πρώτα από όλα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Dr. Κωνσταντίνο Μυλωνά για την τόσο ουσιαστική και επιμορφωτική καθοδήγησή του. Η βοήθεια του τόσο στον επιστημονικό αλλά και στον οικονομικό τομέα ήταν πραγματικά πολύτιμη. Αισθάνομαι ότι έχω αναπτύξει ένα καλύτερο τρόπο δουλειάς αλλά και σκέψης μέσα από αυτή τη σχεδόν διετή συνεργασία. Ακόμη, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω εκτός από επιστήμονα και τον άνθρωπο Ντίνο για το χρόνο, την παρέα και τις κουβέντες που κάναμε μαζί. Ντίνο, σε ευχαριστώ για όλα!

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τους Dr. Μιχάλη Παυλίδη (Επίκουρο Καθηγητή) και Dr. Μαρουδιώ Κεντούρη (Καθηγήτρια) για τις ουσιαστικές συμβουλές αλλά και διορθώσεις στην παρούσα μελέτη.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω και τα υπόλοιπα δύο μέλη της επιστημονικής μου οικογένειας, Παπαδάκη Μαρία και Συγγελάκη Ειρήνη για την πολύ μεγάλη βοήθεια που μου προσέφεραν σε όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Dr. Cristian Fauvel από το IFREMER στο Palavas της νότιας Γαλλίας για τον πολύτιμο χρόνο του και την τόσο απλόχερη παροχή γνώσεων που μου παρείχε το χρονικό διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριό του.

Ασφαλώς, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τη σύντροφό μου Νίκη Παξιμαδά για την αγάπη, τη βοήθεια και τη στήριξη σε όλες τις «περίεργες» στιγμές μου! Στην ίδια παράγραφο, μιας και είναι στενά συνδεδεμένη με αυτόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω και το Ρήγα απλά και μόνο για τις τόσες ώρες συντροφιάς!!!

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου για την αδιάκοπη στήριξη, αγάπη και βοήθεια σε όλη μου τη ζωή. Χωρίς αυτούς τους ανθρώπους σίγουρα δεν θα είχα καταφέρει να φτάσω ως εδώ. Πραγματικά, αν όχι τα πάντα, τους οφείλω πάρα πάρα πολλά!!!

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	9
Abstract	12
1. Εισαγωγή.....	15
1.1 Περί ιχθυοκαλλιέργειας	15
1.2 Κρανιός (<i>Argyrosomus regius</i>).....	16
1.3 Αναπαραγωγή στα ψάρια.....	18
1.3.1 Γαμετογένεση	18
1.3.2 Αναπαραγωγή σε συνθήκες εκτροφής	21
1.3.3 Ορμονική πρόκληση γαμετοτοκίας.....	22
1.3.4 Αναπαραγωγή του κρανιού	24
1.4 Στόχος.....	25
2. Αναπαραγωγικός κύκλος του Κρανιού.....	27
2.1 Εισαγωγή.....	28
2.2 Υλικά και μέθοδοι	30
2.2.1 Διαχείριση γεννητόρων	30
2.2.2 Μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου	30
2.2.3 Στατιστική ανάλυση.....	31
2.3 Αποτελέσματα.....	32
2.4 Συζήτηση.....	42
3. Ορμονική πρόκληση της αναπαραγωγής στον Κρανιό.....	47
3.1 Εισαγωγή.....	48
3.2 Υλικά και μέθοδοι	50
3.2.1 Διαχείριση γεννητόρων	50
3.2.2 Πειράματα ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής	50

3.2.3 Συλλογή και ποιότητα γαμετών	51
3.2.4 Στατιστική ανάλυση	52
3.3 Αποτελέσματα	53
3.4 Συζήτηση.....	63
4. Συμπεράσματα	67
5. Παραρτημα	69
5.1 CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)	Error! Bookmark not defined.
5.2 Συλλογή δειγμάτων σπέρματος.....	Error! Bookmark not defined.
5.3 Παρασκευή διαλυμάτων	Error! Bookmark not defined.
5.4 Ηλεκτρονικός και λοιπός εξοπλισμός.....	Error! Bookmark not defined.
5.5 Μέτρηση της κινητικότητας του σπέρματος μέσω CASA	Error! Bookmark not defined.
6. Βιβλιογραφία	76

Περίληψη

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου του κρانيού (*Argyrosomus regius*) καθώς και η ορμονική πρόκληση της γαμετοτοκίας του με χρήση εμφυτευμάτων αγωνιστών της γοναδοεκλυτίνης (gonadotropin releasing-hormone agonist, GnRHa). Για την μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου πραγματοποιήθηκαν 7 δειγματοληψίες σε διάστημα 8 μηνών. Από 17/11/2009 έως 15/3/2010 οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν κάθε δύο μήνες και στη συνέχεια (15/4/2010 – 16/7/2010) ανά μήνα. Χρησιμοποιήθηκαν 13 ψάρια (7 θηλυκά, 6 αρσενικά) αρχικού μέσου βάρους \pm τυπική απόκλιση 3.828 ± 647 g προερχόμενα από εκτροφή του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε του 2005. Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν έλεγχος του σταδίου της γαμετογένεσης με απαλή κοιλιακή μάλαξη στα αρσενικά και με λήψη βιοψίας από τις γονάδες στα θηλυκά. Σε περίπτωση που τα αρσενικά ήταν σπερμιάζοντα το σπέρμα φυλασσόταν σε πάγο και στη συνέχεια με χρήση κατάλληλης μεθοδολογίας (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA) γινόταν εκτίμηση των βασικών χαρακτηριστικών της ποιότητάς του (παράρτημα). Στα θηλυκά άτομα πραγματοποιούνταν έλεγχος του νωπού δείγματος σε οπτικό μικροσκόπιο και μέρος της βιοψίας φυλάσσονταν σε μονιμοποιητικό διάλυμα προκειμένου να υποβληθεί σε ιστολογική εξέταση. Παράλληλα, γινόταν λήψη αίματος για την εκτίμηση της ποσότητας των στεροειδών ορμονών. Τεστοστερόνης (Testosterone, T) και Οιστραδιόλης (Estradiol, E₂) για τα θηλυκά άτομα και Τεστοστερόνης και 11-Κετοτεστοστερόνης (11-Ketotestosterone, 11-KT) για τα αρσενικά. Τα ωκύτταρα παρουσίασαν σταδιακή αύξηση της διαμέτρου τους κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών και τον Ιούνιο η διάμετρος σημείωσε την υψηλότερη τιμή της ($574 \pm 11,5$ μm). Αντίθετα, κατακόρυφη πτώση σημειώθηκε το μήνα Ιούλιο καθώς καταγράφηκε διάμετρος παρόμοια με του Νοεμβρίου και του Ιανουαρίου ($128 \pm 8,4$ μm). Ιστολογικά, οι γονάδες περιείχαν ωκύτταρα σε διάφορα στάδια της ωογένεσης οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το είδος ωοτοκεί περισσότερες από μία φορές κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής του περιόδου. Από την ανάλυση του πλάσματος στα θηλυκά άτομα, οι μέγιστες τιμές καταγράφηκαν τον Μάιο ($T=0,2$ ng ml^{-1} , $E_2=0,47$ ng ml^{-1}), ένα μήνα πριν την μέγιστη διάμετρο των ωοκυττάρων. Στη συνέχεια η συγκέντρωση της E₂ μειώθηκαν όπως τους προηγούμενους μήνες, ενώ η T παρουσίασε ένα δεύτερο μέγιστο τον Ιούλιο ($T=0,16$ ng ml^{-1}). Τα αρσενικά άτομα ήταν σπερμιάζοντα από τον Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο και παρήγαγαν σπέρμα σταθερής πυκνότητας ($26,8 \pm 7 \times 10^9$ szoa ml^{-1}) και κινητικότητας ($62,3 \pm 14,9$ %). Η διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος επίσης παρέμεινε σταθερή ($1,2 \pm 0,5$ min) και παρουσίασε μέγιστο τον Απρίλιο ($1,94 \pm 1,5$ min). Από την ανάλυση του πλάσματος για την εκτίμηση

του επιπέδου των στεροειδών ορμονών στα αρσενικά άτομα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή και των δύο ορμονών με το χρόνο. Για την 11-KT η υψηλότερη τιμή σημειώθηκε τον Μάρτιο ($0,8 \text{ ng ml}^{-1}$) ενώ για την T τον Ιούλιο ($0,3 \text{ ng ml}^{-1}$). Οι χαμηλότερες τιμές σημειώθηκαν τον Νοέμβριο και για τις δύο ορμόνες. Ο μήνας έναρξης της σπερμίας συμπίπτει με το μέγιστο της 11-KT ενώ το μέγιστο της T συμπίπτει με τον τελευταίο μήνα σπερμίας.

Για την μελέτη της ορμονικής πρόκλησης της γαμετοτοκίας πραγματοποιήθηκαν πειράματα δύο διαδοχικά έτη (2009 – 2010). Το 2009 σε χρονικό διάστημα 45 ημερών πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα ομαδικής πρόκλησης γαμετοτοκίας. Εξετάστηκαν συνολικά 26 ψάρια (12 θηλυκά, 14 αρσενικά) από τα οποία τα 23 (11 θηλυκά, 12 αρσενικά) υποβλήθηκαν σε ορμονική αγωγή. Τα ψάρια τοποθετήθηκαν στις τρεις δεξαμενές στις 5/5/2009 (3 θηλυκά, 3 αρσενικά), στις 18/5/2009 (4 θηλυκά, 5 αρσενικά) και στις 9/6/2009 (4 θηλυκά, 4 αρσενικά) και είχαν αρχικό μέσο σωματικό βάρος $6.934 \pm 1.949 \text{ g}$. Έπειτα από έλεγχο της βιοψίας των θηλυκών ατόμων σε οπτικό μικροσκόπιο και έλεγχο σπερμίας στα αρσενικά γινόταν χορήγηση εμφυτεύματος GnRHα σε δόση $430 \pm 150 \text{ mg}$ και τα ψάρια επανατοποθετούνταν στην δεξαμενή όπου αναμενόταν η γαμετοτοκία. Η πρώτη ωοτοκία πραγματοποιήθηκε δύο ημέρες μετά την χορήγηση του εμφυτεύματος σε όλες τις περιπτώσεις ενώ η μέση ετήσια σχετική γονιμότητα εκτιμήθηκε στα $364.993 \text{ αυγά kg}^{-1}$ και το ποσοστό γονιμοποίησης στο $85 \pm 2\%$. Τα αρσενικά άτομα που υποβλήθηκαν σε ορμονική θεραπεία, παρήγαγαν σπέρμα πυκνότητας $14 \pm 5,3 \times 10^9 \text{ sperm ml}^{-1}$. Η κινητικότητά του υπολογίστηκε στο $78 \pm 6,8\%$ και η διάρκεια της κινητικότητας στα $1,8 \pm 0,1 \text{ min}$. Η σχετική γονιμότητα και το ποσοστό γονιμοποίησης των θηλυκών αλλά και η πυκνότητα, η κινητικότητα και η διάρκεια κινητικότητας των αρσενικών δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά (ANOVA, $p \leq 0,05$). Την δεύτερη χρονιά (2010) διεξήχθησαν τα ατομικά πειράματα ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής. Σε δύο χρονικές στιγμές, στις 4/5/2010 και στις 3/6/2010, 3 θηλυκά και 6 αρσενικά άτομα αρχικού μέσου βάρους $8.238 \pm 2.190 \text{ g}$ τοποθετήθηκαν σε 3 δεξαμενές σε αναλογία 1:2 ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία ελέγχου και χορήγησης εμφυτευμάτων. Η πρώτη ωοτοκία πραγματοποιήθηκε δύο ημέρες μετά την χορήγηση του εμφυτεύματος ενώ η μέση ετήσια σχετική γονιμότητα ήταν $434.860 \text{ αυγά kg}^{-1}$. Το μέσο ποσοστό γονιμοποίησης ήταν $92 \pm 8\%$, και ο αριθμός των ωοτοκιών 11 ± 5 ωοτοκίες. Έπειτα από την πρώτη ωοτοκία οι ωοτοκίες συνεχίζονταν για τουλάχιστον 5 ημέρες και έπειτα από παύση το πολύ δύο ημερών οι ωοτοκίες συνεχίζονταν. Η γονιμότητα παρουσίαζε

μέγιστο στις πρώτες 4 ωοτοκίες και στη συνέχεια μειωνόταν σταδιακά μέχρι το τέλος των ωοτοκιών. Αντιθέτως το ποσοστό γονιμοποίησης παρέμεινε σταθερό πάνω από το 56,8% και σε ορισμένες περιπτώσεις άγγιξε και το 100%. Όσο αφορά τη γονιμότητα και το ποσοστό γονιμοποίησης δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ούτε μεταξύ των ατόμων ούτε μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Συμπερασματικά λοιπόν, ο κρυνός έφερε ωκύτταρα σε πλήρη λεκιθογένεση από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο, ενώ τα αρσενικά άτομα ήταν σπερμιάζοντα τους μήνες αυτούς. Από την προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας και τον Μάιο και τον Ιούνιο καταγράφηκαν εξίσου θετικά αποτελέσματα ενώ η παραγωγή των αυγών υπολογίστηκε στο 40.768 ± 36.911 αυγά kg^{-1} ωοτοκία⁻¹ με ποσοστό γονιμοποίησης $92 \pm 8\%$ σε 11 ± 5 ωοτοκίες. Η αναπαραγωγή του είδους λοιπόν είναι εφικτή από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο αλλά μόνο με ορμονική θεραπεία παράγοντας γαμέτες σχετικά καλής ποιότητας.

Abstract

The target of the present study was the investigation of the reproductive cycle of meagre (*Argyrosomus regius*) as well as the hormonal induction of reproduction using implants of gonadotropin releasing-hormone agonist (GnRHa). For the study of the reproduction cycle 7 samplings were performed within a period of 8 months. From 17/11/2009 until 15/3/2010 samplings were performed every 2 months and subsequently (15/4/2010 – 16/7/2010) monthly. Thirteen fish were used (7 females, 6 males) with an initial mean weight \pm standard deviation $3,828 \pm 647$ g, which originated from the HCMR breeding unit in 2005. The stage of gametogenesis was examined during each sampling by a gentle abdominal massage in males and by gonad biopsy in females. When males were spermiating, the sperm was stored in ice and then with the use of an appropriate methodology (Computer Assisted Aperm Analysis, CASA) the basic characteristics of sperm quality were assessed (annex). In females the fresh sample was examined under an optical microscope and part of the biopsy was stored in fixation solution in order to be examined histologically. At the same time, a blood sample was collected in order to estimate the quantity of steroidal hormones (ng ml^{-1}), testosterone (T) and estradiol (E_2) for females, and testosterone and 11-ketotestosterone (11-KT) for males. The oocytes presented a gradual increase in their diameter during the samplings and in June the diameter reached its highest value ($574 \pm 11.5 \mu\text{m}$). On the contrary, a vertical reduction was noted during July when the recorded diameter was similar to the one of November and January ($128 \pm 8.4 \mu\text{m}$). Histologically, the gonads contained oocytes in several stages of oogenesis driving to the conclusion that this species spawns more than once during its reproductive period. The plasma analysis indicated that the maximum values for both hormones in females were recorded in May ($T=0.2 \text{ ng ml}^{-1}$, $E_2=0.47 \text{ ng ml}^{-1}$), a month before the maximum diameter of oocytes. Subsequently, the levels of E_2 seemed to return to low levels similar to the previous months, while T presented a second peak in July ($T=0.16 \text{ ng ml}^{-1}$). Males were spermiating from March to June and produced sperm of constant density ($26.8 \pm 7 \times 10^9 \text{ sperm ml}^{-1}$) and motility ($62 \pm 15\%$). The duration of sperm mobility was also constant ($1.2 \pm 0.5 \text{ min}$) and presented a maximum in April ($1.94 \pm 1.5 \text{ min}$). The plasma analysis for the estimation of steroid hormones level in males indicated a statistically significant change for both hormones in time. The maximum value for 11-KT was recorded in March (0.818 ng/ml), whereas for T in July (0.295 ng ml^{-1}). The lowest values were recorded in November for both hormones. The starting month of spermiation

coincides with the maximum of 11-KT, while the maximum of T coincides with the last month of spermiation.

Experiments were performed for the study of the hormonal induction of reproduction during two successive years (2009-2010). In 2009 during a period of 45 days three experiments of group induction of spawning were performed. In total 26 fish were examined (12 females, 14 males) from which 23 (11 females, 12 males) received hormonal treatment. The fish were placed in three tanks at 5/5/2009 (3 females, 3 males), at 18/5/2009 (4 females, 5 males) and at 9/6/2009 (4 females, 4 males) and they had an initial mean body weight of $6,934 \pm 1,949$ g. After the biopsy examination of females under an optical microscope and the spermiation examination in males, a GnRH α implant (430 ± 150 mg) was administered and the fish were returned in the tank while the spawning was expected. The first spawning took place two days after the administration of the implant in all cases, while the mean annual relative fecundity was estimated at $364,993$ eggs kg^{-1} and the percentage of fertilization at $85 \pm 2\%$. The male individuals which received hormonal therapy produced sperm with a density of $14 \pm 5.3 \times 10^9$ sperm ml^{-1} . The sperm motility was estimated at $78 \pm 7\%$ and the duration of mobility at 1.8 ± 0.1 min. The relative fecundity and fertilization for females and density and motility for males were not statistically significantly different (ANOVA, $p \leq 0.05$). The individual experiments on the hormonal induction of reproduction were performed during the second year (2010). During two time points, at 4/5/2010 and at 3/6/2010, 3 females and 6 males of initial mean weight $8,238 \pm 2,190$ g were placed in 3 tanks at a 1:2 ratio following the above process of control and administration of implants. The first spawning took place two days after the administration of the implant, while the mean annual relative fecundity estimated at $434,860$ eggs kg^{-1} , the mean percentage of fertilization was $92 \pm 8\%$ and the number of spawnings recorded was 11 ± 5 . After the first spawn the spawning continued for at least 5 days, and after a 2-day cease at the maximum, the spawning continued. Fecundity presented a maximum during the first four spawnings and was then gradually reduced until the end of the spawnings. In the opposite case, the percentage of fertilization remains constantly above 57% and in some cases reached 100%. There was no statistically significant difference regarding fecundity and percentage of fertilization either between individuals or between two different points in time (ANOVA, $p \leq 0.05$).

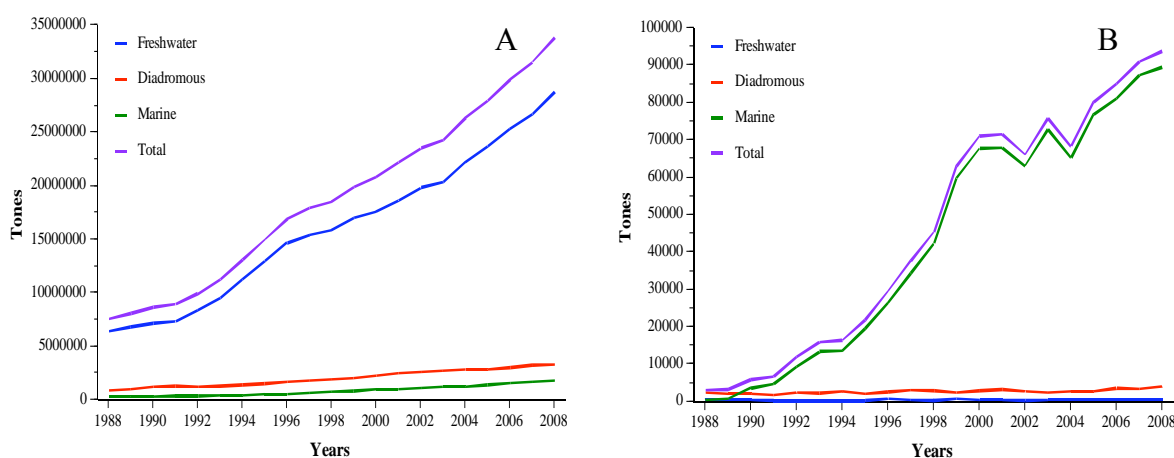
In conclusion, the meagre seems to reproduce successfully from April to June, whereas males produce sperm at the same months. Equally positive results were recorded after the trial of hormonal induction of reproduction both in May and June and the production of eggs was estimated at $40,768 \pm 36,911$ eggs kg^{-1} spawning⁻¹ with a percentage of fertilization at $92 \pm 8\%$ within 11 ± 5 spawnings. The reproduction of the meager was possible from April to June but only with hormonal manipulation producing high quality gametes.

1. Εισαγωγή

1.1 Περί ιχθυοκαλλιέργειας

Η ιχθυοκαλλιέργεια περιλαμβάνει την διαδικασία από την παραγωγή και λήψη γονιμοποιημένων αυγών μέχρι το στάδιο όπου τα ψάρια έχουν το επιθυμητό βάρος ώστε να διοχετευθούν στην αγορά. Η αρχή της διαδικασίας λοιπόν γίνεται στο τμήμα των γεννητόρων. Στο στάδιο αυτό ώριμα αναπαραγωγικά άτομα αναπαράγονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Τα αυγά που παράγονται τοποθετούνται σε κατάλληλες δεξαμενες προκειμένου να εκκολαφτούν και να παραχθούν τα νεαρά ιχθύδια. Τα ιχθύδια αυτά τρέφονται με ζωντανή τροφή που παράγεται στο τμήμα ζωντανής τροφής του ιχθυογενετικού σταθμού. Στη συνέχεια, η εκτροφή θα συνεχιστεί με βιομηχανοποιημένη τροφή και αφού τα ιχθύδια μεταφερθούν στους κλωβούς πάχυνσης θα παραμείνουν εκεί μέχρι την επίτευξη του επιθυμητού βάρους.

Η ιχθυοκαλλιέργεια συγκριτικά με τις υπόλοιπες κτηνοτροφικές ενασχολήσεις είναι σχετικά νέα μορφή εκτροφής ζωντανών οργανισμών. Αν εξαιρέσει κανείς την εκτροφή του κυπρίνου (*Cyprinus carpio*), μόλις από το 1970 και μετά έχει επέλθει ουσιαστική ανάπτυξη της βιομηχανίας της ιχθυοκαλλιέργειας και μάλιστα μόλις τα τελευταία χρόνια ο κλάδος έχει στραφεί στην εκτροφή ψαριών θαλασσινού νερού.



Εικόνα 1: Παραγωγή ψαριών θαλασσινού και γλυκού νερού, διάδρομων ψαριών και παγκοσμίως (A) και στην Ελλάδα (B) την τελευταία εικοσαετία (FAO, 2008)

Η παγκόσμια παραγωγή από τις ιχθυοκαλλιέργειες έχει φτάσει σήμερα στο υψηλότερο επίπεδο όλων των εποχών αποτελώντας το 30% της συνολικής παραγωγής ψαριών (ιχθυοκαλλιέργεια, αλιεία). Περισσότεροι από 30.000.000 τόνοι ψαριών παράγονται ετησίως ανά τον κόσμο (Εικόνα 1) με την Ελλάδα να παράγει περίπου 100.000 τόνους από αυτά (FAO 2008).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο παγκόσμιος ρυθμός αύξησης την τελευταία δεκαετία έχει ανέλθει στο 10% τη στιγμή που η βιομηχανική παραγωγή κρέατος αυξάνεται με ρυθμό της τάξης του 2,8%. Η συνεχιζόμενη μείωση των ιχθυοαποθεμάτων οδηγεί στην ολοένα και αυξανόμενη κατανάλωση ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας. Στις ΗΠΑ ήδη το 50% της κατανάλωσης φρέσκων και κατεψυγμένων θαλάσσιων προϊόντων προέρχεται από τις ιχθυοκαλλιέργειες και αρκετοί είναι αυτοί που εκτιμούν ότι το 2030 το μεγαλύτερο μέρος της κατανάλωσης ψαριών σε ολόκληρο τον κόσμο θα καλύπτεται από τις ιχθυοκαλλιέργειες.

1.2 Κρανιός (*Argyrosomus regius*)

Ο κρανιός (*Argyrosomus regius*), ανήκει στην ομοταξία Actinopterygi, διαίρεση Teleostei, τάξη Perciformes, οικογένεια Sciaenidae (Chao and Trewaras 1990). Η οικογένεια Sciaenidae περιλαμβάνει 70 γένη και 270 είδη ενώ το γένος *Argyrosomus* περιλαμβάνει 8 είδη (Quémener et al. 2002). Έχει σχήμα ατρακτοειδές και σχετικά μεγάλο κεφάλι αναλογικά με το σώμα του. Η πλευρική γραμμή του είναι αρκετά έντονη και καταλήγει στο ουραίο πτερύγιο, ενώ το δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο είναι πιο μακρύ από το πρώτο (FAO 2010). Ο κρανιός, μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 103 kg σε βάρος ενώ το συνολικό του μήκος έως τα 230 cm με συχνότερη τιμή τα 150 cm TL (Fishbase, 2009). Ο κρανιός είναι ψάρι βενθοπελαγικό (15-300 m βάθος) (FAO 2010) και συναντάται σε υποτροπικά κλίματα με εύρος 65°N - 6°S, 23°W - 36°E (Fishbase 2010). Συγκεκριμένα, εμφανίζεται κατά μήκος των ακτών του ανατολικού Ατλαντικού Ωκεανού, βόρεια του English channel και της Βόρειας Θάλασσας, και νότια της Νορβηγίας και της Σουηδίας. Ακόμη, συναντάται σε όλη τη Μεσόγειο Θάλασσα, στο δυτικό άκρο της Μαύρης Θάλασσας και της Θάλασσας του Μαρμαρά. Επίσης, εμφανίζεται στις λίμνες του Δέλτα του Νείλου και από τις Bitter Lakes έως τη διώρυγα του Σουέζ, στα νότια του Κονγκό και στις Κανάριες Νήσους (Whitehead et al. 1986).

Ο κρανιός αποτελεί ένα νέο είδος προς εκτροφή. Η ιδιαίτερα καλή ποιότητα κρέατος (Fasano et al. 2006) καθώς και η πολύ καλή ανάπτυξη που παρουσιάζει (Pastor

Garcia et al. 2002) το κατατάσσουν στην όγδοη θέση της λίστας των 27 υποψηφίων ειδών προς εκτροφή (Quemener 2002).

Σύμφωνα με το FAO η παγκόσμια παραγωγή του κρانيού ξεκίνησε μόλις το 1997 με παραγωγή 30 t αγγίζοντας το 2007 τους 750 t, παραγωγή σχετικά μικρή σε σχέση με άλλα είδη. Τα πρώτα χρόνια εμφάνισης του είδους στην αγορά η τιμή του κυμάνθηκε στα 2-4 € kg⁻¹. Με την καθιέρωση του στην αγορά η τιμή αυξήθηκε στα 4-5 € kg⁻¹ καταλήγοντας τα τελευταία χρόνια στα 6 € kg⁻¹. Αυξημένη ζήτηση παρουσιάζουν μεγάλα άτομα (1-3 kg) με τιμή 7-12 € kg⁻¹ (FAO 2010).

Στη φύση ο κρانيός τρέφεται αρχικά με μικρά βενθικά ψάρια καθώς και οστρακόδερμα (*Mysis relicta*, γαρίδες) αλλά καθώς το μέγεθος του αυξάνεται, τρέφεται με κεφαλόποδα και διάφορα πελαγικά ψάρια (FAO 2010). Σε μελέτες διατροφής που πραγματοποιήθηκαν στον κρانيό, χορηγήθηκαν φρέσκιες μικρές γαρίδες, σαρδέλες (*Sardina pilchardus*), τιλάπιες (*Tilapia zilli*), μικρά οστρακόδερμα άλλα και πελαγικά ψάρια (Cabral et al. 2001, Quero and Vayne 1987). Σε γενικές γραμμές, όπως και στα περισσότερα ψάρια, τα υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης στη τροφή (40-60%) έφεραν θετικά αποτελέσματα στην αύξηση του. Τα νεαρά άτομα που τράφηκαν με φρέσκες γαρίδες, σαρδέλες και τιλάπιες, παρουσίασαν καλά επίπεδα αύξησης (από 17,7 σε 1.014 g σε 13 μήνες) με δείκτη μετατρεψιμότητας 3:1 (EL-Shebly et al. 2007). Σε εκτροφή κρانيών με χορήγηση φυσικής και βιομηχανοποιημένης τροφής (40 και 50% πρωτεΐνη) που πραγματοποιήθηκε στην Αίγυπτο ο δείκτης μετατρεψιμότητας καταγράφηκε στο 9:1 με αρχικό βάρος ψαριών 1.250 g (Serif et al. 2009). Σε διαφορετική εκτροφή νεαρά άτομα κρانيού που τοποθετήθηκαν σε λίμνη της Αιγύπτου, μετά από εκτροφή 13 μηνών αύξησαν το βάρος τους περίπου κατά ένα κιλό. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι κάθε ιχθύδιο αύξανε το βάρος του κατά 2,55 g ημέρα⁻¹ (EL-Shebly et al. 2007) τη στιγμή που αντίστοιχες μελέτες σε τσιπούρα (*Sparus aurata*) έδειξαν πολύ μικρότερη αύξηση (0,73 g day⁻¹) (El-Shebly and Siliem 2003) όπως αντίστοιχα και στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (1,13 g ημέρα⁻¹) (El-Shebly 2005). Επίσης σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δεξαμενές στην ξηρά νεαρά άτομα κρانيού αύξησαν το βάρος τους κατά 0,5 g ημέρα⁻¹ λαμβάνοντας καθημερινά βιομηχανοποιημένη τροφή (Chatzifotis et al. 2010). Επίσης, φαίνεται ότι ο κρانيός έχει σαφώς καλύτερη αύξηση (1740 g σε 8 μήνες) αλλά και επιβίωση (100%) σε θαλάσσιους κλωβούς από ό,τι σε δεξαμενές στην ξηρά (Gracia et al. 2002).

1.3 Αναπαραγωγή στα ψάρια

1.3.1 Γαμετογένεση

Στα ψάρια, όπως και στα περισσότερα σπονδυλωτά, ο αναπαραγωγικός κύκλος είναι χωρισμένος σε δύο φάσεις. Η ωογένεση για τα θηλυκά και η σπερματογένεση για τα αρσενικά αποτελούν την φάση πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης των γαμετών. Σε δεύτερη φάση οι γαμέτες ωριμάζουν και καθίστανται έτοιμοι για απελευθέρωση μέσω της σπερμίας στα αρσενικά και της ωοτοκίας στα θηλυκά (Mylonas et al. 2010).

Στα θηλυκά ψάρια κατά τη διαδικασία της παραγωγής των ωοκυττάρων διακρίνονται έξι φάσεις ανάπτυξης: ωογένεση, πρωτογενή ωοκύτταρα, στάδιο φλοιϊκών κυστιδίων, λεκιθογένεση, ωρίμανση και ωοτοκία (Tyler and Sumpter 1996). Η έναρξη της παραγωγής των γαμετών γίνεται από το βλαστικό επιθήλιο της ωοθήκης όπου έπειτα από μιτωτικές διαιρέσεις παρατηρείται η εμφάνιση αρχικά μητρικών κυττάρων και στη συνέχεια ωογονίων και πρωτογενών ωοκυττάρων (Παπουτσόγλου 1998). Στην φάση των πρωτογενών ωοκυττάρων συντελείται το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης του RNA όπως επίσης και η σύνθεση του Balbiani body που αποτελεί το βασικό λόγο της αύξησής των ωοκυττάρων σε μέγεθος. Το Balbiani body αποτελεί ένα σύμπλοκο κυτταρικών οργανιδίων συμπεριλαμβανομένων μιτοχονδρίων, πολυκυστικών σωματιδίων και ενδοπλασματικών δικτύων (Guraya 1979). Παράλληλα πραγματοποιείται και η ανάπτυξη της λεκιθικής μεμβράνης περιμετρικά του ωοκυττάρου όπου μετά από διαφοροποίησή της θα αποτελέσει την ακτινωτή ζώνη (zona radiata). Η ακτινωτή ζώνη αποτελείται από 2-4 πρωτεΐνες που συντίθενται είτε στο ίδιο το ωοκύτταρο είτε από το συκώτι του ψαριού. Στο τέλος της φάσης αυτής, τα ωοκύτταρα μεταναστεύουν έξω από την περιοχή όπου αναπτύσσονταν μέχρι στιγμής (nest region) ενώ η ακτινωτή ζώνη γίνεται λεπτότερη προκειμένου να διευκολυνθεί η ανταλλαγή συστατικών από το αίμα προς την κυτταρική μεμβράνη (Tyler and Sumpter 1996).

Στη φάση των φλοιϊκών κυστιδίων (Cortical alveoli) σχηματίζονται κυτταροπλασματικές δομές που αποτελούνται από μεγάλο αριθμό γλυκοπρωτεϊνών και γίνονται για πρώτη φορά εμφανείς με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Patiño and Sullivan 2002, Selman and Wallace 1986). Οι δομές αυτές καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος και καθώς η φάση οδεύει προς το τέλος μεταφέρονται προς την περιφέρεια του ωοκυττάρου. Παράλληλα, σχηματίζονται και σταγόνες λιπιδίων που θα αναπτυχθούν τόσο ώστε να φτάσουν ένα σημαντικό ποσοστό του τελικού τους μεγέθους.

Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής το μέγεθος των ωοκυττάρων αυξάνει σε μεγάλο βαθμό, έως και 30 φορές αναλόγως το είδος (Tyler and Sumpter 1996).

Η ιδιαιτέρως σημαντική αύξηση σε μέγεθος (περίπου 95% του συνολικού) (Tyler et al. 1991) λόγω της λήψης πρωτεϊνών, κυρίως λεκιθογόνου αποτελεί το κυριότερο χαρακτηριστικό της λεκιθογένεσης (Mylonas et al. 2010). Οι πρωτεΐνες αυτές θα χρησιμοποιηθούν στην παροχή των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των εμβρύων-νυμφών μέχρι τη λήψη εξωγενούς τροφής. Η λεκιθογένεση ξεκινά με την παραγωγή λεκιθογόνου από το συκώτι αλλά και από το ίδιο το ωοκύτταρο. Στη συνέχεια απελευθερώνεται στο αίμα και γίνεται συλλογή του από το αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο (Tyler and Sumpter 1996). Μετά την λήψη του λεκιθογόνου γίνεται αποθήκευσή του σε λεκιθικά σφαιρίδια. Ταυτόχρονα, διακρίνεται και παρουσία λιπιδίων, υπό μορφή τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων και εστέρων (Lund et al. 2000). Στη φάση αυτή τα ωοκύτταρα παρουσιάζουν ανεπτυγμένο κυτταρόπλασμα, γεμάτο με λεκιθικά σφαιρίδια, στις περισσότερες περιπτώσεις σταγόνες λιπιδίων, κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα και ακτινωτή ζώνη (Babin et al. 2007, Mylonas and Zohar 2009). Στο τέλος της λεκιθογένεσης τα ωοκύτταρα είναι πλέον έτοιμα για την τελική γενετική ωρίμανση και περιέχουν μητρικό RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, βιταμίνες και ορμόνες που είναι απαραίτητα για την σωστή ανάπτυξη του ιχθυδίου (Lubzens et al. 2010).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και έπειτα από αύξηση των επιπέδων της ωχρινοποιητικής ορμόνης (luteinizing hormone, LH) προκαλείται έκκριση στεροειδών ορμονών από τις γονάδες (maturation-inducing steroids, MIH) (Suwa and Yamashita 2007). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης συνεχίζεται η διαδικασία της μείωσης καθώς και η μετακίνηση του πυρήνα στο κάτω μέρος της μικροπύλης. Παράλληλα, παρατηρείται συγκέντρωση των σταγόνων λιπιδίου δημιουργώντας συνήθως μία μεγαλύτερη σταγόνα (Mylonas et al. 1997c). Η μεμβράνη του πυρήνα διαλύεται, το πρώτο πολικό σωματίο απελευθερώνεται ενώ πραγματοποιείται και πρωτεόλυση της λεκίθου. Τέλος, μετά την ενυδάτωση το ωοθυλάκιο σπάει και το αυγό απελευθερώνεται στην ωοθηκική κοιλότητα (Mylonas and Zohar 2009).

Στα αρσενικά άτομα δύο φάσεις του αναπαραγωγικού κύκλου είναι η σπερματογένεση και η σπερμίαση. Η διαδικασία της σπερματογένεσης ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων, την παραγωγή σπερματοκυττάρων 1 με πολλαπλές μитωτικές διαιρέσεις, την παραγωγή των σπερματοκυττάρων 2 έπειτα από μείωση και τη

διαφοροποίησή τους σε σπερματίδες. Σε δεύτερη φάση κατά την σπερμιάση, οι σπερματίδες μετασχηματίζονται σε μαστιγοφόρα σπερματοζώαρια έτοιμα για απελευθέρωση (Schulz and Miura 2002). Αναλυτικότερα, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης κάθε σπερματογόνο υπόκειται σε μία σειρά από διαιρέσεις που διαφέρουν ανάλογα το είδος από πέντε έως 15. Όλα τα θυγατρικά κύτταρα είναι ενωμένα μέσα σε μια σπερματοκύστη και αναπτυσσόμενα ωριμάζουν από σπερματογόνια σε σπερματοκύτταρα 1, στη συνέχεια σε σπερματοκύτταρα 2 και τελικά σε μαστιγοφόρα σπερματοζώαρια. Τα κύτταρα Sertoli που περιβάλλουν τις σπερματοκύστες, διαρρηγνύονται απελευθερώνοντας τα σπερματοζώαρια στο σπερματικό σωλήνα (Mylonas and Zohar 2009, Schulz and Miura 2002, Schulz et al. 2010). Με την απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στον σπερματικό αγωγό ξεκινά η διαδικασία της ωρίμανσης όσο μεταφέρονται στους αγωγούς των όρχεων. Τη στιγμή αυτή τα σπερματοζώαρια αποκτούν την ικανότητα της κινητικότητας που θα χρησιμοποιηθεί για την γονιμοποίηση με την απελευθέρωσή τους στο νερό (Miura and Miura 2003). Παράλληλα, ξεκινά η διαδικασία για την παραγωγή σπερματικού υγρού με το οποίο τα σπερματοζώαρια μεταφέρονται και απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Το σπερματικό υγρό μαζί με τα σπερματοζώαρια αποτελούν το σπέρμα των ψαριών του οποίου η ποιότητα αποτιμάται μελετώντας την επί τις εκατό κινητικότητα, την επιβίωση, τη διάρκεια της κινητικότητας καθώς και την πυκνότητά του (Fauvel et al. 1999).

Η διαδικασία της αναπαραγωγής στα ψάρια ελέγχεται από τον άξονα εγκέφαλος-υπόφυση-γονάδες εκλύοντας μία σειρά από ορμόνες. Ο εγκέφαλος λαμβάνει τα ερεθίσματα από το περιβάλλον (θερμοκρασία, φωτοπερίοδος, κοινωνικοί παράγοντες) και από τον υποθάλαμο εκλύεται η γοναδοεκλυτίνη (gonadotropin realizing hormone, GnRH) η οποία δρώντας στην υπόφυση θα προκαλέσει την έκλυση των γοναδοτροπινών (follicle stimulating hormone-FSH, LH) (Peter and Yu 1997). Σε ορισμένα είδη ψαριών ανασταλτικό ρόλο της δράσης της GnRH στην υπόφυση παίζει η ντοπαμίνη (dopamine, DA) όπου υπό την επίδρασή της αναστέλλεται η έκλυση της FSH και της LH (Chang and Jobin 1994). Οι γοναδοτροφίνες με τη σειρά τους μεταφερόμενες με το αίμα θα δράσουν στις γονάδες προκαλώντας την σύνθεση των στεροειδών ορμονών (ανδρογόνα, οιστρογόνα). Στα αρσενικά άτομα κατά κύριο λόγο συναντώνται τα ανδρογόνα (T, 11-KT) αλλά σε ορισμένα είδη μετέχει και η E₂ (Miura and Miura 2003, Schulz et al. 2010). Πο συγκεντρώσεις των ανδρογόνων αυξάνονται κατά την σπερματογένεση και μειώνονται στη συνέχεια καταδεικνύοντας τη σημασία τους στην διαδικασία της σπερματογένεσης

(Schulz et al. 2010). Συγκεκριμένα φαίνεται ότι η 11-KT είναι η κύρια ορμόνη που ευθύνεται για την σπερματογένεση ενώ τα στεροειδή που ευθύνονται για την ωρίμανση (maturing inducing steroid, MIS) ρυθμίζουν την σπερμιάση (Miura and Miura 2003). Στα θηλυκά άτομα η E₂ ρυθμίζει την ανάπτυξη των ωοκυττάρων καθώς και την παραγωγή λεκιθιγόνου και άλλων πρωτεϊνών από το συκώτι (Lubzens et al. 2010) και στο τέλος της λεκιθογένεσης τα MIS είναι αυτά που ευθύνονται για την τελική ωρίμανση (Suwa and Yamashita 2007).

1.3.2 Αναπαραγωγή σε συνθήκες εκτροφής

Για την επίτευξη της αναπαραγωγής σε συνθήκες αιχμαλωσίας χρησιμοποιούνται κυρίως μεγάλες δεξαμενές τοποθετημένες στην ξηρά. Ανάλογα με το είδος που εκτρέφεται προσομοιώνονται οι κατάλληλες φυσικοχημικές παράμετροι που είναι απαραίτητες για την επίτευξη της αναπαραγωγής. Η θερμοκρασία είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την αναπαραγωγή καθώς όταν αποκλίνει από το εύρος των απαιτούμενων τιμών για το εκάστοτε είδος τότε επηρεάζει την αναπαραγωγική του ικανότητα (Mylonas et al. 2010). Η φωτοπερίοδος καθώς και η ένταση του φωτισμού επηρεάζουν τη διαδικασία της ωρίμανσης στα ψάρια. Με συγκεκριμένες κατασκευές κάθε δεξαμενή απομονώνεται από τον εξωτερικό φωτισμό, με την φωτοπερίοδο καθώς και την ένταση του φωτισμού να ρυθμίζεται τεχνητά στα επιθυμητά επίπεδα (Rocha et al. 2008). Εξίσου σημαντική μπορεί να είναι και η αλατότητα εφόσον το κάθε είδος ωοτοκεί σε διαφορετικές περιοχές στη φύση και κατά συνέπεια και σε διαφορετικές αλατότητες. Το μέγεθος της δεξαμενής, καθώς και η ιχθυοφόρτίσή της επηρεάζει άμεσα την αναπαραγωγή, με τις δεξαμενές μεγάλου όγκου και χαμηλής ιχθυοφόρτισης να ευνοούν την τελική ωρίμανση (Mylonas et al. 2010). Επίσης, η τοποθέτηση διαφόρων αντικειμένων μέσα στην δεξαμενή (φωλιές) επιτρέπει την προσομοίωση περιβάλλοντος για ψάρια που συνηθίζουν να γεννούν σε σπηλιές, βράχια κ.α. (Rocha et al. 2008). Η διαθεσιμότητα καθώς και η ποιότητα της παρεχόμενης τροφής επηρεάζουν σημαντικά όχι μόνο την ωρίμανση των ψαριών αλλά και στη συνέχεια την ποιότητα των παραγόμενων γαμετών (Izquierdo et al. 2001). Τέλος, ιδανική αναλογία αρσενικών και θηλυκών ατόμων (αναλογία φύλλου) αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επίτευξη την βέλτιστης αναπαραγωγικής επιτυχίας (Mylonas et al. 2010).

Παρά την προσπάθεια για την προσομοίωση των προαναφερθέντων στοιχείων ορισμένα είδη αποτυγχάνουν να αναπαραχθούν σε αιχμαλωσία. Τα θηλυκά άτομα σε

ορισμένες περιπτώσεις ολοκληρώνουν την ωογένεση και την ωρίμανση αλλά παρόλα αυτά αποτυγχάνουν να ωοτοκήσουν (Salmonids). Συχνότερα τα ψάρια ενώ ολοκληρώνουν τη διαδικασία την ωογένεσης δεν καταφέρνουν να ωριμάσουν και τότε τα ωοκύτταρα παραμένουν στην ωοθηκική κοιλότητα των θηλυκών ατόμων μέχρι να καταστραφούν με την διαδικασία της απόπτωσης (Babin et al. 2007, Mylonas and Zohar 2000). Η αιτία αυτής της δυσλειτουργίας οφείλεται στην μη απελευθέρωση της LH από την υπόφυση στο τέλος της λεκιθογένεσης με αποτέλεσμα να μην ολοκληρώνεται η διαδικασία της αναπαραγωγής (Mylonas et al. 2010).

Τα αρσενικά άτομα ολοκληρώνουν την σπερματογένεση αλλά και τη φάση της σπερμίας (Mylonas and Zohar 2000, Schulz and Miura 2002, Schulz et al. 2010). Παρόλα αυτά παρατηρείται συχνά πρόβλημα στην ποιότητα του σπέρματος και κυρίως στην ποσότητα του σπέρματος (Berlinsky et al. 1997). Σε διαφορετική περίπτωση τα ψάρια αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν και τη γαμετογένεση όπως συμβαίνει στο μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) (Micale et al. 1999) αλλά και το χέλι (*Anguilla sp.*) (Ohta et al. 1997).

1.3.3 Ορμονική πρόκληση γαμετοτοκίας

Η πρώτη επιτυχημένη πρόκληση της αναπαραγωγής με ορμονικές θεραπείες πραγματοποιήθηκε μόλις το 1930 στο *Cnesterodon decemmaculatus* (Houssay 1930). Μελετώντας τον ρόλο της στην ωοτοκία, παρατηρήθηκε απελευθέρωση αυγών χορηγώντας σε θηλυκό ψάρι ομογενοποιημένες υποφύσεις άλλου είδους. Αρκετά χρόνια αργότερα προκλήθηκε ωοτοκία με τη χρήση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (human Chorionic Gonadotropin, hCG) που είχε συλλεχτεί από τα ούρα εγκύων γυναικών (Lam 1982). Από τις γοναδοτροπίνες η hCG είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη λόγω της ευρείας διαθεσιμότητας, της υψηλής καθαρότητας και της αποδεδειγμένης θετικής δράσης της. Παρόλα αυτά, το υψηλό κόστος παρασκευής καθαρών γοναδοτροπινών και η μη επιτυχία σε επαναλαμβανόμενες θεραπείες αποτελούν σημαντικούς ανασταλτικούς παράγοντες για την χρησιμοποίησή τους (Mylonas and Zohar 2000). Έχει βρεθεί ότι εξαιτίας του μεγάλου μοριακού μεγέθους και της προέλευσης τους από άλλα είδη, τα ψάρια αναπτύσσουν ένα αμυντικό μηχανισμό στην επαναλαμβανόμενη χρήση γοναδοτροπινών. Έτσι, είτε αποτυγχάνεται η πρόκληση είτε γίνεται χρήση ολοένα και υψηλότερης δόσης (Peter and Yu 1997, Zohar and Mylonas 2001). Αργότερα η έρευνα οδήγησε στην χρησιμοποίηση γοναδοεκλυτίνης (GnRH) και των αγωνιστών της (GnRHa)

που προκαλούν την ενδογενή έκκριση των γοναδοτροπινών στα ψάρια (Zohar 1988). Η χρήση της GnRHa έναντι της GtH υπερτερεί λόγω του γεγονότος ότι είναι ένα μικρό δεκαπεπτίδιο και ότι έπειτα από επαναλαμβανόμενες θεραπείες δεν προκαλεί ανάπτυξη αμυντικού μηχανισμού στα ψάρια με αποτέλεσμα η αποτελεσματικότητα της να παραμένει σταθερή. Η GnRHa δρα σε υψηλότερο επίπεδο στον άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – Γονάδες και προκαλεί μία πιο «φυσική» υποβοήθηση της αναπαραγωγής. Τέλος, λόγω της τεχνητής σύνθεσής της δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος μόλυνσης ιχθύων από τη χρήση της όπως συμβαίνει από της εξαγωγές ορμονών από άλλα είδη (Zohar and Mylonas 2001). Η χρήση των αγωνιστών της GnRH μπορεί να γίνει είτε με χορήγηση της ορμόνης σε ενέσιμες μορφές είτε με χρήση εμφυτευμάτων (implants) (Crim and Bettles 1997, Donaldson 1996, Zohar and Mylonas 2001). Η σταδιακή απελευθέρωση της ορμόνης, η αύξηση έκκρισης LH (Nagahama 1994), καθώς και η μείωση του αριθμού των χειρισμών είναι μερικά από τα προτερήματα της χρήσης των εμφυτευμάτων έναντι των κλασικών ενέσεων χορήγησης της ορμόνης (Mylonas and Zohar 2001).

Ένα βασικότατο στοιχείο στην διαδικασία της αναπαραγωγής είναι και η ποιότητα των γαμετών. Η ποιότητα του σπέρματος είναι σημαντική καθώς επηρεάζει το ποσοστό γονιμοποίησης και κατά συνέπεια τον αριθμό των βιώσιμων αυγών κατά την αναπαραγωγική περίοδο (Mylonas et al. 2003a). Για την ποιοτική ανάλυση του σπέρματος, μελετάται η πυκνότητα, η κινητικότητα, καθώς και η επιβίωσή του (Bromage and Roberts 1995). Η κινητικότητα επηρεάζει το ποσοστό γονιμοποίησης των αυγών και είναι ο σημαντικότερος παράγοντας επιτυχίας της γονιμοποίησης. Χαμηλά επίπεδα κινητικότητας δεν επιτυγχάνουν γονιμοποίηση (Chauvaud et al. 1995). Το ποσοστό γονιμοποίησης αποτελεί δείκτη για την ποιότητα του σπέρματος όμως είναι ένας εξαρτημένος παράγοντας δεδομένου ότι σχετίζεται και με την ποιότητα των αυγών και έτσι δεν μπορούν να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα από την εκτίμησή του. Τέλος, η πυκνότητα του σπέρματος αποτελεί ακόμη ένα στοιχείο εκτίμησης των αρσενικών γαμετών. Είναι προφανές ότι πυκνότερο σπέρμα παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά γονιμοποίησης (Bromage and Roberts 1995).

Η ετήσια γονιμότητα (αριθμός παραγόμενων αυγών κατά την αναπαραγωγική περίοδο), και το ποσοστό γονιμοποίησης (αριθμός των γονιμοποιημένων αυγών σε σχέση με τον ολικό αριθμό) αποτελούν δείκτες της ποιότητας των αυγών. Παράλληλα, το σχήμα, η ύπαρξη χορίου, η διαφάνεια, ο αριθμός των σταγόνων λιπιδίων όπως επίσης και η πλευστότητα αποτελούν στοιχεία καλής ποιότητας αυγών (Bromage and Roberts 1995).

Εφόσον επιτευχθεί η αναπαραγωγή ένα στοιχείο καλής ποιότητας αυγών ορίζεται ως η ικανότητα ενός αυγού να παράξει μία βιώσιμη νύμφη (Brooks et al. 1997, Kjørsvik et al. 1990).

1.3.4 Αναπαραγωγή του κρανιού

Ο κρανιός είναι είδος γονοχωριστικό χωρίς να παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό. Η αναπαραγωγική ωριμότητα πραγματοποιείται σε ηλικία μεγαλύτερη των τεσσάρων χρόνων και σε βάρος μεγαλύτερο των 5 kg για τα αρσενικά και 6 kg για τα θηλυκά (FAO 2010). Σε θερμοκρασία 17-22°C ένα θηλυκό άτομο (1,2 m) παράγει περίπου 800.000 αυγά, σε 3-5 ωοτοκίες (FAO 2001). Η αναπαραγωγική περιόδός του ξεκινά τον Μάιο και τελειώνει τον Ιούλιο (Queiro and Vayne 1987) ενώ έχει καταγραφεί ωοτοκία και κατά τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάρτιο στα δυτικά παράλια της Αφρικής (Μαυριτανία) (Griffiths and Heemstra 1995).

Ένα ιδιαίτερο στοιχείο της οικογένειας Sciaenidae είναι η παραγωγή κρωγμών από τα αρσενικά άτομα κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (Fish and Mowbray 1970). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζει και ο κρανιός, με την διαφορά ότι και τα θηλυκά άτομα παράγουν ήχους κατά την ερωτοτροπία. Όμως, και άλλα είδη όπως τα *Nibea albiflora*, *Argyrosomus argentatus*, *Micropogon undulates*, *Pogonias cromis*, έχουν αυτή την ικανότητα. Η παραγωγή ήχων από ώριμους κρανιούς μελετήθηκε σε παράκτια περιοχή της Γαλλίας (Lagardère and Mariani 2006). Γνωρίζοντας την αναπαραγωγική περίοδο και την περιοχή απόθεσης γαμετών του είδους έγινε καταγραφή ήχων με υδρόφωνα και στη συνέχεια ανάλυσή τους σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ειδικοί ηχητικοί μύες που βρίσκονται σε κοντινή θέση με την νηκτική κύστη παράγουν τους κρωγμούς κατά την περίοδο της αναπαραγωγής. Οι μύες παρουσιάζονται ισχυρότεροι στα αρσενικά άτομα εν συγκρίσει με αυτούς των θηλυκών και βρίσκονται περιμετρικά των θωρακικών τοιχωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παράγονται δύο τύποι ήχων από τους κρανιούς κατά την αναπαραγωγική περίοδο, κρωγμοί μακράς διάρκειας (598 – 2.496 ms) και κρωγμοί σύντομης διάρκειας (4,5 – 11,7 ms). Τα αρσενικά άτομα παρουσίασαν υπερτροφία στους συγκεκριμένους μύες και για το λόγο αυτό πιστεύεται ότι είναι οι κύριοι παραγωγοί των κρωγμών (Lagardère and Mariani 2006).

Ακόμη ένα θετικό στοιχείο για την εκτροφή του κρανιού είναι ο γρήγορος εγκλιματισμός του στην αιχμαλωσία καθώς και η θετική αντίδρασή του σε ορμονικές προκλήσεις αναπαραγωγής (Duncan et al. 2008). Δώδεκα άτομα συλλέχτηκαν ανοιχτά της

Πορτογαλίας και στις 26 Οκτωβρίου τα ψάρια μεταφέρθηκαν στην Ισπανία. Έπειτα από 5 μήνες χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας. Τα δύο θηλυκά άτομα στα οποία χρησιμοποιήθηκε εμφύτευμα GnRHα απελευθέρωσαν 9.515.000 αυγά σε 9 ωοτοκίες. Τα δύο θηλυκά άτομα στα οποία έγινε χορήγηση της ορμόνης σε ενέσιμη μορφή απελευθέρωσαν 7.221.000 αυγά σε τρεις ωοτοκίες. Οι αρσενικοί κρانيοί απελευθέρωσαν σπέρμα με 90% κινητικότητα και διάρκεια κινητικότητας περισσότερο από 5 λεπτά (Duncan et al. 2008).

Το συγκεκριμένο είδος λοιπόν έχει προκαλέσει ενδιαφέρον σχετικά με την πιθανή εκτροφή του για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Παρόλα αυτά δυσλειτουργίες όσο αφορά την αναπαραγωγή του καθώς και οι ελλείψεις γνώσεις στις νυμφικές εκτροφές δυσκολεύουν προς το παρόν την εμπορική του εκτροφή.

1.4 Σκοπός

Όπως προαναφέρθηκε, ο κρانيός είναι ένα ψάρι που παρουσιάζει θετικά στοιχεία για την εκτροφή του. Η γρήγορη αύξηση σε σχέση με άλλα είδη, καθώς και τα θετικά χαρακτηριστικά ποιότητας της σάρκας του συνέβαλαν στην επιλογή του συγκεκριμένου είδους. Για την βιομηχανική παραγωγή του πρέπει αρχικά να επιτευχθεί η αναπαραγωγή του είδους σε συνθήκες εκτροφής. Δυστυχώς όμως μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατό κάτι τέτοιο και το ψάρι δεν αναπαράγεται αυθόρμητα σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Οι ορμονικές δυσλειτουργίες που αφορούν άλλα είδη και περιγράφηκαν παραπάνω φαίνεται να επηρεάζουν και τον κρانيό με αποτέλεσμα τα ωοκύτταρά του να μην ωριμάζουν, να καθίστανται ατρητικά και εν τέλει να μην απελευθερώνονται ποτέ.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου του κρانيού καθώς και η επίδραση της ορμονικής θεραπείας στην απελευθέρωση γαμετών με τη χρήση εμφυτευμάτων GnRHα στην γονιμότητα και την ποιότητα των γαμετών. Από την μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου έγινε προσπάθεια να γίνει γνωστή η περίοδος της αναπαραγωγής του είδους καθώς και θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται. Επίσης, η γνώση της ημερομηνίας έναρξης και λήξης της λεκιθογένεσης αλλά και τις περιόδου σπερμίας ήταν στους στόχους της παρούσας μελέτης. Ακόμη, έγινε προσπάθεια να γίνουν γνωστά τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών σε όλη τη διάρκεια μελέτης καθώς και η επίδραση τους στην γαμετογένεση. Από την προσπάθεια ελέγχου της αναπαραγωγής με χρήση εμφυτευμάτων GnRHα, στόχος ήταν η εκτίμηση της γονιμότητας αλλά και η ποιότητα των γαμετών προκειμένου να γίνει γνωστή η καταλληλότερη περίοδος για

ορμονική πρόκληση. Η μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου καθώς και η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας εμφυτευμάτων GnRHα στην επαγωγή της γαμετοτοκίας του κρανιού είχαν ως στόχο την ανάπτυξη ενός πρωτόκολλου για χρήση από ιχθυογεννητικούς σταθμούς που ενδιαφέρονται να συμπεριλάβουν το είδος αυτό στην παραγωγή τους.

2. Αναπαραγωγικός κύκλος του Κρανιού

2.1 Εισαγωγή

Ο κρانيός (*Argyrosomus regius*), ανήκει στην Οικογένεια Sciaenidae και είναι ψάρι βενθοπελαγικό (15-300 m βάθος) (FAO 2010) που συναντάται τόσο σε εκβολές ποταμών όσο και σε παράκτια νερά (Griffiths and Heemstra 1995). Παρουσιάζει μεγάλη κατανομή και συναντάται συνήθως σε υποτροπικά κλίματα (Fishbase 2009). Είναι είδος γονοχωριστικό χωρίς να παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό και η αναπαραγωγική του ωριμότητα επέρχεται σε ηλικία μεγαλύτερη των τεσσάρων χρόνων (FAO 2010). Κατά την αναπαραγωγική περίοδο (Απρίλιος-Ιούλιος) σε θερμοκρασία 17-22°C, ένα θηλυκό άτομο, μήκους σώματος 1,2 m παράγει περίπου 800.000 αυγά σε 3-5 ωοτοκίες καθώς το ψάρι αυτό είναι πολύ-εναποθέτης (FAO 2009). Χαρακτηριστικό του κρانيού είναι η παραγωγή κρωγμών κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Μάλιστα, οι αρσενικοί χρησιμοποιούν δύο τύπους κρωγμών ένα για το κάλεσμα των θηλυκών και ένα για την έναρξη της ερωτοτροπίας (Lagardère and Mariani 2006).

Ο κρانيός λόγω μεγάλου αυξητικού ρυθμού που παρουσιάζει (EL-Shebly et al. 2007) καθώς και της καλής ποιότητας σάρκας (Fasano et al. 2006) έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον του εμπορικού κόσμου. Επίσης ο γρήγορος εγκλιματισμός του στην αιχμαλωσία και η θετική του αντίδραση σε ορμονικές προκλήσεις αναπαραγωγής (Duncan et al. 2008). Δυστυχώς όμως αν και τα τελευταία χρόνια έχει γίνει προσπάθεια για τη μελέτη του είδους (Chatzifotis et al. 2010, Hernández et al. 2009, Roo et al. 2010, Serif et al. 2009) οι πληροφορίες σχετικά με την αναπαραγωγή αλλά και με την εκτροφή του είναι ελλιπείς. Αποτέλεσμα αυτού είναι η παραγωγή του κρانيού να παραμένει χαμηλή ακόμη και σήμερα (FAO 2010).

Στα ψάρια, όπως και στα περισσότερα σπονδυλωτά, ο αναπαραγωγικός κύκλος είναι χωρισμένος σε δύο μεγάλες φάσεις. Η ωογένεση για τα θηλυκά και η σπερματογένεση για τα αρσενικά αποτελούν την φάση ανάπτυξης των γαμετών. Σε δεύτερη φάση οι γαμέτες ωριμάζουν και καθίστανται έτοιμοι για απελευθέρωση (σπερμίαση για τα αρσενικά και τελική ωρίμανση για τα θηλυκά) (Mylonas and Zohar 2007, Mylonas et al. 2010). Η ετήσια ιστολογική παρακολούθηση των γονάδων θηλυκών και αρσενικών ψαριών είναι απαραίτητη για κάθε νέο είδος ψαριού που εισάγεται για την παραγωγή στην ιχθυοκαλλιέργεια, καθώς καθορίζει το χρονικό διάστημα της αναπαραγωγής του είδους, τη διάρκεια της και την ικανότητα του είδους να αναπαραχθεί κάτω από συνθήκες αιχμαλωσίας. Επίσης, σημαντικό είναι οι γαμέτες του κάθε είδους (αυγά και σπέρμα), όταν αυτοί παράγονται, είτε αυθόρμητα είτε με τη χρήση ορμονών, να

είναι καλής ποιότητας. Στα αρσενικά άτομα, η πυκνότητα, η κινητικότητα, καθώς και η επιβίωση του σπέρματος αποτελούν στοιχεία εκτίμησης της ποιότητας του (Bromage and Roberts 1995). Αντίστοιχα στα θηλυκά άτομα, η γονιμότητα (αριθμός παραγόμενων αυγών κατά την αναπαραγωγική περίοδο) και το ποσοστό γονιμοποίησης (αριθμός των γονιμοποιημένων αυγών σε σχέση με τον ολικό αριθμό) αποτελούν δείκτες ποιότητας των αυγών (Brooks et al. 1997). Η αναπαραγωγή στα ψάρια ελέγχεται από τον άξονα υποθάλαμος - υπόφυση - γονάδες (Mylonas et al. 2010). Ο εγκέφαλος λαμβάνει τα ερεθίσματα από το περιβάλλον και από τον υποθάλαμο εκλύεται γοναδοεκλυτίνη (gonadotropin realizing hormone, GnRH). Η GnRH δρώντας στην υπόφυση προκαλεί την έκλυση των γοναδοτροπινών, της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle stimulating hormone, FSH) και της ωχρινοποιητικής ορμόνης (luteinizing hormone, LH). Η δράση τους προκαλεί την έκλυση στεροειδών ορμονών από τις γονάδες όπου λειτουργώντας αναδραστικά θα ολοκληρώσουν την διαδικασία με την τελική ωρίμανση (Nagahama 1994).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου του κρανιού σε συνθήκες αιχμαλωσίας προκειμένου να γίνει γνωστός ο χρονισμός των διαφόρων σταδίων της γαμετογένεσης και η χρονική περίοδος ωοτοκίας και απελευθέρωσης του σπέρματος. Επίσης, η θερμοκρασία της περιόδου γαμετοτοκίας στο συγκεκριμένο είδος, όπως και η έναρξη και παύση της διαδικασίας της λεκιθογένεσης. Έτσι, ελέγχτηκε (1) ο αναπαραγωγικός κύκλος σε συνθήκες αιχμαλωσίας μέσα από ιστολογική μελέτη, (2) η ποιότητα σπέρματος αρσενικών ατόμων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου και (3) τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Διαχείριση γεννητόρων

Το ερευνητικό μέρος της παρούσας εργασίας διεξήχθη στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού κέντρου θαλασσιών ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) το 2009 και 2010. Χρησιμοποιήθηκαν 13 ψάρια (7 θηλυκά, 6 αρσενικά) αρχικού μέσου βάρους \pm τυπική απόκλιση 3.828 ± 647 g προερχόμενα από εκτροφή του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε του 2005. Τα ψάρια διατηρούνταν σε δεξαμενές όγκου 9.000 l, ημίκλειστου συστήματος, με ελεγχόμενη θερμοκρασία του νερού. Ακολουθήθηκε φυσική φωτοπερίοδος με φυσικά αλλά και τεχνητά μέσα. Η διατροφή των ψαριών καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών περιλάμβανε καθημερινά βιομηχανική τροφή, ενώ τρεις φορές την εβδομάδα διανεμόταν αποψυγμένο καλαμάρι. Καταμέτρηση της θερμοκρασίας ($^{\circ}\text{C}$) γινόταν μία φορά την εβδομάδα.

2.2.2 Μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 7 δειγματοληψίες σε διάστημα 8 μηνών. Από 17/11/2009 έως 15/3/2010 οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν κάθε δύο μήνες και στη συνέχεια (15/4/2010 – 16/7/2010) ανά μήνα. Κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας, το νερό ρυθμιζόταν σε ύψος 40 cm και τα ψάρια υποβάλλονταν σε μερική αναισθησία με γαρυφαλέλαιο ($0,015 \text{ ml l}^{-1}$) (Wagner et al. 2002). Στη συνέχεια, αφού μεταφερόταν σε δεξαμενή όγκου 400 l γινόταν η πλήρης αναισθητοποίηση τους.

Στα θηλυκά άτομα γινόταν προσπάθεια λήψης βιοψίας από τις ωοθήκες για την εκτίμηση της ανάπτυξης των ωοκυττάρων. Η λήψη της βιοψίας γινόταν με γυάλινο καθετήρα (Natelson tube, 1 mm εξωτερική διάμετρος) που ήταν συνδεδεμένος σε λάστιχο ίδιας διατομής. Το δείγμα εξετάζονταν νωπό σε οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να εκτιμηθεί το στάδιο ωρίμανσης και η διάμετρος των ωοκυττάρων. Παράλληλα, τμήμα του δείγματος αυτού εμβαπτιζόταν σε διάλυμα 4% φορμαλδεύδης και 1% γλουταραλδεύδης, για τη μονιμοποίηση του, προκειμένου να υποβληθεί σε ιστολογική εξέταση. Στη συνέχεια και μετά από διαδικασία αφυδάτωσης τα δείγματα τοποθετούνταν σε πλακίδια με υδροξυεθυλμεθακρυλική πολυμεριζόμενη ρητίνη (Technovit 7100, Heraeus Kulzer, Germany) και παρέμειναν έως ότου πολυμεριστεί. Οι τομές γινόταν σε μικροτόμο Leica RM 2245 (Germany) και είχαν πάχος 3 μm . Στη συνέχεια γινόταν χρώση με Polychrome I (0,325 g methylene blue, 0,05 g azure II, 25 ml glycerol, 250 ml αποσταγμένο νερό) και Polychrome II (0,5 g basic fuchsin, 250 ml αποσταγμένο νερό) με αραιώση 1:3,5 σε

αποσταγμένο νερό (Bennett et al. 1976). Τα δείγματα εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse 50i) και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Jenoptik progress C12 plus).

Στα αρσενικά άτομα με απαλή μάλαξη της κοιλιακής χώρας γινόταν έλεγχος για την παρουσία ή μη σπέρματος. Σε περίπτωση ύπαρξης σπέρματος, έπειτα από σχολαστικό καθαρισμό του γενετικού πόρου, το σπέρμα συλλέγονταν με πιπέτα και φυλάσσονταν σε πάγο. Στη συνέχεια με χρήση Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) γινόταν εκτίμηση των βασικών χαρακτηριστικών της ποιότητας του σπέρματος (παράρτημα).

Παράλληλα, σε όλες τις δειγματοληψίες και σε όλα τα ψάρια γινόταν λήψη αίματος για την εκτίμηση της ποσότητας των στεροειδών ορμονών. Το αίμα φυγοκεντρώταν στις 6000 στροφές ανά λεπτό (rounds per minute, r.p.m.) για 15 λεπτά και το υπερκείμενο πλάσμα συλλεγόταν και φυλασσόταν σε υπερκατάψυξη στους -80°C μέχρι την ανάλυσή του. Για την ποσοτικοποίηση της τεστοστερόνης (Testosterone, T), της οιστραδιόλης (Estradiol, E_2) και της 11-κετοτεστοστερόνης (11-Ketotestosterone, 11-KT) στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκε ενζυμική ανοσοανάλυση (enzyme-linked immunoassay, ELISA) σύμφωνα με τους (Rodríguez et al. 2000) ; (Nash et al. 2000) ; (Cuisset et al. 1994) με ορισμένες τροποποιήσεις, και με αντιδραστήρια από τη SpiBio (France). Για την εκχύλιση των στεροειδών ορμονών, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση 200 μl πλάσματος με 2 ml διαιθυλαιθέρα, έντονο vortex (Vibramax 110, Heidolph, Germany) για 3 λεπτά, πάγωμα των δειγμάτων για 10 λεπτά στους -80°C , μετάγγιση της οργανικής φάσης σε νέα δοχεία και παροχή αέριου αζώτου (Reacti-var III, Pierce, Germany) για την εξάτμιση του διαιθυλαιθέρα (Reacti-var III, Pierce, Germany). Στη συνέχεια γινόταν ανασύσταση του δείγματος σε 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος (reaction buffer).

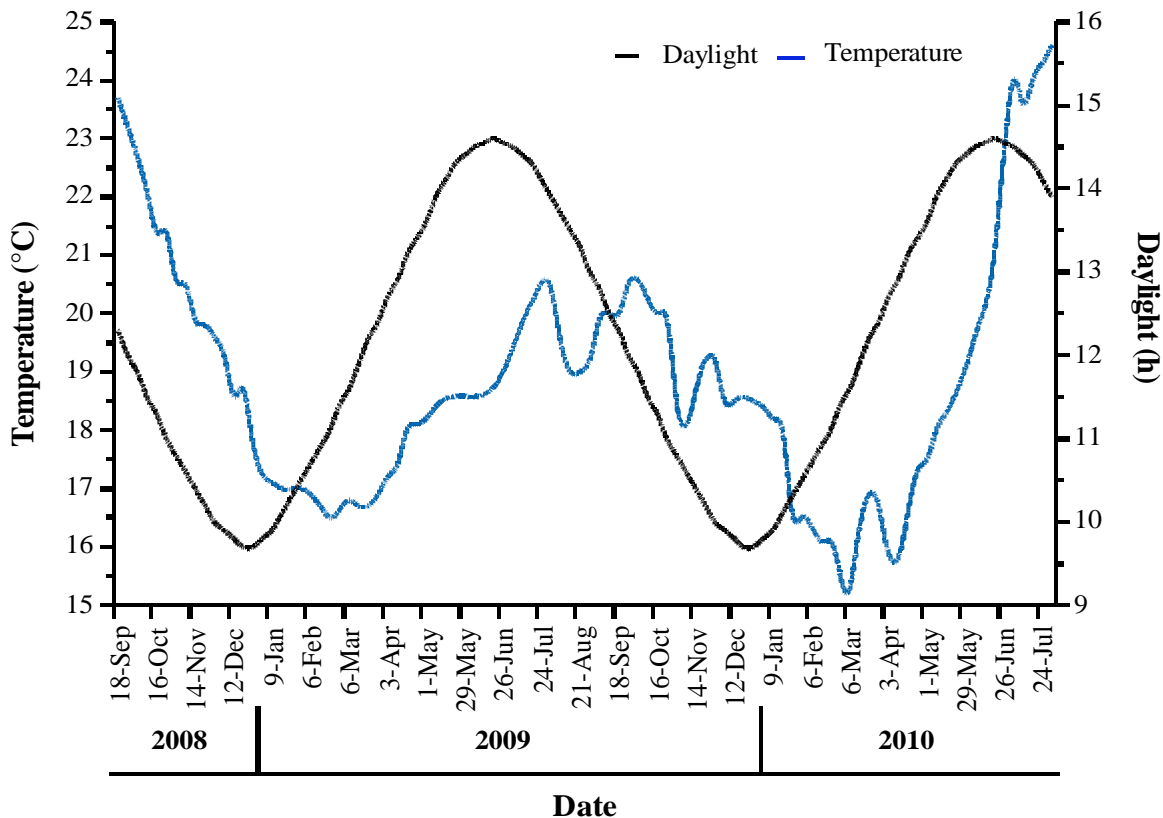
2.2.3 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα από όλες τις δειγματοληψίες αναλύθηκαν, ως προς τη διάμετρο των ωοκυττάρων, την πυκνότητα και τη κινητικότητα του σπέρματος αλλά και τις συγκεντρώσεις των ορμονών με ανάλυση διασποράς (ANOVA, $p \leq 0,05$) με το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM, USA). Τα γραφήματα έγιναν με το πρόγραμμα DeltaGraph V5 (Red Rock Software, Inc., USA).

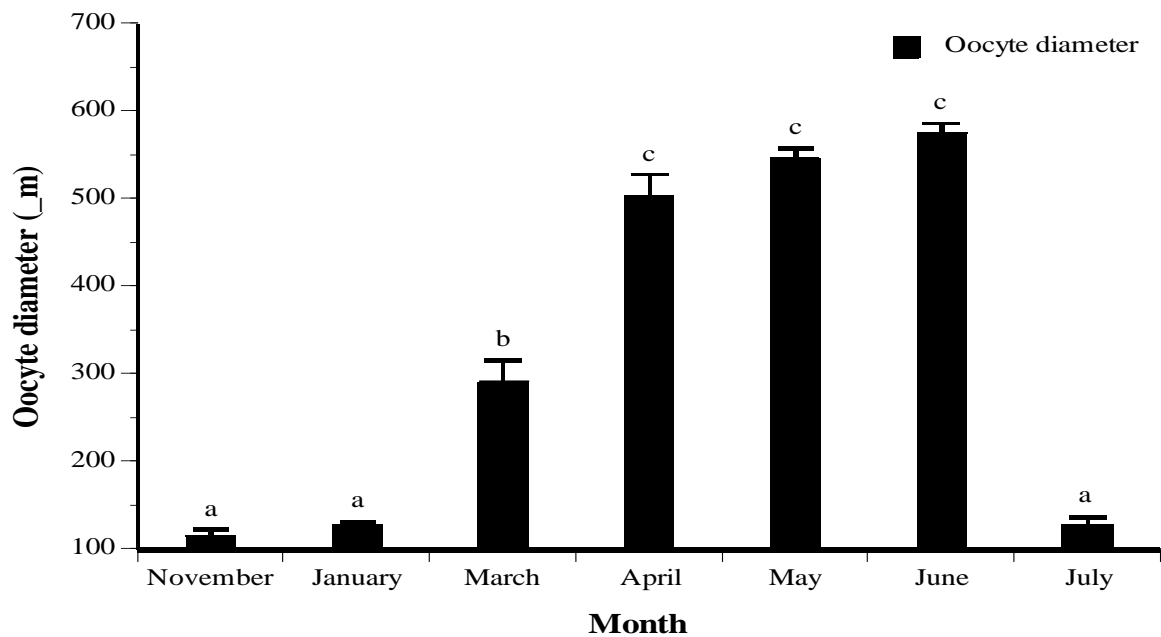
2.3 Αποτελέσματα

Η φωτοπερίοδος κυμάνθηκε από 9,8 έως 14,6 h (Εικόνα 2) και η μέση θερμοκρασία κυμάνθηκε από 15,3 έως και 24,6°C. Η υψηλότερη τιμή θερμοκρασίας καταγράφηκε στους 25,5°C και η χαμηλότερη τιμή θερμοκρασίας στους 15,1°C.

Η διάμετρος των ωοκυττάρων αυξήθηκε από 100 στα 600 μm στο διάστημα των 8 μηνών που διήρκησε η μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου του κρaniu (Εικόνα 3). Το Νοέμβριο και τον Ιανουάριο η διάμετρος εκτιμήθηκε στα $121\pm 13 \mu\text{m}$ ενώ το Μάρτιο και τον Απρίλιο τα ωοκύτταρα παρουσίασαν σημαντική αύξηση της διαμέτρου τους φτάνοντας τον Απρίλιο στα $504\pm 24 \mu\text{m}$. Τους επόμενους δύο μήνες καταγράφηκε μία μικρή σχετικά αύξηση και τον Ιούνιο η διάμετρος σημείωσε την υψηλότερη τιμή ($574\pm 11 \mu\text{m}$). Αντίθετα, κατακόρυφη πτώση σημειώθηκε το μήνα Ιούλιο καθώς καταγράφηκε διάμετρος παρόμοια με αυτή του Νοεμβρίου και του Ιανουαρίου ($128\pm 8,4 \mu\text{m}$).



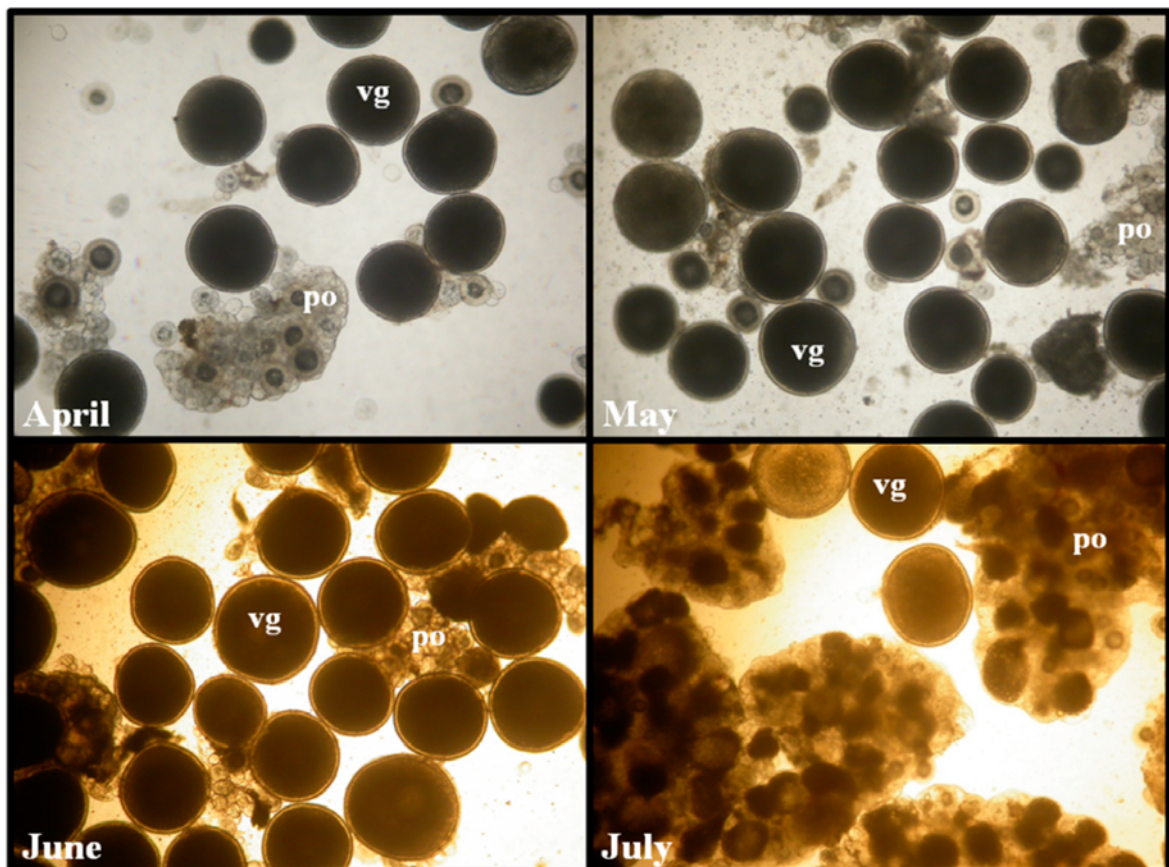
Εικόνα 2: Θερμοκρασιακό προφίλ και ώρες ηλιοφάνειας για την περίοδο διεξαγωγής των πειραμάτων ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας (2008-2010).



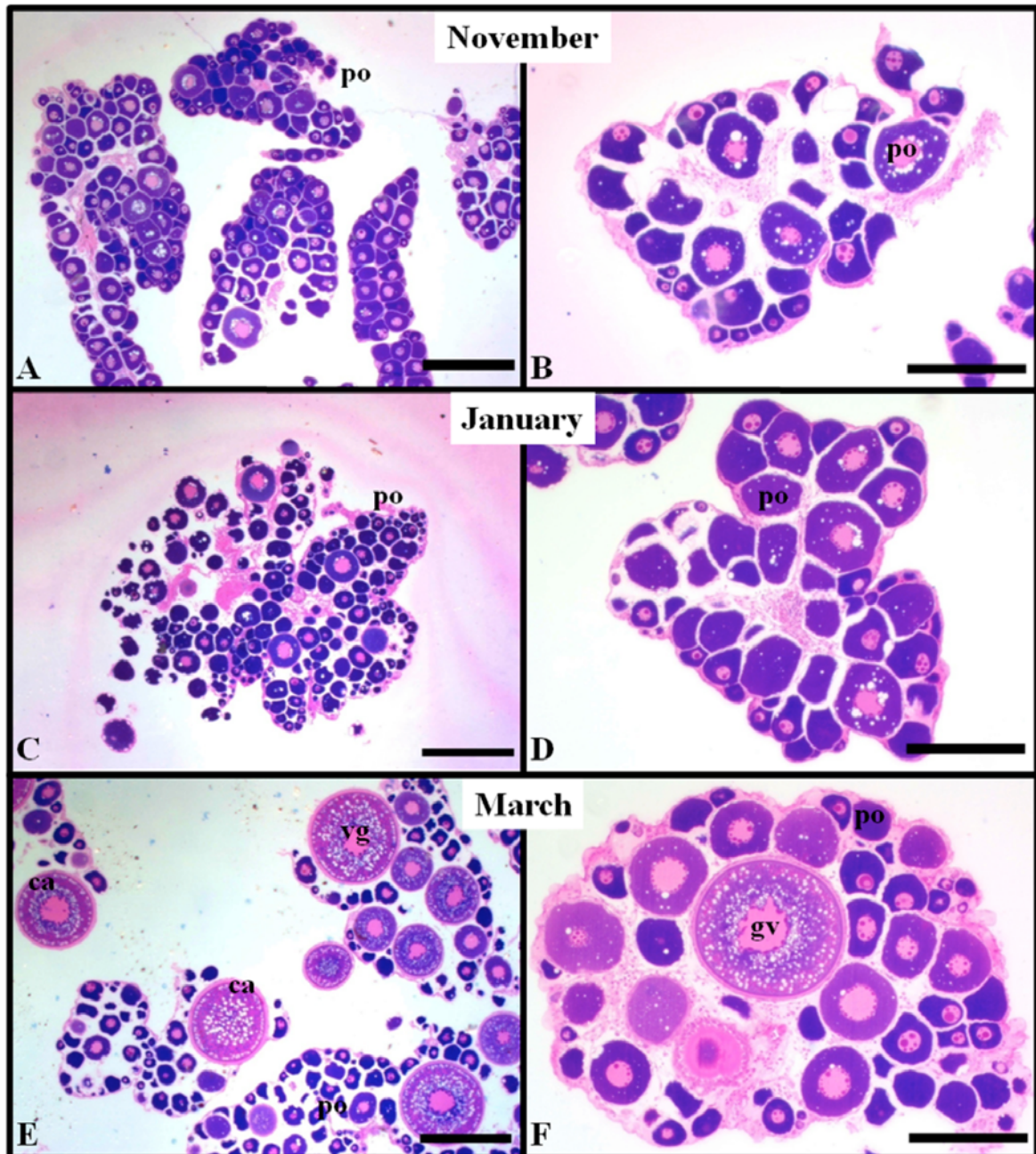
Εικόνα 3: Μέσος όρος και τυπικό σφάλμα της διαμέτρου των ωοκυττάρων (μm) κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου του κρανίου σε αιχμαλωσία το 2010. Διαφορετικοί λατινικοί χαρακτήρες αναφέρονται σε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δειγματοληψίες (ANOVA, $P \leq 0,05$).

Από την λήψη φωτογραφιών των βιοψιών καθώς και από την ιστολογική εξέταση των θηλυκών ατόμων προέκυψε ότι η διάμετρος των ωοκυττάρων αυξήθηκε όπως και ο αριθμός των λεκιθικών ωοκυττάρων κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών (Εικόνα 4,5,6). Τον μήνα Ιούλιο ο αριθμός των λεκιθικών ωοκυττάρων παρουσιάστηκε αισθητά μειωμένος και το μεγαλύτερο μέρος της ωοθήκης αποτελούνταν από πρωτογενή ωοκύτταρα. Ιστολογικά, στις δύο πρώτες δειγματοληψίες (Νοέμβριος – Ιανουάριος) παρατηρήθηκαν μόνο πρωτογενή ωοκύτταρα που η διάμετρός τους δεν ξεπερνούσε τα 130 ± 10 μm. Τα πρώτα λεκιθικά παρουσιάστηκαν τον μήνα Μάρτιο (Εικόνα 5) με την διάμετρό τους να ανέρχεται στα 290 ± 65 μm. Η αύξηση της διαμέτρου συνεχίστηκε, και στους επόμενους μήνες ο αριθμός των λεκιθικών ωοκυττάρων αυξήθηκε σημαντικά με τη μέγιστη τιμή το μήνα Ιούνιο (570 ± 30 μm) (Εικόνα 6). Τον επόμενο μήνα (Ιούλιος) το μεγαλύτερο μέρος των λεκιθικών ωοκυττάρων καταστήθηκαν ατηρητικά και η ωοθήκη αποτελείται στο μεγαλύτερο βαθμό από πρωτογενή ωοκύτταρα. Η διάμετρος των ωοκυττάρων τον Ιούλιο εκτιμήθηκε στα 130 ± 20 μm. Συνοψίζοντας, η ιστολογική εξέταση

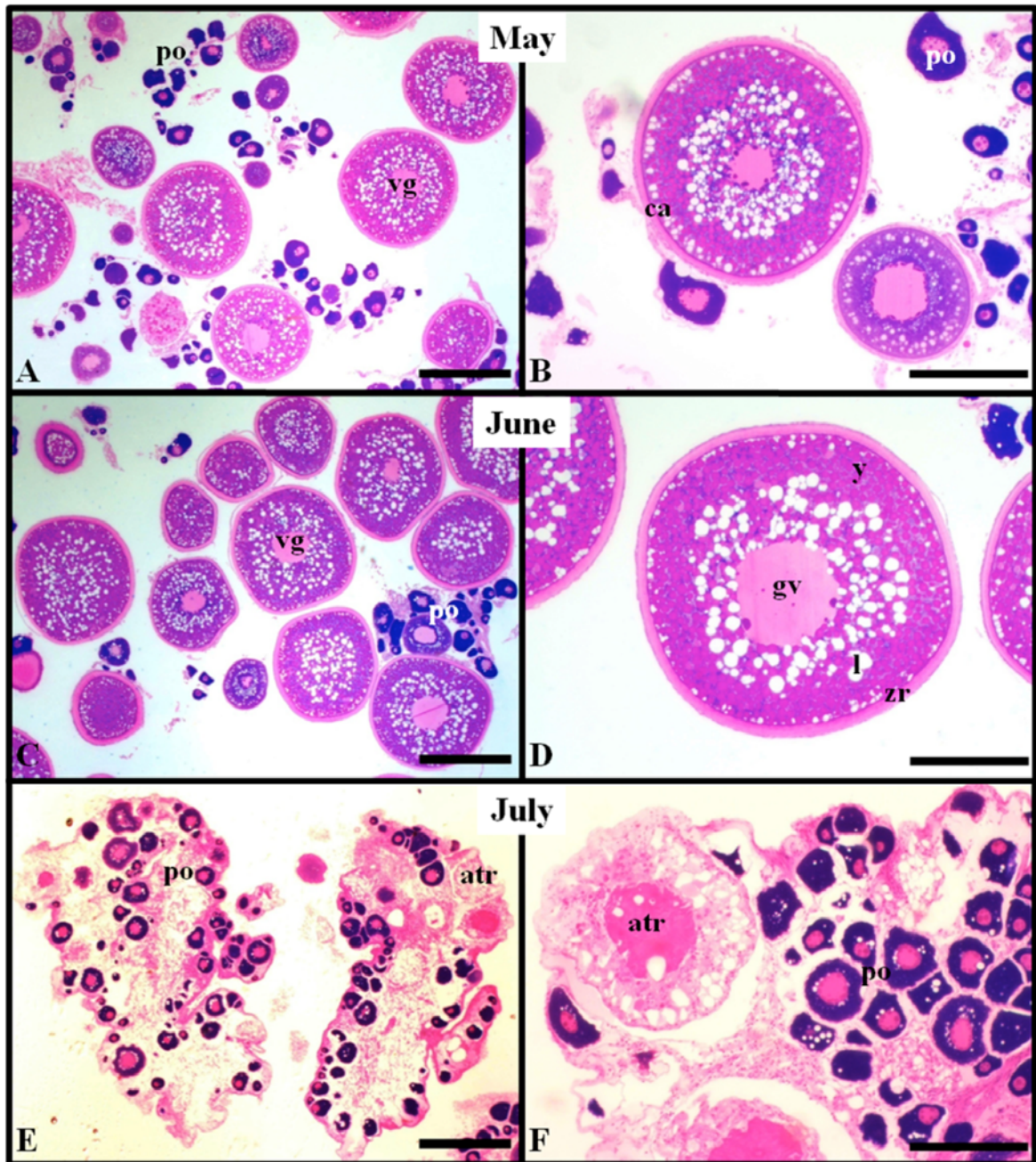
των ωοθηκών επιβεβαίωσε την συνύπαρξη πρωτογενών, λεκιθικών και ατρητικών ωοκυττάρων (Εικόνες 4,5,6.). Στα πρώτα στάδια της ωογένεσης παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου των ωοκυττάρων καθώς και δημιουργία σταγόνων λιπιδίων ενώ ο πυρήνας παρέμεινε κεντρικά τοποθετημένος. Στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της λεκιθογένεσης τα ωοκύτταρα αύξησαν τη διάμετρο τους και αποθήκευσαν λέκιθογονο από το αίμα με τη μορφή λεκιθικών σφαιριδίων. Στο τελευταίο στάδιο της λεκιθογένεσης ο πυρήνας παρέμεινε κεντρικά τοποθετημένος και το κυτταρόπλασμα ήταν γεμάτο με σταγόνες λιπιδίων και λεκιθικά σφαιρίδια. Στα λεκιθικά ωοκύτταρα εντοπίστηκε κεντρικά τοποθετημένος ο πυρήνας, ενώ περιμετρικά του πυρήνα βρέθηκαν διάσπαρτα τα λιπίδια, η λέκιθος και η ακτινωτή ζώνη (zona radiata).



Εικόνα 4: Φωτογραφίες από βιοψίες θηλυκών κρανίων κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2010. Οι εικόνες αναφέρονται σε βιοψίες που πάρθηκαν μηνιαία από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούλιο του 2010. Στις εικόνες φαίνονται ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vg) και ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (po). Η μπάρα αναπαριστά 500μm.

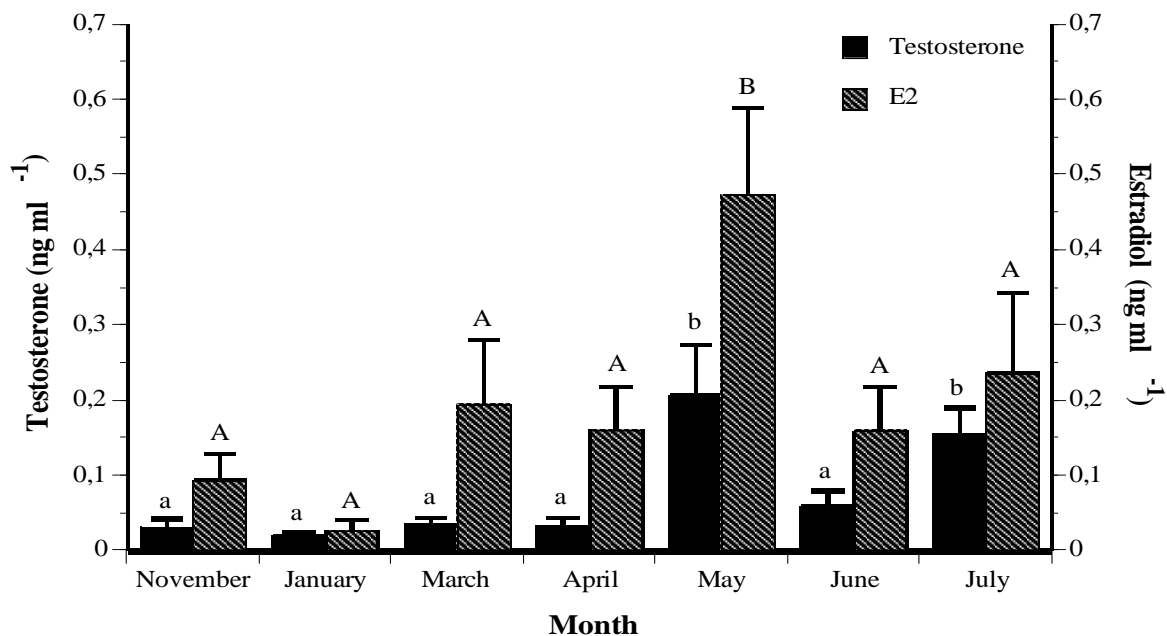


Εικόνα 5: Μικροφωτογραφίες από ιστολογικές τομές βιοψιών θηλυκών κρανίων κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2010. **A,B-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου το Νοέμβριο. Η ωθήκη αποτελείται μόνο από ανώριμα πρωτογενή ωκύτταρα (po). **C,D-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου τον Ιανουάριο. Η ωθήκη αποτελείται μόνο από ανώριμα πρωτογενή ωκύτταρα (po). **E,F-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου το Μάρτιο. Πρωτογενή ωκύτταρα (po), λεκιθικά ωκύτταρα (vg), πυρήνας ωκυττάρου (gv) και φλοϊκά κυστίδια (ca). Οι μπάρες στην αριστερή στήλη αναπαριστούν 400 μm και στην δεξιά στήλη 200 μm.



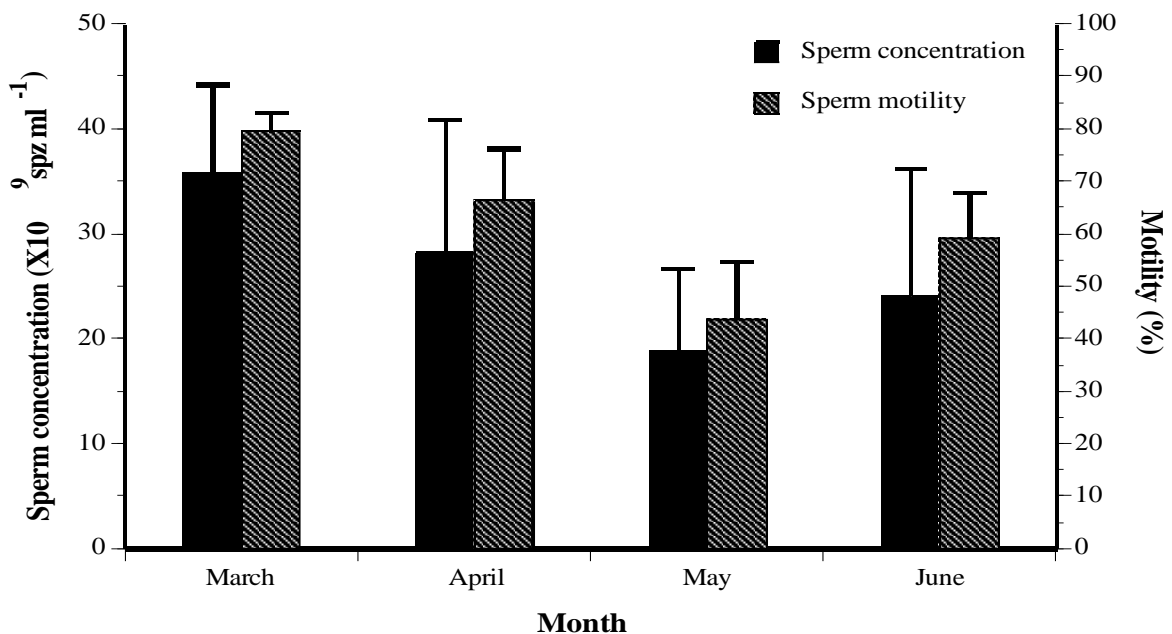
Εικόνα 6: Μικροφωτογραφίες από ιστολογικές τομές βιοψιών θηλυκών κρανίων κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2010. **A,B-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου το Μάιο. Πρωτογενή ωοκύτταρα (po), λεκιθικά ωοκύτταρα (vg) και φλοιϊκά κυστίδια (ca). **C,D-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου τον Ιούνιο. Πρωτογενή ωοκύτταρα (po), λεκιθικά ωοκύτταρα (vg), πυρήνας ωοκυττάρου (gv), σταγόνες λιπιδίου (l), ακτινωτή ζώνη (zr) και λέκιθος (y). **E,F-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου τον Ιούλιο. Πρωτογενή ωοκύτταρα (po) και ατρητικά ωοκύτταρα (atr). Οι μπάρες στην αριστερή στήλη αναπαριστούν 400 μm και στην δεξιά στήλη 200 μm.

Από τον Νοέμβριο ως και τον Απρίλιο οι συγκεντρώσεις των ορμονών στο πλάσμα του αίματος δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά στα θηλυκά άτομα (Εικόνα 7). Τον Μάιο παρουσιάστηκε ένα μέγιστο και για τις δύο ορμόνες ($T=0,21 \text{ ng ml}^{-1}$, $E_2=0,47 \text{ ng ml}^{-1}$). Στη συνέχεια η συγκέντρωση της E_2 επανέρχεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρόμοια με αυτά των προηγούμενων μηνών ενώ η T φαίνεται να παρουσιάζει ένα δεύτερο μέγιστο τον Ιούλιο ($T=0,16 \text{ ng ml}^{-1}$).

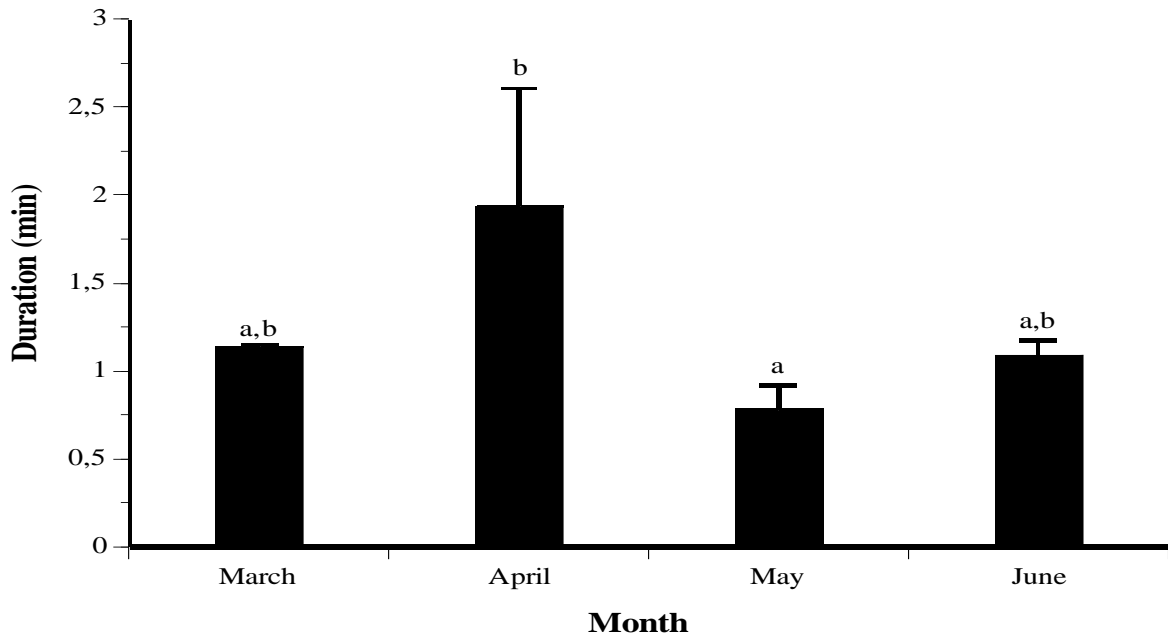


Εικόνα 7: Μέσος όρος και τυπικό σφάλμα των συγκεντρώσεων στεροειδών ορμονών, οιστραδιόλη και τεστοστερόνη (ng ml^{-1}) σε θηλυκά άτομα κраниού κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2010. Διαφορετικοί λατινικοί μικροί χαρακτήρες αναφέρονται σε στατιστικά σημαντικές διαφορές των επιπέδων της τεστοστερόνης ανάμεσα στους μήνες (ANOVA, $P \leq 0,05$), ενώ διαφορετικοί λατινικοί κεφαλαίοι χαρακτήρες αναφέρονται σε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της οιστραδιόλης ανάμεσα στους μήνες (ANOVA, $P \leq 0,05$).

Τα αρσενικά άτομα ήταν σπερμιάζοντα από τον Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο. Παρήγαγαν σπέρμα παρόμοιας πυκνότητας ($26,8 \pm 7 \times 10^9$ spz ml⁻¹) και κινητικότητας ($62 \pm 15\%$), με τις ελαφρώς υψηλότερες τιμές τον Μάρτιο και τις χαμηλότερες το Μάιο (Εικόνα 8). Η διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος ($1,2 \pm 0,5$ min) δεν διέφερε σημαντικά παρά μόνο τους μήνες Απρίλιο και Μάιο παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή τον Απρίλιο (Εικόνα 9).

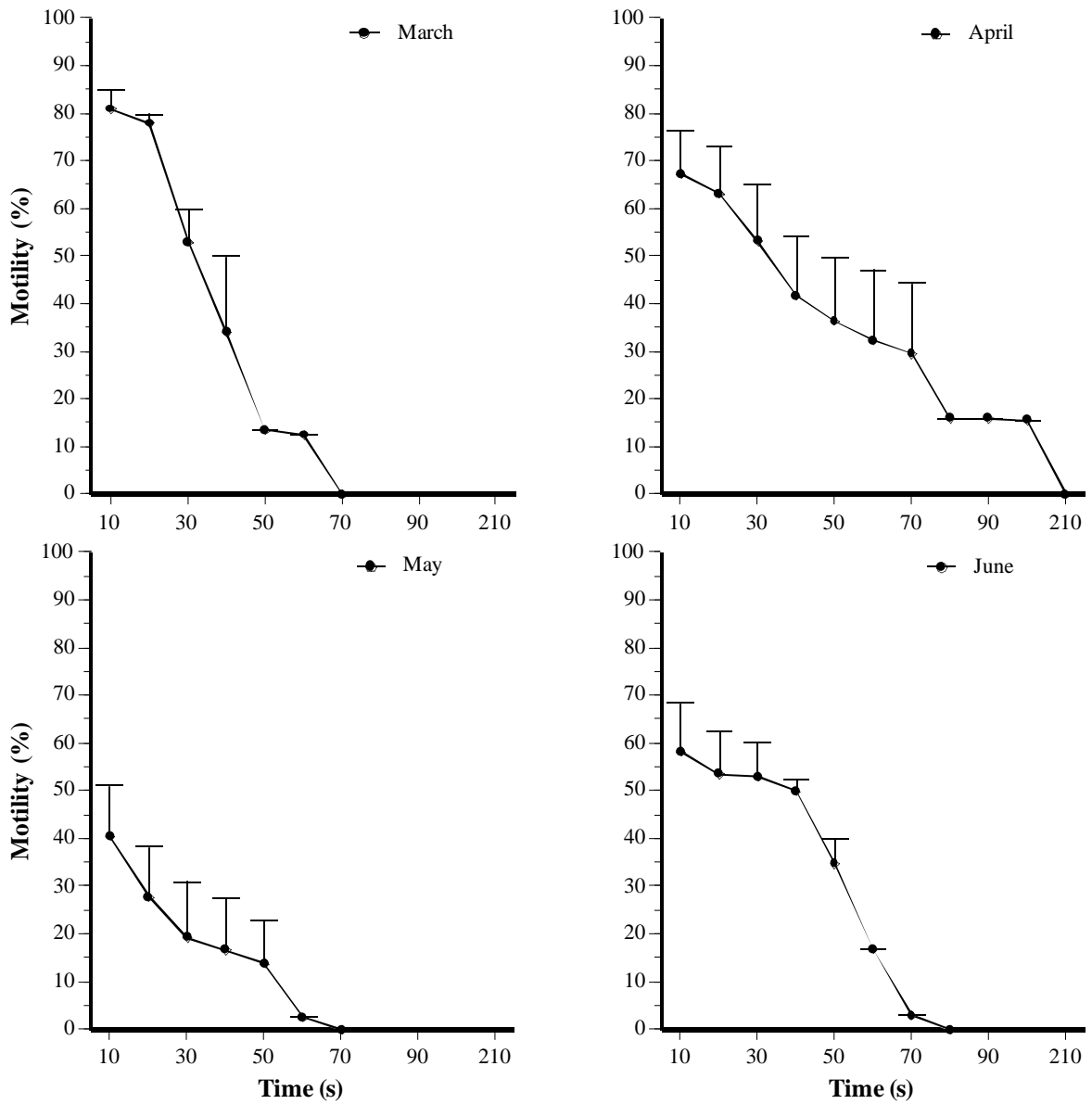


Εικόνα 8: Μέσος όρος και τυπικό σφάλμα της πυκνότητας (spz ml⁻¹) και της κινητικότητας (%) του σπέρματος κρانيού κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2010.



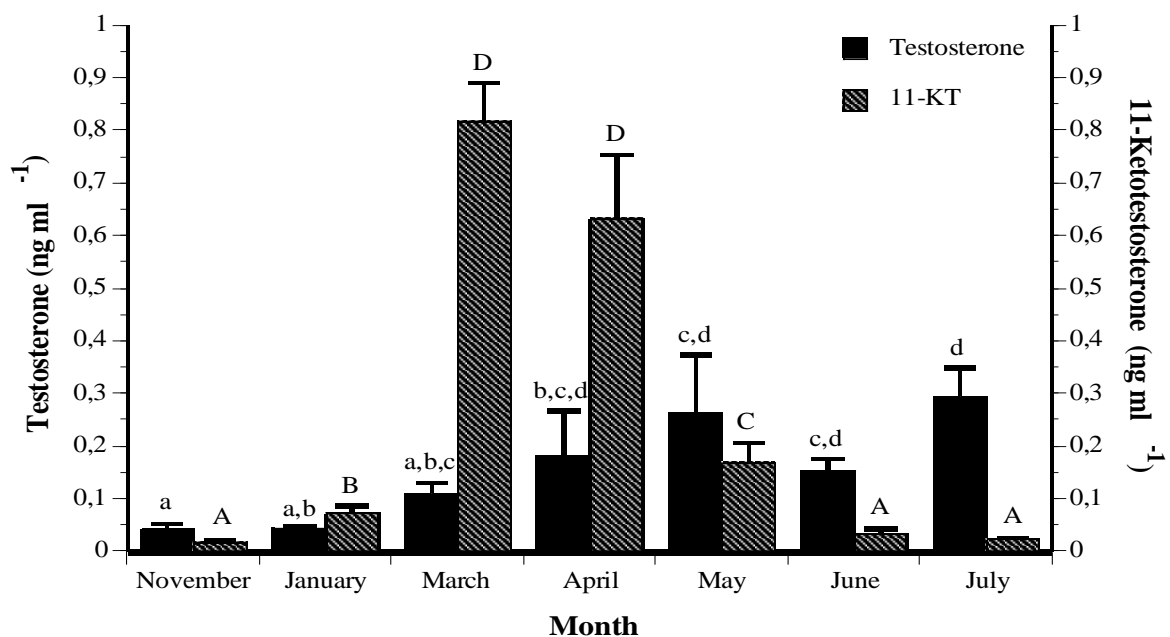
Εικόνα 9: Μέσος όρος και τυπικό σφάλμα της διάρκειας της κινητικότητας (sec) σπέρματος κρانيού κατά αναπαραγωγική περίοδο το 2010. Διαφορετικοί λατινικοί χαρακτήρες αναφέρονται σε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δειγματοληψίες (ANOVA, $P \leq 0,05$).

Από την μελέτη της μείωσης της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων με το χρόνο η υψηλότερη τιμή καταγράφηκε στην πρώτη μέτρηση, δηλαδή 10 s μετά την ενεργοποίησή του (Εικόνα 10). Στη συνέχεια, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που κινούνταν μειωνόταν μέχρι την τελική ακινητοποίησή τους. Τους μήνες Μάρτιο, Μάιο, Ιούνιο στα πρώτα 30 s παρέμενε σε κίνηση τουλάχιστον το 50% των σπερματοζωαρίων ενώ σε μία μόνο περίπτωση (Απρίλιος) παρέμεινε ζωντανό το 10% του σπέρματος για 190 s.



Εικόνα 10: Μέσος όρος και τυπικό σφάλμα της μείωσης του αριθμού σπερματοζωαρίων που βρίσκονται σε κίνηση σε συνάρτηση με το χρόνο, για δείγματα που πάρθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της αναπαραγωγικής περιόδου. Κάθε σημείο αναφέρεται στο μέσο όρο της κινητικότητας για την συγκεκριμένη ημερομηνία.

Από την εκτίμηση του επιπέδου των στεροειδών ορμονών (ng ml^{-1}) στα αρσενικά άτομα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή και τον δύο ορμονών με το χρόνο (Εικόνα 11). Για την 11-KT η υψηλότερη τιμή σημειώθηκε τον Μάρτιο ($0,82 \text{ ng ml}^{-1}$) ενώ για την τεστοστερόνη τον Ιούλιο ($0,3 \text{ ng ml}^{-1}$). Οι χαμηλότερες τιμές σημειώθηκαν τον Νοέμβριο και για τις δύο ορμόνες ($T= 0,04 \text{ ng ml}^{-1}$, $11\text{-KT}= 0,02 \text{ ng ml}^{-1}$).



Εικόνα 11: Μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα της συγκέντρωσης των στεροειδών ορμονών (ng ml^{-1}) στα αρσενικά άτομα κраниού κατά την αναπαραγωγική περίοδο 2010. Διαφορετικοί λατινικοί μικροί χαρακτήρες αναφέρονται σε στατιστικά σημαντικές διαφορές των επιπέδων της τεστοστερόνης ανάμεσα στους μήνες (ANOVA, $P \leq 0,05$), ενώ διαφορετικοί λατινικοί κεφαλαίοι χαρακτήρες αναφέρονται σε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της 11-KT ανάμεσα στους μήνες (ANOVA, $P \leq 0,05$).

2.4 Συζήτηση

Οι θηλυκοί κρανιοί φαίνεται να ήταν σε περίοδο ωοτοκίας από τον Μάιο έως τον Ιούνιο σε θερμοκρασία 17-24°C, όπως συμβαίνει και στη φύση που οι ωοτοκίες πραγματοποιούνται από τον Ιούνιο έως τα μέσα Ιουλίου (Lagardère and Mariani 2006). Από την ιστολογική εξέταση των ωοθηκών προέκυψε μία απότομη αύξηση της διαμέτρου των ωοκυττάρων τον Μάρτιο και τον Απρίλιο ενώ τους επόμενους μήνες παρουσιάστηκε μία συγκριτικά μικρότερη αύξηση. Επομένως, η λεκιθογένεση φαίνεται να ξεκίνησε τον Μάρτιο και τον Ιούνιο εμφανίστηκε η μεγαλύτερη ανάπτυξη, όπως φαίνεται από τις μικροφωτογραφίες. Η διάμετρος των μεγαλύτερων ωοκυττάρων τον Ιούνιο ήταν 570±30 μm, τη στιγμή που στο συγγενικό μυλοκόπι είναι 500 – 550 μm (Mylonas et al. 2004b) και στο mulloway (*Argyrosomus hololepidotus*) 500±40 μm (Battaglione and Talbot 1994). Σε παρόμοιο χρονικό διάστημα (Δεκέμβριος – Μάρτιος) φαίνεται να ολοκληρώνει την λεκιθογένεση το φαγκρί (*Pagrus pagrus*) (Kokokiris et al. 2001) αλλά και η συναγρίδα (*Dentex dentex*) (Pavlidis et al. 2000) που ξεκινά τη λεκιθογένεση τον Φεβρουάριο και τον Απρίλιο – Μάιο σημειώνονται οι μέγιστες τιμές. Το *Microponias furnieri* φαίνεται να ξεκινά την λεκιθογένεση το καλοκαίρι (Ιούλιος – Σεπτέμβριος) (Berois et al. 2004) ενώ το μυτάκι (*Diplodus puntazo*) τον Αύγουστο – Σεπτέμβρη (Micale et al. 1996) για να ωοτοκήσει ένα με δύο μήνες αργότερα. Το άσπρο λαυράκι (*Morone chrysops*) ξεκινά την λεκιθογένεση τον Οκτώβριο για να φτάσει να αναπαραχθεί 5 μήνες μετά (Μάρτιος) (Berlinsky et al. 1995) ενώ στο μυλοκόπι (*Umbrina cirrosa*) η λεκιθογένεση πραγματοποιείται ραγδαία, σε μικρό χρονικό διάστημα (Mylonas et al. 2004b). Στο σαργό (*Diplodus sargus*) η λεκιθογένεση φαίνεται να κρατάει περίπου 3-4 μήνες (Ιανουάριος – Απρίλιος) (Micale et al. 1987) ενώ στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) ξεκινώντας τον Σεπτέμβρη – Οκτώβρη διαρκεί για περίπου δύο μήνες (Kadmon et al. 1985). Φαίνεται λοιπόν ότι εκτός από τον χρόνο έναρξης της λεκιθογένεσης διαφέρει και η χρονική διάρκεια ολοκλήρωσής της. Γενικότερα πιστεύεται ότι η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στην διαφορά θερμοκρασίας την χρονική περίοδο της λεκιθογένεσης έχοντας μεγαλύτερη διάρκεια λεκιθογένεσης στις χαμηλές θερμοκρασίες. Στην προκειμένη περίπτωση ο κρανιός φαίνεται να ξεκίνησε την λεκιθογένεση όταν η θερμοκρασία του νερού άρχισε να αυξάνεται (16°C) φτάνοντας τη μέγιστη τιμή λεκίθου στα ωοκύτταρα τον Ιούνιο που η θερμοκρασία ήταν στους 23°C όπως φαίνεται από τις μικροφωτογραφίες.

Ο κρανιός είναι ψάρι με πολλαπλές ωοτοκίες και όπως ήταν αναμενόμενο, επιβεβαιώθηκε η συνύπαρξη τόσο πρωτογενών ωοκυττάρων, ωοκυττάρων σε φάση

φλοϊκών κυστιδίων αλλά και λεκιθικών, πράγμα που επιβεβαιώνει ότι το κάθε θηλυκό ωτοκεί περισσότερες από μία φορές σε κάθε αναπαραγωγική περίοδο. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν τα συγγενικά spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) και orangemouth corvina (*Cynoscion xanthurus*) (Brown-Peterson et al. 1988, Thomas et al. 1994), αλλά και άλλα ψάρια όπως η τσιπούρα (Kadmon et al. 1985), το λαβράκι (Prat et al. 1990) και η συναγρίδα (Pavlidis et al. 2000).

Στα θηλυκά άτομα οι συγκεντρώσεις των στεροειδών ορμονών (E_2 , T) παρουσίασαν εποχικότητα κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου και γενικά ήταν ελαφρώς μειωμένα συγκριτικά με άλλα θαλασσινά είδη όπως η τσιπούρα (Carragher and Pankhurst 1993), η συναγρίδα (Pavlidis et al. 2000) και το φαγκρί (Carragher and Pankhurst 1993). Τους πρώτους μήνες της ωογένεσης τα επίπεδα και των δύο ορμονών παρέμεναν χαμηλά με την πρώτη απότομη αύξηση στη συγκέντρωση της E_2 να συμβαίνει τον Μάρτιο, συμπίπτοντας με σημαντική αύξηση στην διάμετρο των ωοκυττάρων. Η συγκέντρωση της E_2 παρέμειναν υψηλά σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου γεγονός που συνέβη και στο φαγκρί (Kokokiris et al. 2000). Η απότομη αυτή αύξηση συνδέεται επίσης με την εμφάνιση των λεκιθικών κυστιδίων στην ιστολογική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε. Το γεγονός αυτό έχει αναφερθεί και σε προγενέστερες μελέτες στο φαγκρί (Kokokiris et al. 2000) στο γωβιό (*Gobio gobio*) (Rinchar et al. 1993) αλλά και το γραμμωτό λαβράκι (*Morone saxatilis*) (Berlinsky and Specker 1991, Mylonas et al. 1997a). Αξίζει να σημειωθεί ότι μία δεύτερη αύξηση της τιμής της E_2 πραγματοποιείται τον Ιούλιο επισημαίνοντας το τέλος της λεκιθογένεσης (Jackson and Sullivan 1995). Όπως συμβαίνει και σε άλλα ψάρια με πολλαπλές ωοτοκίες, οι υψηλές συγκεντρώσεις E_2 που σημειώνονται κατά την αναπαραγωγική περίοδο συμβάλουν στις επαναλαμβανόμενες ωοτοκίες συνεχίζοντας τη λεκιθογένεση στα ωοκύτταρα που βρίσκονται σε πιο αρχικά στάδια (Prat et al. 1990).

Η δημιουργία των σταγόνων λιπιδίων έχει αποδοθεί στην αύξηση του επιπέδου της T σε αρκετούς τελεόστεους (Kobayashi et al. 1987) αλλά στην παρούσα μελέτη δεν φαίνεται να συμβαίνει αυτό. Επίσης, το ερέθισμα για την έκλυση της FSH προκειμένου να ξεκινήσει η λεκιθογένεση έχει αποδοθεί στην T (Crim and Evans 1979). Οι συγκεντρώσεις της T παρέμεναν, συγκριτικά με άλλα ψάρια, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με μέσο μέγιστο $0,21 \pm 0,18 \text{ ng ml}^{-1}$ τον μήνα Μάιο. Οι χαμηλές τιμές στις συγκεντρώσεις της T δεν είναι ασυνήθιστες στα θαλασσινά θηλυκά ψάρια (Pankhurst and Carragher 1991) αλλά παρόλα αυτά στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν μετρήσεις ακόμα χαμηλότερες. Συγκεκριμένα,

η συγκέντρωση της T ήταν χαμηλότερα και από το φαγκρί (Kokokiris et al. 2000) και από τη συναγρίδα (Pavlidis et al. 2000) αλλά και από το λαβράκι (Prat et al. 1990). Σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου η E₂ παρέμεινε υψηλά όπως άλλωστε και σε άλλα ψάρια (Berlinsky et al. 1995). Παράλληλα, παρατηρείται μία θετική συσχέτιση της T με την E₂ καθώς σε όλους τους μήνες η αύξηση ή η μείωση της μίας ορμόνης συνοδεύεται από αντίστοιχη μεταβολή της άλλης. Παρομοίως, και στο λαβράκι (Prat et al. 1990) αλλά και στο φαγκρί (Kokokiris et al. 2000) παρατηρείται συσχέτιση των δύο ορμονών συμφωνώντας με την παρούσα μελέτη.

Η διάρκεια σπερμίας στα αρσενικά άτομα κράτησε τέσσερις μήνες (Μάρτιος – Ιούνιος). Τα αρσενικά άτομα ξεκίνησαν τη διαδικασία της σπερμίας δύο μήνες πριν από την ωτοκία των θηλυκών, όπως άλλωστε συμβαίνει και σε άλλα θαλασσινά είδη όπως το λαβράκι (Carrillo et al. 1995) και το φαγκρί (Kokokiris et al. 2001, Mylonas et al. 2003a), και συνέχισαν και τους μήνες ωτοκίας των θηλυκών ατόμων. Η διάρκεια σπερμίας ήταν ίδια με το λαβράκι (4 μήνες) και παρόμοια με το καλκάνι (*Scophthalmus mrutimus*) (6 μήνες), τον ιπόγλωσσο (*Hippoglossus hippoglossus*) (6 μήνες) και το *Limanda limandu* (3 μήνες) (Suquet et al. 1994). Η πυκνότητα του σπέρματος κυμάνθηκε από 8 έως 45×10^9 szoa ml⁻¹ με το πλήθος των ψαριών που ήταν σπερμιάζοντα να μεταβάλλεται κάθε μήνα. Συγκεκριμένα τον μήνα Απρίλιο μόλις δύο αρσενικά ήταν σπερμιάζοντα ενώ τον Μάιο και τον Ιούνιο όλα τα ψάρια (έξι) ήταν ικανά να παράξουν σπέρμα. Η πυκνότητα παρουσίασε παρόμοιες τιμές με άλλα θαλασσινά ψάρια όπως το μυλοκόπι ($12-26 \times 10^9$ szoa ml⁻¹) (Mylonas et al. 2004b), το rabbitfish (*Siganus guttatus*) ($5-20 \times 10^9$ szoa ml⁻¹) (García 1993), το λαβράκι ($5-55 \times 10^9$ szoa ml⁻¹) (Fauvel et al. 1999), το American shad (*Alosa sapidissima*) (66×10^9 szoa ml⁻¹) (Mylonas et al. 1995), το φαγκρί ($9-24 \times 10^9$ szoa ml⁻¹) (Mylonas et al. 2003a) και το *Micropogonias undulatus* ($23-36 \times 10^9$ szoa ml⁻¹) (Suquet et al. 1994). Παρατηρήθηκε μείωση της πυκνότητας του σπέρματος του πρώτους δύο μήνες (Απρίλιος – Μάιος) και μία μικρή σχετικά αύξηση τον τελευταίο μήνα παρουσίας σπέρματος (Ιούνιος). Η μικρή αυτή αύξηση έχει αναφερθεί ξανά αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό (Mazorra de Quero et al. 2000) στον ιπόγλωσσο. Η μείωση της πυκνότητας του σπέρματος στην αρχή αλλά και κατά τη διάρκεια της περιόδου σπερμίας είναι φυσιολογικό φαινόμενο (Jackson and Sullivan 1995) και βρέθηκε και στην παρούσα μελέτη.

Ένας ακόμη βασικός παράγοντας της ποιότητας του σπέρματος είναι η κινητικότητά του που στην παρούσα μελέτη κυμάνθηκε από 14-94%. Τους δύο πρώτους

μήνες παρατηρήθηκε πτώση της κινητικότητας ενώ τον τελευταίο μήνα σπερμίας σημειώθηκε μία μικρή αύξηση. Μείωση στα επίπεδα της κινητικότητας κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου έχει σημειωθεί και σε άλλες μελέτες, και μάλιστα στο λαβράκι τα επίπεδα της κινητικότητας μειώθηκαν στο μισό από την αρχική τιμή του 95% (Rainis et al. 2003, Rana 1995). Η μείωση αυτή έχει αποδοθεί στην ταυτόχρονη μείωση των στεροειδών ορμονών (Nagahama 1994) γεγονός που συνέβη και στην παρούσα μελέτη εφόσον η 11-KT από τον Μάρτιο έως τον Ιούλιο σημείωσε μεγάλη πτώση. Παρόλα αυτά δεν καταγράφηκε παρόμοια πορεία για την T που σημείωσε αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια της σπερμίας.

Η ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος εξαρτάται από την κινητικότητα του καθώς η γονιμοποίηση φαίνεται να πέφτει κατακόρυφα όταν μειώνεται η κινητικότητα του σπέρματος (Fauvel et al. 1999). Στον κρανιό, στα πρώτα 30 s το 82% των δειγμάτων είχαν σπερματοζωάρια που βρισκόταν σε κίνηση με ποσοστό κινητικότητας 41%. Στο πρώτο λεπτό το 47% των ψαριών είχαν σπέρμα που βρισκόταν σε κινητικότητα με το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων 16% ενώ έπειτα από 80 s καταγράφηκε πλήρης ακινητοποίηση του. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και στο λαβράκι όπου και σε αυτή την περίπτωση η πτώση στην κινητικότητα του ήταν μεγάλη και σε ένα λεπτό το σπέρμα ακινητοποιήθηκε (Fauvel et al. 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός της ραγδαίας πτώσης της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων που σημειώνεται και η συνολική διάρκεια κίνησης των σπερματοζωαρίων δεν είναι από τις υψηλότερα καταγεγραμμένες (Suquet et al. 1994).

Η διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος κυμάνθηκε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τον Απρίλιο μόνο ένα ψάρι παρήγαγε σπέρμα με συγκριτικά υψηλή διάρκεια κινητικότητας (4,6 min), χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η τιμή χαρακτηρίζεται εκτός ορίων (Suquet et al. 1994). Η αμέσως υψηλότερη τιμή τον ίδιο μήνα υπολογίστηκε στα 1,4 min, τιμή πλησιέστερα στις υπόλοιπες μετρήσεις της παρούσας μελέτης. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι λόγω καθυστερημένης ενεργοποίησης του σπέρματος υπάρχει πιθανότητα λάθους στην μέτρηση της διάρκειας κινητικότητας (Billard and Cosson 1992). Παρόλα αυτά πιστεύουμε ότι η χρήση του CASA δεν δημιούργησε τέτοιου είδους προβλήματα και ότι η καταγεγραμμένη τιμή στην προκειμένη περίπτωση είναι σωστή. Η μέση διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος κρανιών δεν χαρακτηρίζεται υψηλή αλλά παρέμενε σε φυσιολογικά επίπεδα. Συγκεκριμένα, σε παρόμοια επίπεδα κινήθηκε η διάρκεια κινητικότητας στο σαφρίδι (*Trachurus*

mediterraneus) (0,8 min), στην κουτσομούρα (*Mullus barbatus*) (1,5 min) (Lahnsteiner and Patzner 1998), στο γραμμωτό λαβράκι (1,4 min) (Holland et al. 1996), στον υπόγλωσσο (0,1-3 min) (Suquet et al. 1994) και στο λαβράκι (0,7-2,9 min) (Fauvel et al. 1999).

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των στεροειδών ορμονών στα αρσενικά άτομα έδειξαν συγκριτικά χαμηλές συγκεντρώσεις όσο της Τ όσο και της 11-ΚΤ. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της Τ δεν ξεπέρασαν τα $0,3 \text{ ng ml}^{-1}$ και της 11-ΚΤ τα $0,8 \text{ ng ml}^{-1}$ ενώ στην άσπρο λαυράκη Τ δεν ξεπέρασε τα $0,9 \text{ ng ml}^{-1}$ και η 11-ΚΤ $4,1 \text{ ng ml}^{-1}$ (Berlinsky et al. 1995). Ακόμη, στο λαβράκι σημειώθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις Τ ($2,4 \pm 0,5 \text{ ng ml}^{-1}$) αλλά και 11-ΚΤ ($3,5 \text{ ng ml}^{-1}$) (Prat et al. 1990). Επίσης, η συγκέντρωση Τ στο φαγκρί κυμάνθηκαν περίπου στα 3 ng ml^{-1} ενώ της 11-ΚΤ στα $1,5 \text{ ng ml}^{-1}$ (Kokokiris et al. 2000) τη στιγμή που στη συναγρίδα η Τ εκτιμήθηκε στα $1,5 \text{ ng ml}^{-1}$ και η 11-ΚΤ στα 2 ng ml^{-1} (Pavlidis et al. 2000). Οι συγκεντρώσεις των στεροειδών ορμονών στα αρσενικά άτομα κρανιών ήταν χαμηλότερα από άλλες παρεμφερείς μελέτες (Sulistyo et al. 2000, Utoh et al. 2004). Η Τ παρουσίασε δύο μέγιστα, ένα κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου και ένα δεύτερο με το τέλος της, γεγονός που συμφωνεί και με το λαβράκι (Prat et al. 1990). Αντίθετα η 11-ΚΤ παρουσίασε μία ραγδαία αύξηση τον Μάρτιο και στη συνέχεια η συγκέντρωση της ορμόνης μειωνόταν συνεχώς ως τη λήξη της περιόδου σπερμίας (Prat et al. 1990). Η 11-ΚΤ φαίνεται και στην παρούσα μελέτη να είναι η κύρια ορμόνη στην διαδικασία της σπερματογένεσης (Borg 1994) καθώς παρουσίασε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση από την Τ (Berlinsky et al. 1995, Carragher and Pankhurst 1993, Koldras et al. 1990). Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση της 11-ΚΤ άρχισαν αυξάνονται με την πτώση της θερμοκρασίας του νερού φτάνοντας τη μέγιστη τιμή τον μήνα με τη χαμηλότερη θερμοκρασία, όπως συνέβη και στο Ιαπωνικό μουγκρί (*Conger myriaster*) (Utoh et al. 2004).

Συμπερασματικά, ο κρανιός είναι ένα είδος που δεν αναπαράγεται αυθόρμητα σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Τα θηλυκά άτομα είχαν ολοκληρώσει την φάση της λεκιθογένεσης και διατήρησαν τα λεκιθικά ωοκύτταρα από τον Μάιο έως τον Ιούνιο σε θερμοκρασία $17-24^{\circ}\text{C}$, με βάση την ιστολογική αξιολόγηση. Αντίστοιχα τα αρσενικά παρήγαγαν σπέρμα από τον Μάρτιο έως τον Ιούνιο, σχετικά καλής ποιότητας και πιθανόν ικανό για γονιμοποίηση.

3. Ορμονική πρόκληση της αναπαραγωγής στον Κρανίο

3.1 Εισαγωγή

Ο κρانيός (*Argyrosomus regius*), ανήκει στην Οικογένεια Sciaenidae και είναι ψάρι βενθοπελαγικό (15-300 m βάθος) (FAO 2010) που συναντάται τόσο σε εκβολές ποταμών όσο και σε παράκτια νερά (Griffiths and Heemstra 1995). Παρουσιάζει μεγάλη κατανομή και συναντάται συνήθως σε υποτροπικά κλίματα (Fishbase 2009). Είναι είδος γονοχωριστικό χωρίς να παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό και η αναπαραγωγική του ωριμότητα επέρχεται σε ηλικία μεγαλύτερη των τεσσάρων χρόνων (FAO 2010). Κατά την αναπαραγωγική περίοδο (Απρίλιος-Ιούλιος) σε θερμοκρασία 17-22°C, ένα θηλυκό άτομο, μήκους σώματος 1,2 m παράγει περίπου 800.000 αυγά σε 3-5 ωοτοκίες καθώς το ψάρι αυτό είναι πολύ-εναποθέτης (FAO 2009). Τα τελευταία χρόνια λόγω του γρήγορου ρυθμού αύξησης που παρουσιάζει στη σάρκα (EL-Shebly et al. 2007) καθώς και της καλής ποιότητας του κρέατος του (Fasano et al. 2006), υπάρχει ενδιαφέρον για την εκτροφή του (Chatzifotis et al. 2010, Duncan et al. 2008, Roo et al. 2010).

Πολλά είδη αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της αναπαραγωγής λόγω δυσλειτουργιών που οφείλονται σε ορμονικές διαταραχές (Mylonas and Zohar 2000, Mylonas et al. 2010). Τα θηλυκά άτομα δεν ολοκληρώνουν την ωρίμανση με αποτέλεσμα τα ωοκύτταρα μπαίνουν σε φάση απόπτωσης (Babin et al. 2007, Zohar 1988, 1989). Στα περισσότερα είδη που ζουν σε αιχμαλωσία τα αρσενικά άτομα ολοκληρώνουν την σπερματογένεση αλλά και τη φάση της σπερμίας (Mylonas and Zohar 2000, Schulz and Miura 2002, Schulz et al. 2010). Παρόλα αυτά παρατηρείται συχνά πρόβλημα στην ποιότητα του σπέρματος και κυρίως στην ποσότητά του (Berlinsky et al. 1997). Σε διαφορετική περίπτωση τα ψάρια αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν και τη γαμετογένεση όπως συμβαίνει στο μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) (Micale et al. 1999) αλλά και το χέλι (*Anguilla sp.*) (Ohta et al. 1997).

Για το λόγο αυτό πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για τον έλεγχο της αναπαραγωγής με χρήση ορμονών (Zohar and Mylonas 2001). Σήμερα, ως περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η χρήση της γοναδοεκλυτίνης (gonadotropin releasing hormone, GnRH) ή αγωνιστών της (GnRHa). Η ενδογενής πρόκληση σύνθεσης των γοναδοτροπινών (Zohar 1988), της ωχρινοποιητικής ορμόνης (luteinizing hormone, LH) και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle stimulating hormone, FSH), η υψηλή δραστηριότητα της καθώς και ευρεία χρήση της σε μεγάλο αριθμό ειδών είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα της GnRHa (Crim and Bettles 1997, Mylonas et al. 2010). Η χρήση της GnRHa μπορεί να γίνει είτε με χορήγηση της ορμόνης σε ενέσιμες μορφές είτε με χρήση

εμφυτευμάτων (implants) (Crim and Bettles 1997, Donaldson 1996, Zohar and Mylonas 2001). Σε πολλά είδη λόγω της στρατηγικής αναπαραγωγής που ακολουθούν δεν είναι αρκετή η χορήγηση μίας δόσης ορμόνης. Η στιγμιαία αύξηση της LH δεν είναι ικανή για να επιφέρει την τελική γενετική ωρίμανση (Nagahama 1994). Η σταδιακή απελευθέρωση της ορμόνης, η αύξηση έκκρισης LH (Mylonas et al. 1998a, Mylonas et al. 1998b), καθώς και η μείωση του αριθμού των χειρισμών είναι μερικά από τα προτερήματα της χρήσης των εμφυτευμάτων που οδηγούν στην επιτυχημένη ωρίμανση και γαμετοτοκία (Mylonas and Zohar 2000, Mylonas et al. 2010).

Στον κρανιό έχει πραγματοποιηθεί μία μόνο προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα, σε άγρια ενήλικα άτομα κρανιού που αιχμαλωτίστηκαν έγινε χορήγηση ορμόνης GnRHα με ενέσιμη μορφή καθώς και με εμφυτεύματα (Duncan et al. 2008). Τα ψάρια αντέδρασαν θετικά απελευθερώνοντας γαμέτες καλής ποιότητας. Παρόλα αυτά, δεν έχει αναφερθεί μελέτη ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής σε εκτρεφόμενους κρανιούς που διαβιούσαν σε αιχμαλωσία.

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της χρήσης εμφυτευμάτων GnRHα στην επαγωγή της γαμετοτοκίας του κρανιού και η ανάπτυξη ενός πρωτόκολλου για χρήση από ιχθυογεννητικούς σταθμούς που ενδιαφέρονται να συμπεριλάβουν το είδος αυτό στην παραγωγή τους.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Διαχείριση γεννητόρων

Το ερευνητικό μέρος της παρούσας εργασίας διεξήχθη στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) το 2009 και 2010. Χρησιμοποιήθηκαν ψάρια 6 ετών που προέρχονταν από εκτροφή της Γαλλίας και 4 ετών που προέρχονταν από εκτροφή του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων το 2009 χρησιμοποιήθηκαν τρεις δεξαμενές 9000 l ανοιχτού συστήματος και τη δεύτερη χρονιά (2010) πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο δεξαμενές 5000 l και μία δεξαμενή 9000 l ανοιχτού συστήματος. Και τις δύο χρονιές ακολουθήθηκε φυσική φωτοπερίοδος με φυσικά και τεχνητά μέσα ενώ η θερμοκρασία του νερού ήταν ελεγχόμενη. Η διατροφή των ψαριών καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών περιλάμβανε καθημερινά βιομηχανική τροφή, ενώ τρεις φορές την εβδομάδα διανεμόταν αποψυγμένο καλαμάρι. Καταμέτρηση της θερμοκρασίας πραγματοποιούνταν μία φορά την εβδομάδα.

3.2.2 Πειράματα ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής

Το 2009 σε χρονικό διάστημα 45 ημερών πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα ομαδικής πρόκλησης γαμετοτοκίας. Εξετάστηκαν συνολικά 26 ψάρια (12 θηλυκά, 14 αρσενικά) από τα οποία τα 23 (11 θηλυκά, 12 αρσενικά) υποβλήθηκαν σε ορμονική αγωγή. Τα ψάρια τοποθετήθηκαν στις τρεις δεξαμενές στις 5/5/2009 (3 θηλυκά, 3 αρσενικά), στις 18/5/2009 (4 θηλυκά, 5 αρσενικά) και στις 9/6/2009 (4 θηλυκά, 4 αρσενικά). Το μέσο σωματικό βάρος κατά την έναρξη των πειραμάτων ήταν 6.934 ± 1.949 g.

Κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας, το νερό ρυθμιζόταν σε ύψος 40 cm και τα ψάρια υποβάλλονταν σε μερική αναισθησία με γαρυφαλέλαιο ($0,015 \text{ ml l}^{-1}$) (Wagner et al. 2002). Στη συνέχεια, αφού μεταφερόταν σε δεξαμενή όγκου 400 l γινόταν η πλήρης αναισθητοποίησή τους. Πραγματοποιούνταν λήψη βιοψίας από τις ωοθήκες των ψαριών με τη χρήση γυάλινου καθετήρα (Natelson tube, 1 mm εξωτερική διάμετρος) που ήταν συνδεδεμένος σε λάστιχο ίδιας διατομής. Το δείγμα εξεταζόταν νωπό σε οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να εκτιμηθεί το στάδιο ωρίμανσης και η διάμετρος των ωοκυττάρων. Παράλληλα, τμήμα του δείγματος αυτού εμβαπτίζονταν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης και 1% γλουταραλδεΐδης, για τη μονιμοποίησή του, προκειμένου να υποβληθεί σε ιστολογική εξέταση. Στα αρσενικά άτομα με απαλή μάλαξη της κοιλιακής

χώρας γινόταν έλεγχος για την παρουσία ή μη παρουσία σπέρματος. Σε περίπτωση ύπαρξης σπέρματος, έπειτα από σχολαστικό καθαρισμό του γενετικού πόρου, το σπέρμα συλλέγονταν με πιπέτα και φυλάσσονταν σε πάγο. Η ιστολογική εξέταση των γονάδων των αρσενικών ψαριών έγινε έπειτα από θανάτωσή δύο ατόμων. Σε περίπτωση που το ψάρι βρισκόταν σε προχωρημένο στάδιο της γαμετογένεσης γινόταν επέμβαση με εμφύτευμα GnRHα το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριο φυσιολογίας της αναπαραγωγής με GnRHα που προήλθε από την Bachem Ελβετίας (Mylonas and Zohar 2000). Μετά από την εμφύτευση τα ψάρια επανατοποθετούνταν στην δεξαμενή όπου αναμενόταν η γαμετοτοκία.

Την δεύτερη χρονιά (2010) διεξήχθησαν τα ατομικά πειράματα ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής. Σε δύο χρονικές στιγμές (4/5/2010, 3/6/2010), 3 θηλυκά και 6 αρσενικά άτομα τοποθετήθηκαν σε 3 δεξαμενές σε αναλογία 1:2. Για την επιλογή των θηλυκών κρανίων ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία ενώ τα αρσενικά άτομα ελέγχθηκε αν ήταν σπερμιάζοντα. Δείγμα για ιστολογική εξέταση πάρθηκε μόνο από τα θηλυκά άτομα τόσο πριν όσο και μετά τις ωτοκίες ενώ ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία ιστολογικής εξέτασης.

3.2.3 Συλλογή και ποιότητα γαμετών

Η συλλογή των αυγών πραγματοποιούνταν από ένα σύστημα επιφανειακής απορρόφησης νερού και σε περίπτωση ωτοκίας τα αυγά συλλέγονταν με απόχη και συγκεντρώνονταν σε δοχείο 10 l. Στη συνέχεια σε δείγμα 10 ml γινόταν εκτίμηση του αριθμού τους (γονιμότητα, number of eggs) καθώς και της αναλογίας γονιμοποιημένων και μη αυγών (ποσοστό γονιμοποίησης, % fertilization). Το 2009, για την εκτίμηση της ποιότητας των αυγών χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος των πλακών μικροτιτλοδότησης (Panini et al. 2002) στην τελευταία προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας. Για 5 λεπτά σταματούσε η παροχή αερισμού στον επωαστήρα προκειμένου να σταματήσει οποιαδήποτε αναταραχή και να διαχωριστούν τα επιπλέοντα (ζωντανά) από τα βυθιζόμενα (νεκρά) αυγά. Ένα αριθμός από τα επιπλέοντα αυγά (~500-700) τοποθετούνταν σε δοχείο με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό όπου παρέμεναν για μερικά λεπτά. Στη συνέχεια, μετά από πλύση με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό τα αυγά τοποθετούνταν εκ νέου σε δοχείο με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Έπειτα, περίπου 300 από τα αυγά μεταφέρονταν σε δισκίο Petri προκειμένου να διαχωριστούν και να τοποθετηθούν ατομικά σε αποστειρωμένες πλάκες μικροτιτλοδότησης (microtiter plates, mct plates). Κάθε πλάκα

αποτελούνταν από 96 θήκες και κάθε μία από αυτές περιείχε 200 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και ένα ζωντανό αυγό όπου για 5 ημέρες παρακολουθείτο το ποσοστό εκκόλαψης, καθώς και η επιβίωση των νυμφών.

Το 2009 στην περίπτωση των αρσενικών ατόμων, για την ανάλυση του σπέρματος το δείγμα αραιώθηκε (2626 φορές) σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl). Με χρήση πλακιδίων Neubauer και καταμετρώντας σπερματοζωάρια εκτιμήθηκε η πυκνότητα. Η καταμέτρηση γινόταν δύο φορές και στη συνέχεια γινόταν αναγωγή σε $szoa\ ml^{-1}$. Η κινητικότητα (%) εκτιμήθηκε ενεργοποιώντας 5 μl σπέρματος με 500 μl θαλασσινό νερό και παρατηρώντας την πρόσθια κίνηση των σπερματοζωαρίων. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε έπειτα από 24 ώρες και κάθε δεύτερη ημέρα διατηρώντας το σπέρμα σε θερμοκρασία 4°C. Τέλος, η κίνηση των μαστιγίων του σπέρματος καταγράφηκε μέχρι την ακινητοποίηση του 90% και καταγράφηκε ως διάρκεια κίνησης του σπέρματος (duration, min).

Το 2010, για την εκτίμηση της ποιότητας των αυγών καταγράφονταν καθημερινά η γονιμότητα καθώς και το ποσοστό γονιμοποίησης όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για την ιστολογική εξέταση τα δείγματα αρσενικών και θηλυκών ατόμων μετά από διαδικασία αφυδάτωσης τοποθετήθηκαν σε πλακίδια με υδροξυεθυλμεθακρυλική πολυμεριζόμενη ρητίνη (Technovit 7100, Heraeus Kulzer, Germany) και παρέμειναν έως ότου πολυμεριστεί. Οι τομές έγιναν σε μικροτόμο Leica RM 2245 (Germany) και είχαν πάχος 3 μm. Στη συνέχεια έγινε χρώση με Polychrome I (0,325 g methylene blue, 0,05 g azure II, 25 ml glycerol, 250 ml αποσταγμένο νερό) και Polychrome II (0,5 g basic fuchsin, 250 ml αποσταγμένο νερό) με αραιώση 1:3,5 σε αποσταγμένο νερό (Bennett et al. 1976). Τα δείγματα εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse 50i) και φωτογραφήθηκαν με φωτογραφική μηχανή (Jenoptik progress C12 plus).

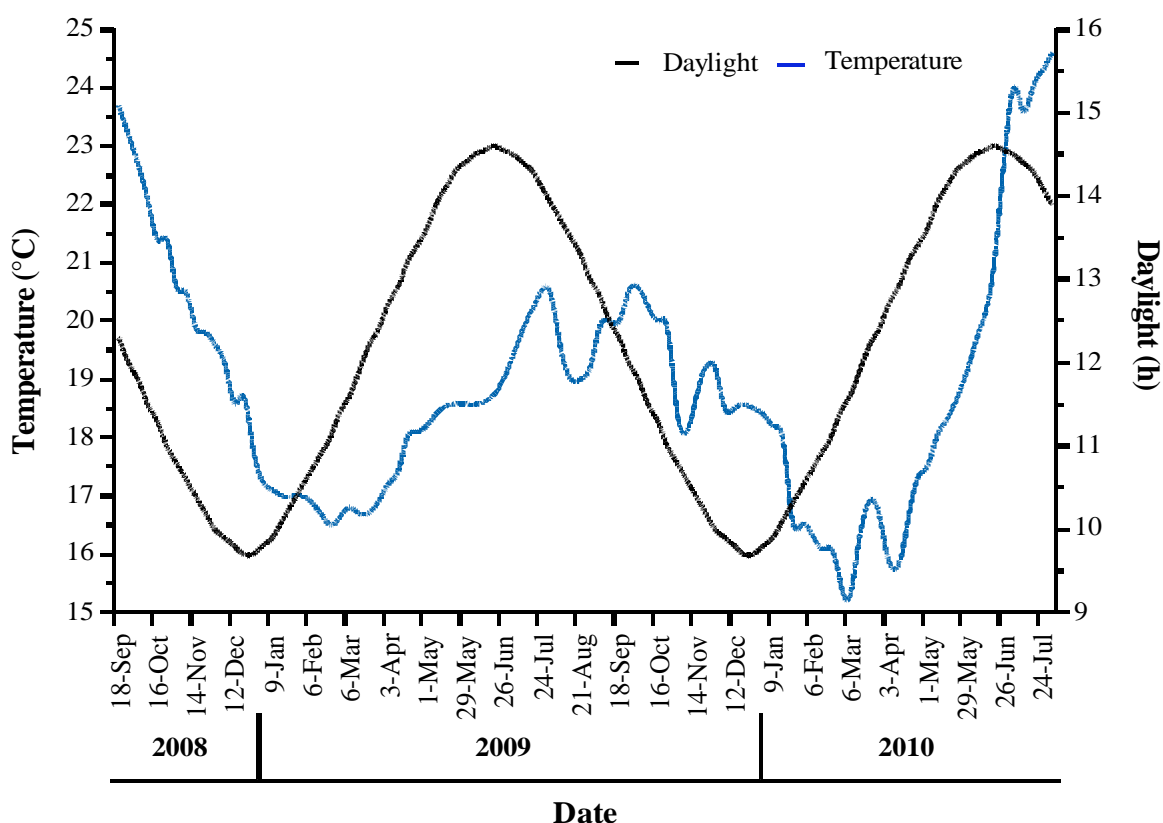
3.2.4 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα για τα θηλυκά άτομα αναλύθηκαν ως προς τη γονιμότητα kg^{-1} και το ποσοστό γονιμοποίησης, και για τα αρσενικά ως προς το ποσοστό κινητικότητας, τη διάρκεια κινητικότητας και την πυκνότητα με ανάλυση διασποράς (ANOVA, $p \leq 0,05$) με το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM, USA). Τα γραφήματα έγιναν με το πρόγραμμα DeltaGraph V5 (Red Rock Software, Inc., USA).

3.3 Αποτελέσματα

Η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 15,3 έως και 24,6°C με υψηλότερη τιμή στους 25,5°C και χαμηλότερη στους 15,1°C.

Το 2009, στα πειράματα ομαδικής πρόκλησης της αναπαραγωγής τα αρσενικά άτομα που υποβλήθηκαν σε ορμονική θεραπεία, παράγααν σπέρμα πυκνότητας $14 \pm 5,3 \times 10^9$ szoa ml⁻¹. Η κινητικότητα του υπολογίστηκε στο $78 \pm 6,8\%$ και η διάρκεια της κινητικότητάς στα $1,8 \pm 0,1$ min. Σε θερμοκρασία 4°C το σπέρμα παρέμεινε ζωντανό κατά μέσο όρο για 6 ± 3 μέρες. Τα αποτελέσματα δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ως προς το ποσοστό κινητικότητας, τη διάρκεια κινητικότητας και την πυκνότητα.



Εικόνα 13: Θερμοκρασιακό προφίλ και ώρες ηλιοφάνειας για την περίοδο διεξαγωγής των πειραμάτων ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας.

Από τις τρεις ορμονικές θεραπείες, συλλέχτηκαν αθροιστικά 29.900.000 αυγά, με μέση ετήσια σχετική γονιμότητα $365.000 \pm 107.000 \text{ eggs kg}^{-1}$ και με ποσοστό γονιμοποίησης $85 \pm 2\%$ (Πίνακας 1). Η πρώτη προσπάθεια πρόκλησης έγινε στις 5 Μαΐου επιτυγχάνοντας ωοτοκία με σχετική γονιμότητα $267.000 \text{ eggs kg}^{-1}$ και ποσοστό γονιμοποίησης $87 \pm 6\%$ σε 21 ημέρες (Εικόνα 14). Η πρώτη ωοτοκία πραγματοποιήθηκε την τρίτη ημέρα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος. Στη συνέχεια καταγράφηκαν 4 συνεχόμενες ωοτοκίες και έπειτα από παύση ορισμένων ημερών οι ωοτοκίες συνεχίστηκαν. Το ποσοστό γονιμοποίησης παρέμενε υψηλό, πάνω από 76%, σε όλη τη διάρκεια των ωοτοκιών σε αντίθεση με τη γονιμότητα που παρουσίασε ένα μέγιστο στη δεύτερη ωοτοκία ($88.000 \text{ eggs kg}^{-1}$) και στη συνέχεια μία συνεχιζόμενη πτώση μέχρι τις 29 Μαΐου. Η δεύτερη θεραπεία πραγματοποιήθηκε στις 18 Μαΐου με την σχετική γονιμότητα να φτάνει στα $480.000 \text{ eggs kg}^{-1}$ και το ποσοστό γονιμοποίησης στο $85 \pm 9\%$ σε 21 ημέρες. Η πρώτη ωοτοκία πραγματοποιήθηκε 48 ώρες μετά την χορήγηση του εμφυτεύματος και στη συνέχεια καταγράφηκαν 4 συνεχόμενες ωοτοκίες. Η μέγιστη σχετική γονιμότητα μετρήθηκε στα $133.000 \text{ eggs kg}^{-1}$ στη δεύτερη ωοτοκία. Το ποσοστό γονιμοποίησης παρέμενε σταθερά υψηλότερο από 64% σε όλη τη διάρκεια των ωοτοκιών. Στην τρίτη προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης (9/6/2009) σε 18 ημέρες παράχθηκαν αυγά με σχετική γονιμότητα $348.485 \text{ eggs kg}^{-1}$ και ποσοστό γονιμοποίησης $83 \pm 17\%$. Στην περίπτωση αυτή οι ωοτοκίες ξεκίνησαν 48 ώρες μετά την χορήγηση του εμφυτεύματος και συνεχίστηκαν για 6 ημέρες. Το μέγιστο της γονιμότητας καταγράφηκε στην τρίτη ωοτοκία ($126.000 \text{ eggs kg}^{-1}$) και το ποσοστό γονιμοποίησης κυμάνθηκε σταθερά πάνω από 53%.

Κατά τη διαδικασία της στατιστικής ανάλυσης δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές ως προς τη γονιμότητα ανά ωοτοκία και το ποσοστό γονιμοποίησης μεταξύ των τριών προσπαθειών για την ορμονική πρόκληση της αναπαραγωγής (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Μελετώντας ιστολογικά τους όρχεις των αρσενικών κρανίων εντοπίστηκαν όλες οι φάσεις της σπερματογένεσης συμπεριλαμβανομένων πρωτογενών σπερματοκυττάρων, δευτερογενών σπερματοκυττάρων και σπέρματος (Εικόνα 18).

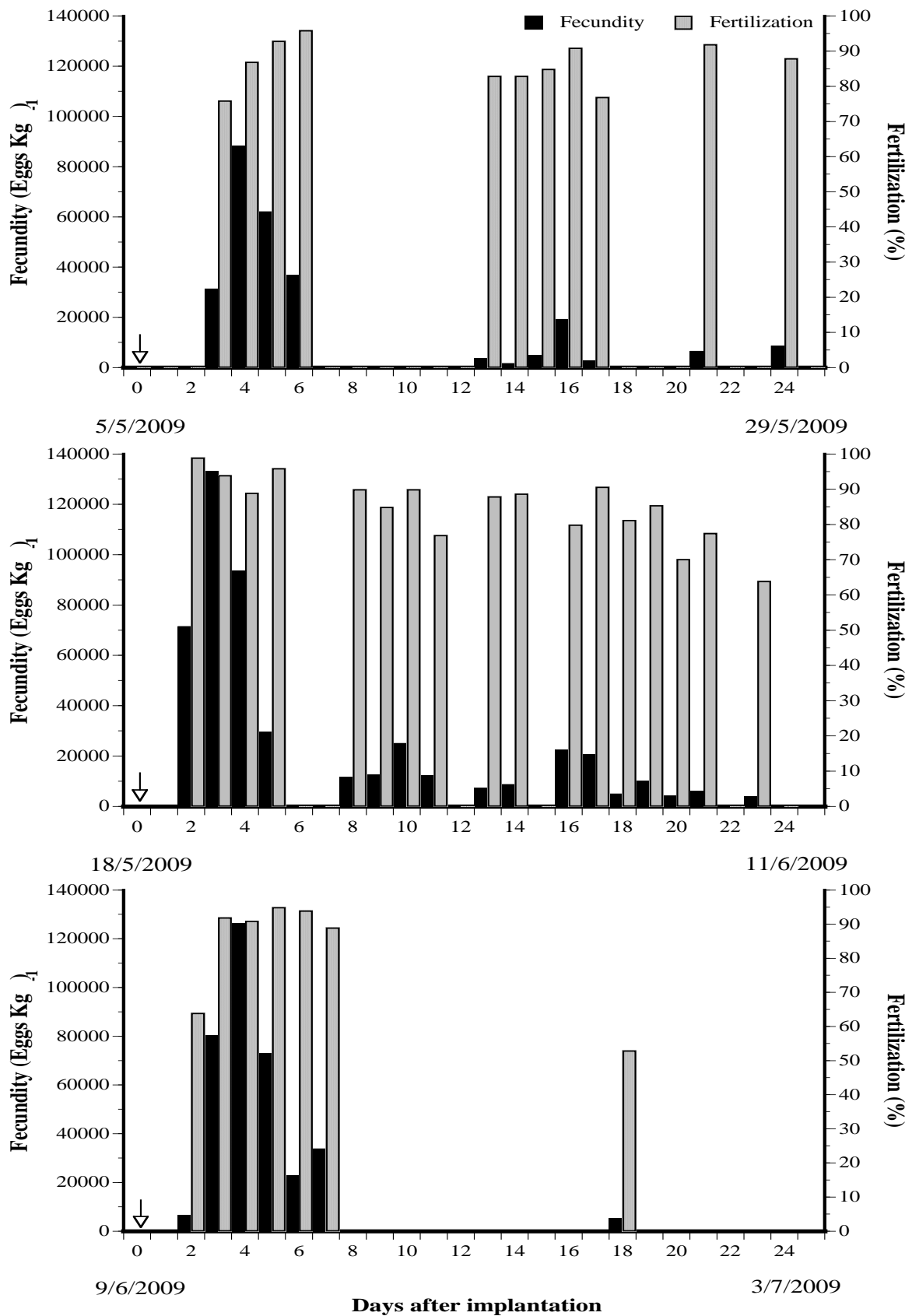
Πίνακας 1: Αριθμός ωοτοκίων, ετήσια σχετική γονιμότητα, σχετική γονιμότητα ανά ωοτοκία και ποσοστό γονιμοποίησης για τα τρία πειράματα ομαδικής πρόκλησης γαμετοτοκίας.

Δάφναι ά	Çì åñî ì çíßå -ï ñ? åç óç ò åì ö õöå?ì áöï ò	Áñæèì üò ø áñé? í ù ì öï ê é? í	Áñæèì üò	ÁöåÛ Kg/ Ûì öï ê ßå	ÁöåÛ Kg/ Åðï ÷?	Dï óï óöü åï í é ì öï ßç óç ò (%)
1	5/5/2009	6	11	24260±28439	266860	87±6
2	18/5/2009	10	17	28214±36565	479636	85±9
3	9/6/2009	10	7	49784±44943	348485	85±17

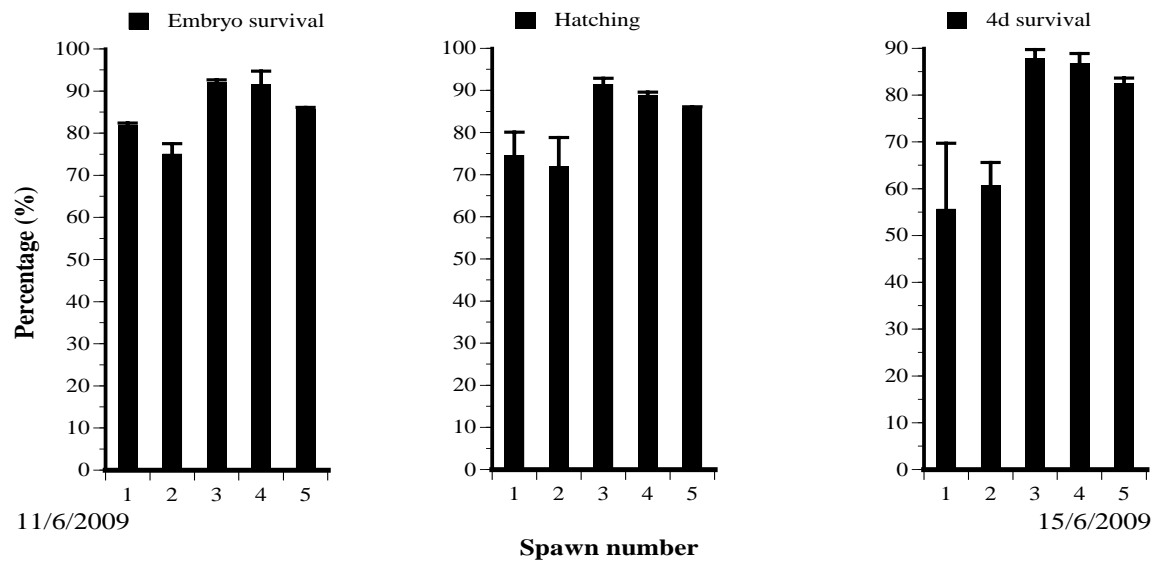
Τα αυγά που συλλέχτηκαν έπειτα από την τελευταία ορμονική πρόκληση της αναπαραγωγής (9/6/2009) παρουσίασαν μέσο ποσοστό εκκόλαψης 83±9% τη στιγμή που σε όλες τις ωοτοκίες το ποσοστό δεν έπεσε κάτω από 72% (Εικόνα 15). Η επιβίωση την πρώτη ημέρα κυμάνθηκε από 75 έως 92% με μέσο ποσοστό επιβίωσης 85±7%. Αντίστοιχα την τέταρτη ημέρα η επιβίωση μεταβλήθηκε από 56 έως 88 % με το μέσο ποσοστό στο 75±15%.

Στα ατομικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν το 2010 η μέση ετήσια σχετική γονιμότητα εκτιμήθηκε στα 435.000±199.000 eggs kg⁻¹, το μέσο ποσοστό γονιμοποίησης στο 91±4%, και ο αριθμός των ωοτοκίων 11±5 spawns (Πίνακας 2) (Εικόνα 16,17). Σε όλες τις περιπτώσεις η πρώτη ωοτοκία πραγματοποιήθηκε δύο ημέρες έπειτα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος. Οι ωοτοκίες συνεχίζονταν για τουλάχιστον 5 ημέρες και έπειτα από παύση το πολύ δύο ημερών οι ωοτοκίες συνεχίζονταν. Η γονιμότητα παρουσίασε μέγιστο στις πρώτες 4 ωοτοκίες και στη συνέχεια μειωνόταν σταδιακά μέχρι το τέλος των ωοτοκίων. Το ποσοστό γονιμοποίησης έπειτα από τις 4 πρώτες ωοτοκίες παρέμενε σταθερά πάνω από το 56,8% και σε ορισμένες περιπτώσεις άγγιξε και το 100%.

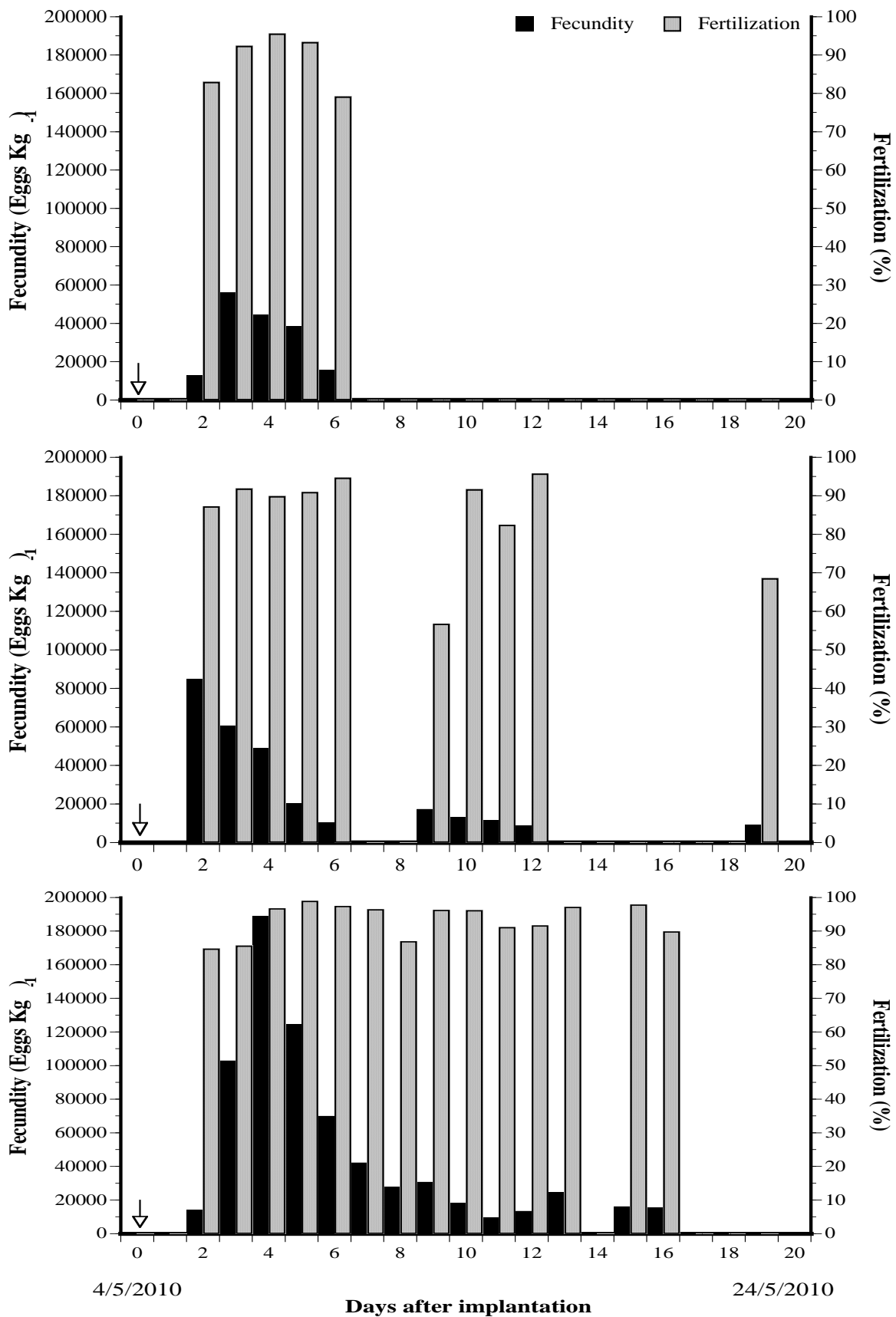
Όσο αφορά τη γονιμότητα και το ποσοστό γονιμοποίησης δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ούτε μεταξύ των ατόμων ούτε μεταξύ των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών (ANOVA, p≤0,05).



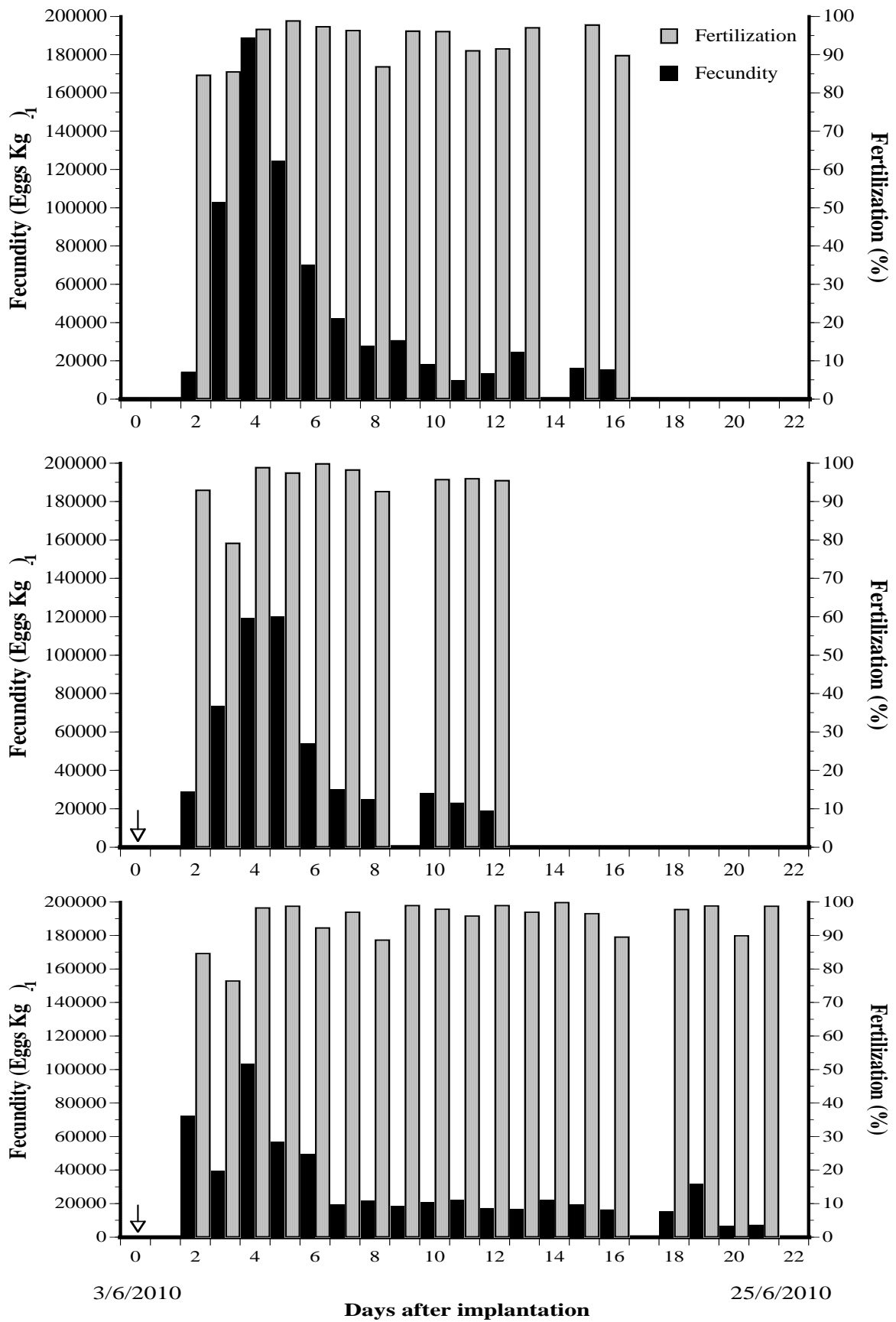
Εικόνα 14: Ημερήσια γονιμότητα ανά σωματικό βάρος θηλυκού κρανίου (n= 26, Μέσο Βάρος= 6,8±1,9 Kg) και ποσοστό γονιμοποίησης μετά από χορήγηση εμφυτεύματος GnRHα στα ομαδικά πειράματα. Το βέλος αναφέρεται στην ημέρα χορήγησης του εμφυτεύματος.



Εικόνα 15: Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση επιβίωσης εμβρύου, ποσοστού εκκόλαψης και επιβίωσης την 4 ημέρα για τις 5 πρώτες ωοτοκίες μετά από χορήγηση εμφντεύματος GnRHα. Τα δεδομένα προέρχονται από την τελευταία προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας των ομαδικών πειραμάτων (9/6/2009).



Εικόνα 16: Ημερήσια γονιμότητα ανά σωματικό βάρος θηλυκού κρανίου ($6,9 \pm 1,4$ Kg) και ποσοστό γονιμοποίησης μετά από χορήγηση εμφυτεύματος GnRHα στα ατομικά πειράματα στις 4/5/2010. Το βέλος αναφέρεται στην ημέρα χορήγησης του εμφυτεύματος.

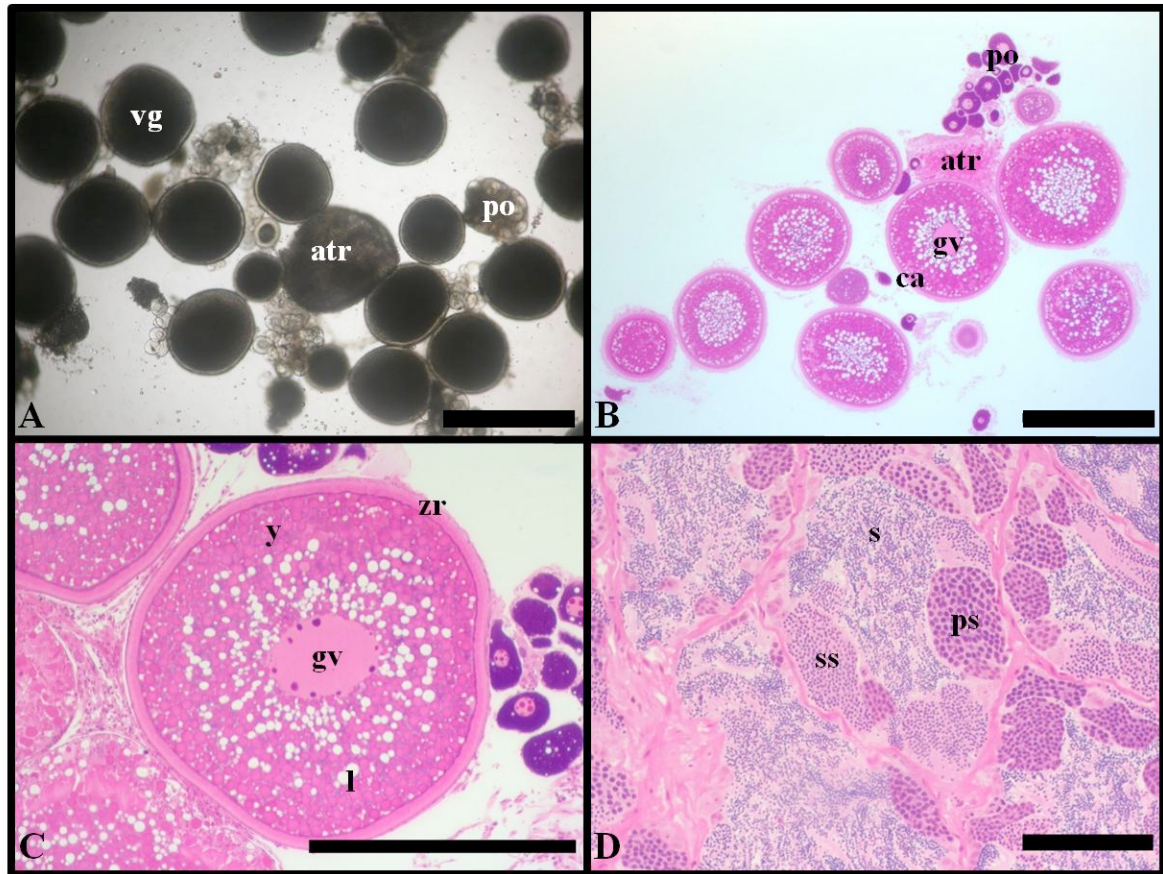


Εικόνα 17: Ημερήσια γονιμότητα ανά σωματικό βάρος θηλυκού κρανίου ($12 \pm 0,4$ Kg) και ποσοστό γονιμοποίησης μετά από χορήγηση εμφυτεύματος GnRHα στα ατομικά πειράματα στις 3/6/2010. Το βέλος αναφέρεται στην ημέρα χορήγησης του εμφυτεύματος.

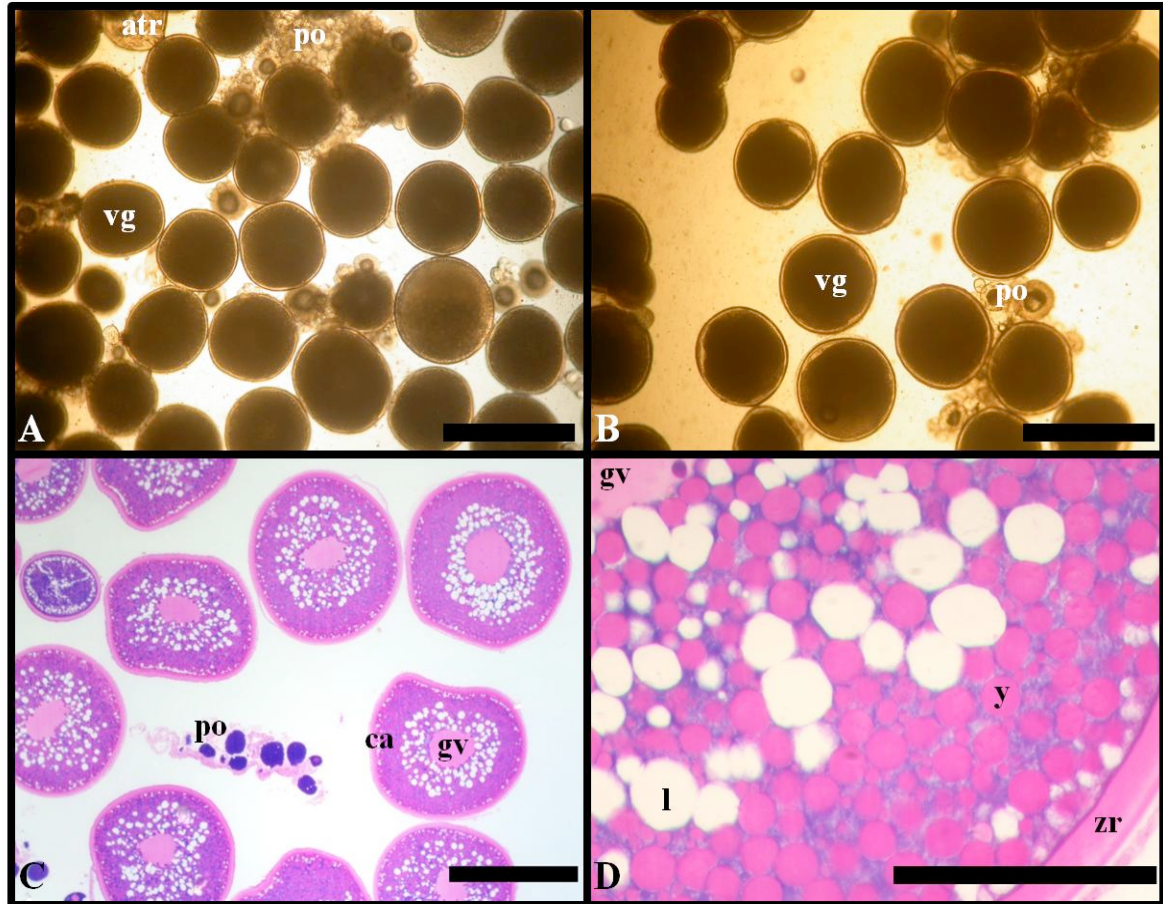
Κατά τον έλεγχο της βιοψίας ατόμων που είχαν επιλεχθεί για την ορμονική πρόκληση και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν λεκιθικά ωοκύτταρα διαμέτρου $600\pm 50 \mu\text{m}$, που καταλάμβαναν το μεγαλύτερο μέρος της ωοθήκης (Εικόνα 18,19). Τα ωοκύτταρα είχαν σφαιρικό ομοιογενές σχήμα και χρώμα σκούρο, ένδειξη της ύπαρξης της λεκίθου στο στάδιο αυτό. Η ιστολογική εξέταση επιβεβαίωσε την συνύπαρξη πρωτογενών, λεκιθογενών και ατρητικών ωοκυττάρων στις γονάδες. Παρατηρήθηκαν ωοκύτταρα σε όλα τα στάδια της ωογένεσης, πρωτογενή ωοκύτταρα, ωοκύτταρα σε φάση φλοιϊκών κυστιδίων αλλά και ωοκύτταρα σε αποπτωτική φάση. Στα λεκιθικά ωοκύτταρα διακρίνεται κεντρικά τοποθετημένος ο πυρήνας, ενώ περιμετρικά του πυρήνα βρίσκονται διάσπαρτα τα λιπίδια, η λέκιθος και η ακτινωτή ζώνη.

Πίνακας 2: Αριθμός ωοτοκίων, ετήσια σχετική γονιμότητα, σχετική γονιμότητα ανά ωοτοκία και ποσοστό γονιμοποίησης για τα δύο πειράματα ατομικής πρόκλησης γαμετοτοκίας.

Αἵεἰ ὕò èç èðèï ? άòῦ ἰ ὃ	Çì ἄἡἰ ἰ çí ßḗ ÷ ñ? ἄç óç ò ἄ ὀ ò òḗ? ἰ ἄῶ ὀ	Αἵεἰ ὕò ὀ ἰ ὀἰ êé? ἰ	ÁḡḗÛ Kg/ Û ἰ ὀἰ ê ßḗ	ÁḡḗÛ Kg/ Ἄḗ ἰ ÷?	Dἰ ὀἰ ὀḡῦ ἄ ἰ ἄ ἰ ḗ ἰ ßç óç ò (%)
1	4/5/2010	5	33625±18726	168127	89±7
2	4/5/2010	10	28540±26786	285401	85±3
3	4/5/2010	6	59380±39296	356286	87±4
4	3/6/2010	14	49956±53521	699394	93±4
5	3/6/2010	10	52206±39279	522066	95±9
6	3/6/2010	19	30415±24465	577886	95±2



Εικόνα 18: Φωτογραφίες από βιοψίες και ιστολογικές τομές ωοκυττάρων / όρχεων κρανιού. Οι εικόνες αναφέρονται σε άτομα που συμμετείχαν στα ομαδικά πειράματα το χρονικό διάστημα από 5/5/2009 έως 9/6/2009. **A-**Βιοψία ωοθήκης από θηλυκό κρανιό. Ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vg), ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (po) όπως και λεκιθικά ωοκύτταρα σε φάση απόπτωσης (atr). Η μπάρα αναπαριστά 500μm. **B-**Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανιού στον οποίο εμφυτεύτηκε GnRHα για την επαγωγή της ωοτοκίας. Πυρήνας (gv), πρωτογενή ωοκύτταρα (po), φλοϊκά κυστίδια (ca) και λεκιθικά ωοκύτταρα σε φάση απόπτωσης (atr). Η μπάρα αναπαριστά 500 μm. **C-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανιού στον οποίο εμφυτεύτηκε GnRHα για την επαγωγή της ωοτοκίας. Πυρήνας (gv), λέκιθος (y), λιπίδια (i), διάφανη ζώνη (zr). Η μπάρα αναπαριστά 500μm. **D-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής από γονάδα αρσενικού κρανιού τον Ιούνιο. Πρωτογενή σπερματοκύτταρα (ps), δευτερογενή σπερματοκύτταρα (ss), σπερματοζώαρια (s). Η μπάρα αναπαριστά 100μm.



Εικόνα 19: Βιοψίες και μικροφωτογραφίες από θηλυκά άτομα κρανίου. Οι εικόνες αναφέρονται σε άτομα που συμμετείχαν στα ατομικά πειράματα στις 4/5/2010 και 3/6/2010. **A-**Βιοψία ωθήκης από θηλυκό κρανίο. Ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vg), ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (po) όπως και λεκιθικά ωοκύτταρα σε φάση απόπτωσης (atr). Η μπάρα αναπαριστά 500μm. **B-** Βιοψία ωθήκης από θηλυκό κρανίο. Ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vg) και ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα. Η μπάρα αναπαριστά 500μm. **C-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου στον οποίο εμφυτεύτηκε GnRHα για την επαγωγή της ωοτοκίας. Πυρήνας (gv), πρωτογενή ωοκύτταρα (po) και φλοιϊκά κυστίδια (ca).. Η μπάρα αναπαριστά 500μm. **D-** Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής γονάδας θηλυκού κρανίου στον οποίο εμφυτεύτηκε GnRHα για την επαγωγή της ωοτοκίας. Πυρήνας (gv), λέκιθος (y), λιπίδια (l), διάφανη ζώνη (zr). Η μπάρα αναπαριστά 100μm.

3.4 Συζήτηση

Την πρώτη χρονιά πραγματοποιήθηκαν τα ομαδικά πειράματα, προκειμένου να γίνει γνωστή η απόκριση του κρανιού σε εμφυτεύματα GnRHα και σύγκριση με άλλες μελέτες ορμονικής πρόκλησης σε άλλα είδη (Mylonas and Zohar 2007, Mylonas et al. 2004a, Mylonas et al. 2004b). Ο κρανιός έδειξε να ανταποκρίνεται θετικά στην προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης της αναπαραγωγής. Η αποτυχία της αναπαραγωγής είναι συχνό φαινόμενο στα ψάρια (Mylonas et al. 2010) και οφείλεται στην αποτυχία απελευθέρωσης της LH από την υπόφυση (Mylonas et al. 1998a). Παρόλο που δεν έχουν γίνει μελέτες για την εκτίμηση της δυσλειτουργίας στον κρανιό φαίνεται να οφείλεται και σε αυτή την περίπτωση στην μη απελευθέρωση της LH καθώς η χρήση εμφυτευμάτων στην παρούσα μελέτη αλλά και σε άλλες (Duncan et al. 2008) οδήγησε τελικά στην αναπαραγωγή. Κατά τον έλεγχο των βιοψιών στα θηλυκά άτομα παρατηρήθηκαν λεκιθικά ωοκύτταρα που επιβεβαίωσαν την πραγματοποίηση της ωογένεσης. Παράλληλα παρατηρήθηκε συνύπαρξη τόσο πρωτογενών αλλά και ωοκυττάρων σε φάση φλοιϊκών κυστιδίων, γεγονός που συνάδει με την ένδειξη ότι ο κρανιός είναι πολύ-εναποθέτης και ωτοκεί περισσότερες από μία φορές σε κάθε αναπαραγωγική περίοδο, όπως και το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) (Micale et al. 1999, Mylonas et al. 2004a), ο ροφός (*Epinephelus marginatus*) (Marino et al. 2003) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Barbaro et al. 1997). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν επίσης και τα συγγενικά spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) (Brown-Peterson et al. 1988) αλλά και το orangemouth corvina (*Cynoscion xanthulus*) (Thomas et al. 1994).

Έπειτα από τη χορήγηση των εμφυτευμάτων πέρασαν δύο ημέρες για την πραγματοποίηση της πρώτης ωοτοκίας εκτός από μία περίπτωση που τα ψάρια ωοτόκησαν για πρώτη φορά 3 ημέρες μετά. Το μυλοκόπι (*Umbrina cirrosa*) ωοτόκησε πρώτη φορά έπειτα από 2 ημέρες (Mylonas et al. 2004b) αλλά και η ρέγκα (*Alosa sapidissima*) σε ίδιο χρονικό διάστημα (Mylonas et al. 1995), ενώ το γραμμωτό λαβράκι (*Morone saxatilis*) ωοτόκησε 1,5-3,4 ημέρες έπειτα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος και το μαγιάτικο 1,5 ημέρες μετά (Mylonas et al. 2004a). Το λαβράκι χρειάστηκε περισσότερο χρόνο συγκριτικά με τα προαναφερθέντα είδη για την πρώτη ωοτοκία καθώς αυτή πραγματοποιήθηκε 3-4 ημέρες μετά (Mylonas et al. 2003b). Η διαφορά αυτή οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες στις οποίες ωοτοκεί το κάθε είδος, επιδρώντας στο ρυθμό μεταβολισμού των ορμονών (Crim et al. 1988, Zohar et al. 1995). Χαρακτηριστικά, το λαβράκι ωοτοκεί τους μήνες με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες (Ιανουάριο – Φεβρουάριο)

(Mayer et al. 1990) ενώ ο κρανιός στη φύση φαίνεται να αναπαράγεται από τον Ιούνιο έως τα μέσα Ιουλίου (Lagardère and Mariani 2006) όπου οι θερμοκρασίες είναι σαφώς πιο αυξημένες.

Οι κρανιοί έπειτα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος GnRHα απελευθέρωσαν αυγά καλής ποιότητας με καλά επίπεδα γονιμότητας (365.000 ± 107.000 eggs kg^{-1}) και με ποσοστό γονιμοποίησης $85 \pm 2\%$. Συγκεκριμένα απελευθέρωσαν αυγά υψηλότερης γονιμότητας από το μαγιάτικο (Mylonas et al. 2004a) το γραμμωτό λαβράκι (Mylonas et al. 1996) και τη ρέγκα (Mylonas et al. 1995) αλλά το συγγενικό μυλοκόπι (Mylonas et al. 2004b) και το λαβράκι (Mylonas et al. 2003b) παρουσίασαν υψηλότερη γονιμότητα από τον κρανιό. Σε πολύ υψηλά επίπεδα κυμάνθηκε και το ποσοστό γονιμοποίησης, καθώς ο μέσος όρος εκτιμήθηκε στο $85 \pm 2\%$. Έτσι, ο κρανιός φαίνεται να παράγει αυγά υψηλότερου ποσοστού γονιμοποίησης από το μαγιάτικο (Mylonas et al. 2004a), το μυλοκόπι (Mylonas et al. 2004b), αλλά και τη ρέγκα (Mylonas et al. 1995) και σε παρόμοια επίπεδα με το λαβράκι (Mylonas et al. 2003b) και το γραμμωτό λαβράκι (Mylonas et al. 1996). Έπειτα από τη χορήγηση της GnRHα το $78 \pm 8\%$ του συνόλου των αυγών απελευθερώθηκε κατά τις πρώτες τέσσερις ωοτοκίες, που πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις διαδοχικές ημέρες. Έπειτα από παύση ορισμένων ημερών οι ωοτοκίες συνεχίστηκαν με μειωμένη όμως γονιμότητα. Δύο υποθέσεις θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν το φαινόμενο αυτό. Το πρώτο ενδεχόμενο είναι το μεγαλύτερο ποσοστό της γονιμότητας να παρατηρείται στην πρώτη ή πρώτες ωοτοκίες ενώ οι υπόλοιπες να έχουν συγκριτικά χαμηλότερη γονιμότητα. Αυτό έχει παρατηρηθεί στο λαβράκι που η πρώτη ωοτοκία (από σύνολο 3-4) περιλαμβάνει το 50% της ετήσιας γονιμότητας (Mylonas et al. 2003b). Εναλλακτικά, μπορεί τα πιο πολλά θηλυκά να γέννησαν μόνο κατά τις τέσσερις πρώτες ημέρες μετά την επέμβαση με GnRHα, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος της γονιμότητας να εμφανίζεται στις τέσσερις πρώτες ωοτοκίες κάθε θεραπείας. Τις επόμενες ημέρες μόνο κάποια από τα θηλυκά γέννησαν, με αποτέλεσμα χαμηλότερη γονιμότητα. Στην τσιπούρα, είδος με ασύγχρονη ωογένεση και ημερήσια ωοτοκία για περίοδο 3-4 μηνών, ο αριθμός των θηλυκών που γεννούν για περισσότερες από 2-4 ημέρες μετά από ορμονική χορήγηση (ένεση ή εμφύτευμα GnRHα) μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετικός, με αποτέλεσμα η γονιμότητα να είναι πιο μεγάλη τις πρώτες ημέρες μετά την ορμονική επέμβαση (Zohar et al. 1995).

Τα αποτελέσματα, από την εκτίμηση της ποιότητας των αυγών της παρούσας μελέτης κρίνονται ικανοποιητικά εν συγκρίσει με άλλα πελαγικά είδη. Τα ποσοστά

εκκόλαψης φαίνεται να είναι παρόμοια με αυτά του σαργού (*Diplodus sargus*) και του μυλοκοπιού (Mylonas et al. 2004b) αλλά ελαφρώς μειωμένα σε σύγκριση με αυτά του λαυρακιού (Mylonas et al. 2003b) και της τσιπούρας. Επίσης, τα αποτελέσματα επιβίωσης την τέταρτη ημέρα μετά την ωοτοκία ήταν χαμηλότερα σε σχέση με αυτά του λαυρακιού, παρόμοια με αυτά της τσιπούρας και του μυλοκοπιού (Mylonas et al. 2004b) και σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά του σαργού (Panini et al. 2002).

Στα αρσενικά άτομα η χρήση εμφυτευμάτων GnRHα φαίνεται ότι αύξησε τόσο την ποιότητα (Clearwater and Crim 1998, Rainis et al. 2003, Vermeirssen et al. 2000) όσο και την ποσότητα του παραγόμενου σπέρματος (Mylonas et al. 1997b, Sorbera et al. 1996). Από τα αρσενικά άτομα που υποβλήθηκαν σε ορμονική θεραπεία η πυκνότητα του σπέρματος φαίνεται να είναι κοντά σε αυτή του turbot (*Scophthalmus maximus*), του υπόγλωσσου (*Hippoglossus hippoglossus*), του λαυρακιού (Suquet et al. 1994) και του μυλοκοπιού (Mylonas et al. 2004b) αλλά χαμηλότερη από τα συγγενικό Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) (Suquet et al. 1994). Το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων ήταν αρκετά υψηλό σε σύγκριση με άλλα πελαγικά είδη (Suquet et al. 1994) και παρόμοιο με αυτό του συγγενικού μυλοκοπιού (Mylonas et al. 2004b). Η κινητικότητα του σπέρματος διαρκεί σχετικά λιγότερο σε σύγκριση με άλλα πελαγικά ψάρια αλλά σε παρόμοιο χρόνο με το Atlantic halibut (Suquet et al. 1994) καθώς και το μυλοκόπι (Mylonas et al. 2004b). Σε γενικές γραμμές ο κраниός παράγει σπέρμα καλής ποιότητας με πυκνότητα σε φυσιολογικά επίπεδα και ποσοστό κινητικότητας αρκετά υψηλό.

Φάνηκε λοιπόν ότι ο κраниός ανταποκρίνεται θετικά στη χρήση εμφυτευμάτων GnRHα και η ορμονική δυσλειτουργία που ευθύνεται για την αποτυχία της αναπαραγωγής προφανώς επιδιορθώνεται με την χρήση των εμφυτευμάτων GnRHα. Οι παραγόμενοι γαμέτες που απελευθερώθηκαν από τους θηλυκούς αλλά και από τους αρσενικούς κраниούς ήταν καλής ποιότητας και ικανοί να στηρίζουν μία βιώσιμη παραγωγή. Έπειτα από την πρώτη χρονιά χρήσης των εμφυτευμάτων το ερώτημα που προέκυψε ήταν ποια είναι η αιτία της αυξημένης γονιμότητας στις πρώτες ωοτοκίες έπειτα από τη χορήγηση της ορμόνης.

Οι θηλυκοί κраниοί ωοτοκούσαν για περίπου 20 ημέρες και οι ωοτοκίες ξεκίνησαν σε όλες τις περιπτώσεις δύο μέρες έπειτα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε άγριους κраниούς η πρώτη ωοτοκία έγινε τρεις ημέρες μετά τη

χορήγηση του εμφυτεύματος (Duncan et al. 2008). Επίσης, ο αριθμός των ωοτοκίων αλλά και το ποσοστό γονιμοποίησης κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα σε αντίθεση με την γονιμότητα που εμφανίστηκε σαφώς αυξημένη στην παρούσα μελέτη.

Ιδιαίτερη βάση αξίζει να δοθεί στην διακύμανση της γονιμότητας αλλά και την σταθερότητα του ποσοστού γονιμοποίησης. Το ποσοστό γονιμοποίησης παρέμεινε σταθερά υψηλό, πάνω από 57% κατά την διάρκεια όλων των ωοτοκίων και στα έξι άτομα. Αντίθετα, η γονιμότητα παρουσίασε διακυμάνσεις, με το μέγιστο να μην εμφανίζεται στην πρώτη ωοτοκία όπως θα συνέβαινε πιθανόν με χρήση ενέσιμης μορφής (Forniés et al. 2001). Η πρώτη ωοτοκία φαίνεται μειωμένη εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες ενώ στη συνέχεια η γονιμότητα αυξήθηκε και έφτασε στο μέγιστο στην 3-4 ωοτοκία. Όσο συνεχίζονται οι ωοτοκίες η γονιμότητα μειώνεται μέχρι την τελική τους παύση. Παρόμοια εικόνα έδειξαν και άλλα είδη όπως το λαβράκι (Forniés et al. 2001), στο οποίο έχουν πραγματοποιηθεί ατομικά πειράματα πρόκλησης της αναπαραγωγής. Διαφορετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ομαδικές προκλήσεις αναπαραγωγής, όπως στο μαγιάτικο (Mylonas et al. 2004a) και τη γλώσσα της Σενεγάλης (*Solea senegalensis*) (Agulleiro et al. 2006) όπου παρουσιάζεται διακύμανση και στο ποσοστό γονιμοποίησης.

Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της πρώτης χρονιάς τα ψάρια που μετείχαν στα ατομικά πειράματα απελευθέρωσαν γαμέτες καλύτερης ποιότητας, τόσο από άποψη γονιμότητας, όσο και ποσοστού γονιμοποίησης. Φαίνεται λοιπόν ότι από την μεταφορά ψαριών από μεγαλύτερες κοινωνικές δεξαμενές σε μικρότερες με λίγα ψάρια η αναπαραγωγική διαδικασία στα θηλυκά άτομα δεν επηρεάστηκε αρνητικά όπως αντίθετα έχει παρατηρηθεί στο λαβράκι (Forniés et al. 2001). Διαφορετική άποψη επικρατεί για τα αρσενικά άτομα όπου η μεταφορά αυτή επηρέασε αρνητικά την αναπαραγωγική λειτουργία όπως έχει καταγραφεί και στο γραμμωτό λαβράκι (Mylonas et al. 1998b).

Συμπερασματικά, ο κρانيός έπειτα από χορήγηση εμφυτεύματος GnRHα ωοτοκεί για περίπου 20 ημέρες με συχνότητα ορισμένων ημερών ενώ τα ποσοστά γονιμοποίησής του κυμαίνονται σε υψηλά και σταθερά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια των ωοτοκίων. Τόσο η επιτυχία της ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας όσο και οι καλής ποιότητας γαμέτες που παράχθηκαν αποτελούν θετικά στοιχεία για την εμπορική εκτροφή των ψαριών του είδους αυτού.

4. Συμπεράσματα

Ο κρανιός είναι ένα είδος που δεν αναπαράγεται αυθόρμητα σε συνθήκες αιχμαλωσίας αλλά παρόλα αυτά ολοκληρώνει με επιτυχία τη διαδικασία της λεκιθογένεσης. Κατά την ανάλυση των βιοψιών αλλά και έπειτα από την ιστολογική εξέταση παρατηρήθηκαν πρωτογενή ωοκύτταρα, ωοκύτταρα σε φάση φλοιϊκών κυστιδίων αλλά και λεκιθικά ωοκύτταρα γεγονός που επιβεβαίωσε ότι ο κρανιός είναι πολυεναποθέτης, όπως και τα άλλα συγγενικά του είδη καθώς ωοτοκεί περισσότερες από μία φορές σε κάθε αναπαραγωγική περίοδο. Τα ψάρια φαίνεται ότι είχαν ολοκληρώσει τη λεκιθογένεση και διατηρούσαν τα λεκιθικά ωοκύτταρα από τον Μάιο έως τον Ιούνιο σε θερμοκρασία 17-24°C. Τα αρσενικά άτομα ήταν σπερμιάζοντα από τον Μάρτιο έως τον Ιούνιο. Άρα, πιθανότατα ο κρανιός τους μήνες Μάιο και Ιούνιο είναι ικανός για αναπαραγωγή, αλλά δεν αναπαράγεται σε συνθήκες εκτροφής. Τα ωοκύτταρα των θηλυκών ατόμων ήταν καλής ποιότητας (μέγεθος, σχήμα) και το σπέρμα που συλλέχτηκε από τα αρσενικά κρίνεται επίσης ποιοτικά ικανοποιητικό. Η πυκνότητα και η κινητικότητα του κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα με άλλα θαλασσινά ψάρια, ενώ η διάρκεια της κινητικότητας καθώς και η βιωσιμότητά του στους 4°C (δεν παρουσιάζονται δεδομένα) παρουσιάστηκαν ελαφρώς μειωμένα σε σχέση με άλλα είδη. Η ορμονική ανάλυση των στεροειδών ορμονών που πραγματοποιήθηκε δεν συμφωνεί με την ιστολογική ανάλυση στις γονάδες των θηλυκών κρανιών αλλά συμφωνεί με την παρουσία ή απουσία σπέρματος των αρσενικών. Η μη απελευθέρωση της LH πιθανόν να είναι υπεύθυνη για την ορμονική δυσλειτουργία που οδηγεί σε αποτυχία της αναπαραγωγής καθώς έπειτα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος GnRHα ολοκληρώθηκε η ωρίμανση και οι κρανιοί αναπαράχθηκαν.

Για να ξεκινήσει και να ολοκληρωθεί η γαμετογένεση θα πρέπει να ακολουθηθεί συγκεκριμένο πρωτόκολλο διαχείρισης των γεννητόρων. Η φωτοπερίοδος πρέπει να ακολουθεί φυσική διακύμανση, τυπική Μεσογειακού περιβάλλοντος. Από τον Φεβρουάριο θα πρέπει να χορηγείται εκτός από την βιομηχανοποιημένη τροφή και αποψυγμένο καλαμάρι καθώς τον Μάρτιο, ξεκινά η λεκιθογένεση και οι απαιτήσεις των ψαριών σε θρεπτικά αυξάνονται. Παρόλο που τα αρσενικά άτομα ήταν σπερμιάζοντα από τον Μάρτιο τα θηλυκά ήταν σε φάση πλήρους λεκιθογένεσης από τον Μάιο και μετά. Έτσι κρατώντας την θερμοκρασία στους 17-24°C υπήρχαν λεκιθικά ωοκύτταρα για δύο μήνες (Μάιος – Ιούνιος) έχοντας διάμετρο περίπου 560 μm. Σε αυτό το χρονικό σημείο υπάρχει η δυνατότητα χορήγησης εμφυτευμάτων GnRHα. Και τους δύο μήνες η γονιμότητα αλλά και

η ποιότητα των γαμετών ήταν εξίσου καλή. Έπειτα από τη χορήγηση η πρώτη πραγματοποιήθηκε δύο ημέρες μετά και στη συνέχεια έπειτα από παύση λίγων ημερών οι ωοτοκίες συνεχίζονταν με συχνότητα ορισμένων ημερών. Αναμένονται περίπου 42500 ± 13000 eggs kg^{-1} spawn $^{-1}$ με ποσοστό γονιμοποίησης $91 \pm 4\%$ αλλά κατά τη διάρκεια ολόκληρης της αναπαραγωγικής περιόδου δεν παράχθηκαν περισσότερα από 435000 ± 199000 eggs kg^{-1} . Αξίζει να σημειωθεί ότι περίπου το $72 \pm 17\%$ των αυγών απαλευθρώθηκε στις 4 πρώτες ωοτοκίες.

Η μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου καθώς και μέρους των ορμονών έδωσαν απάντηση σε βασικά ερωτήματα για την αναπαραγωγή του είδους. Επίσης, η επιτυχία της ορμονικής πρόκλησης γαμετοτοκίας και οι καλής ποιότητας γαμέτες που παράχθηκαν αποτελούν θετικά στοιχεία για την εμπορική εκτροφή του κρانيού.

5. Παραρτημα

5.1 CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

Το CASA πρωτοχρησιμοποιήθηκε περίπου 30 χρόνια πριν σε σπέρμα ανθρώπου, στην προσπάθεια των Jecht και Russo να αναπτύξουν μία μεθοδολογία ποσοτικοποίησης της ποιότητας του σπέρματος (Amann and Katz 2004). Η έλλειψη υψηλής τεχνολογίας αλλά και το υψηλό κόστος επηρέασε σε σημαντικό βαθμό την ποιότητα αυτής της προσπάθειας. Η τεχνογνωσία αυτή πέρασε και στην επιστήμη της αναπαραγωγής των ψαριών την τελευταία δεκαετία (Kime et al. 2001). Η λειτουργία του συστήματος στηρίζεται στην οπτικοποίηση και ψηφιοποίηση εικόνων σπέρματος για την παραγωγή αποτελεσμάτων σχετικών με τις κινηματικές ιδιότητες του σπέρματος (Amann and Katz 2004).

5.2 Συλλογή δειγμάτων σπέρματος

Τα αρσενικά άτομα υποβάλλονται σε μερική αναισθησία με γαρυφαλέλαιο (0,015 ml l^{-1}) και στη συνέχεια σε νέα δεξαμενή σε πλήρη αναισθησία (0,03 ml l^{-1}). Απομακρύνοντας το ψάρι από το νερό η κοιλιακή χώρα πλένεται σχολαστικά με γλυκό νερό και στη συνέχεια απομακρύνεται κάθε είδους υγρασία. Με απαλή μάλαξη στην κοιλιακή χώρα γίνεται λήψη του σπέρματος (~1ml) το οποίο συλλέγεται με ειδική πιπέτα (positive displacement pipette). Το σπέρμα φυλάσσεται αμέσως σε eppendorf και σε θερμοκρασία 4°C.

5.3 Παρασκευή διαλυμάτων

Για την σωστή ανάλυση του σπέρματος μέσω του CASA απαιτείται η αραιώσή του. Πραγματοποιούνται δύο αραιώσεις, μια με non-activating medium (NAM: NaCl: 3,5 g l^{-1} , KCl: 0,11 g l^{-1} , MgCl₂: 1,23 g l^{-1} , CaCl₂: 0,39 g l^{-1} , NaHCO₃: 1,68 g l^{-1} , glucose: 0,08 g l^{-1} , osmotic pressure=310 mOsm kg^{-1} , pH=7,7) και μία με θαλασσινό νερό και Bovine serum albumin (BSA=10 mg ml^{-1}).

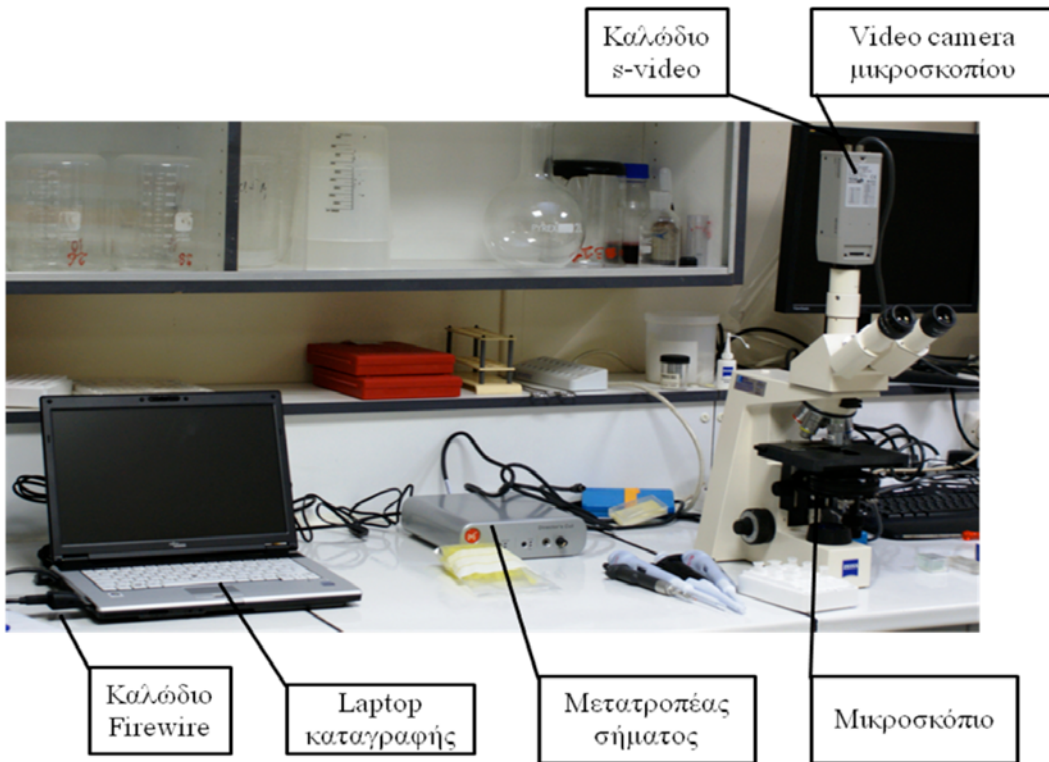
Στην πρώτη αραιώση: 5μl σπέρμα με 100μl NAM (αραιώση 21 φορές)

5μl από την πρώτη αραιώση με 1000μl BSA (αραιώση 201 φορές)

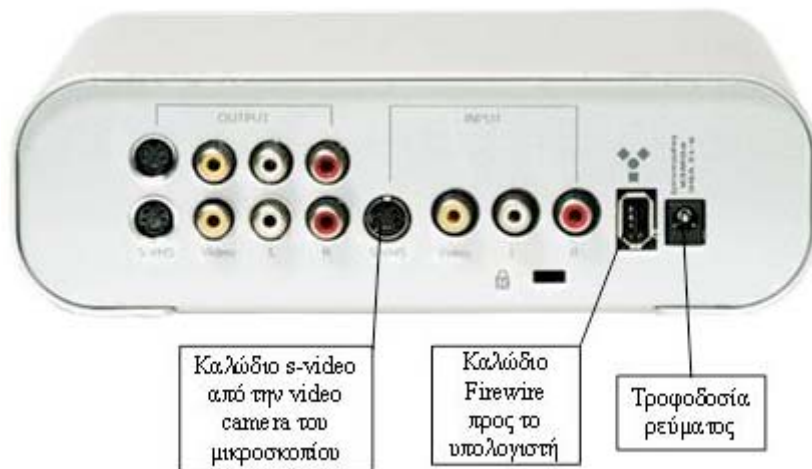
Συνολική αραιώση: 4221 φορές

5.4 Ηλεκτρονικός και λοιπός εξοπλισμός

Για την λήψη του video χρησιμοποιήθηκε video camera Sony SSC-DC58AP καθώς και μετατροπέας σήματος, από αναλογικό σε ψηφιακό, Miglia directors cut. Η camera ήταν τοποθετημένη σε μικροσκόπιο Nikon και χρησιμοποιήθηκε φακός Nikon X40. Η αποθήκευση του video πραγματοποιήθηκε σε laptop της Fujitsu Siemens με χρήση των Virtual dub και imaje j +plug-in (Εικόνα 1,2).



Εικόνα 1: Συνδεσμολογία για CASA



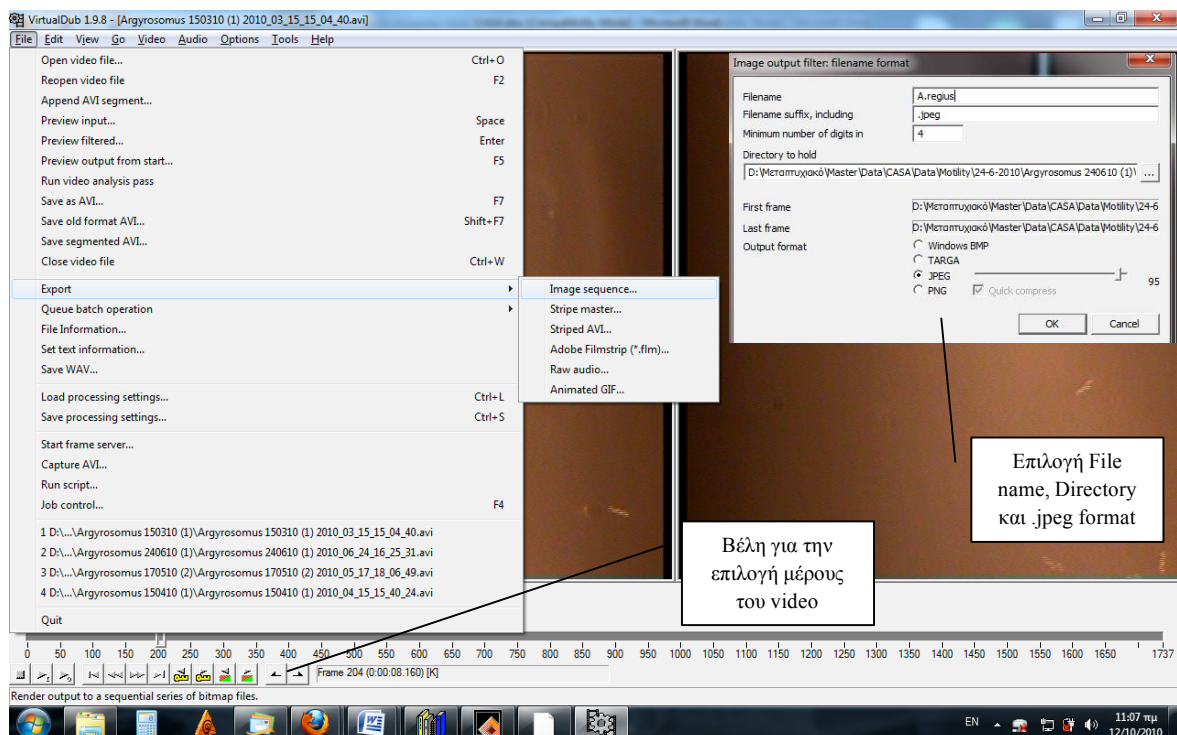
Εικόνα 2: Συνδεσμολογία μετατροπέα σήματος

5.5 Μέτρηση της κινητικότητας του σπέρματος μέσω CASA

Virtual dub

Αρχικά πρέπει να πραγματοποιηθεί λήψη και αποθήκευση του video σε μορφή .avi. Με χρήση του προγράμματος Virtual dub ανοίγουμε το .avi αρχείο και επιλέγουμε με τα βελάκια το κομμάτι από το video στο οποίο έχουμε καλή εστίαση και υψηλή κίνηση των σπερματοζωαρίων (Εικόνα 3).

File→Export→Image sequence και επιλέγουμε File name, Directory και .jpeg format.



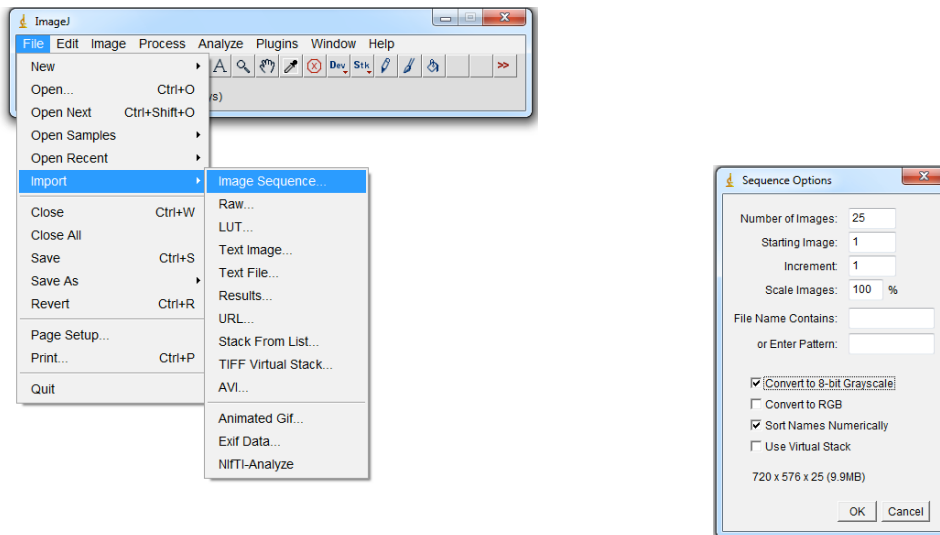
Εικόνα 3: Virtual dub

Image j

Ανοίγουμε την image sequence που αποθηκεύσαμε με το virtual dub.

File→Import→Image sequence (Επιλέγουμε το πρώτο αρχείο από το φάκελο) (Εικόνα 4).

Sequence options:



Εικόνα 4: Image j. Εισαγωγή image sequence

Images= 25 (1sec)

Convert to 8-bit grayscale (Εικόνα 4)

Στη συνέχεια τροποποιούμε τις εικόνες:

Image→Adjust→Brightness/Contrast:

Επιλέγουμε Full contrast

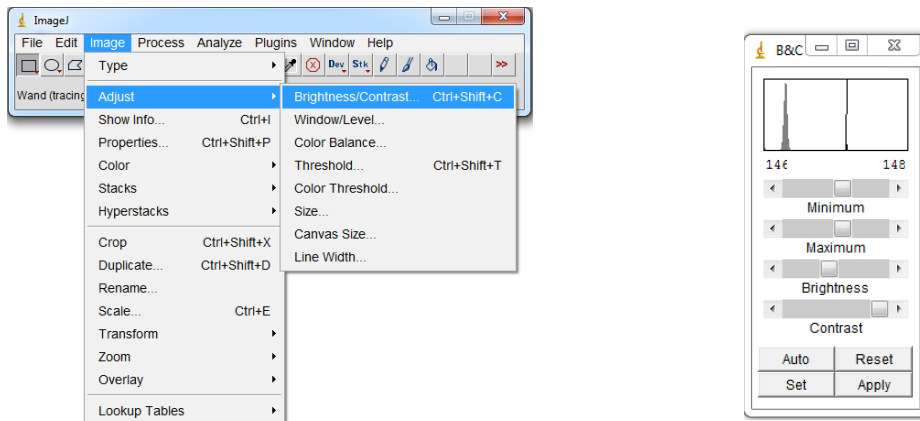
Ρυθμίζουμε το Brightness έτσι ώστε να φαίνονται μόνο τα σπερματοζώαρια (Εικόνα 5)

Image→Adjust→Threshold:

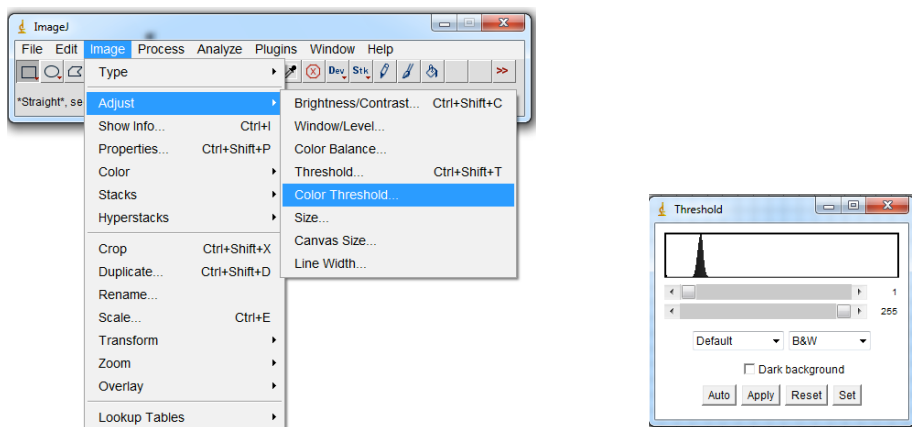
Η κάτω μπάρα στο 255

Η επάνω στο 1

Apply, OK (Εικόνα 6)



Εικόνα 5: Image j. Μορφοποίηση Brightness/Contrast



Εικόνα 6: Image j. Μορφοποίηση threshold

Plugins→CASA→CASA

Στο Sperm tracker επιλέγουμε

Minimum sperm size (pixels): 10 (εξαρτάται από το video)

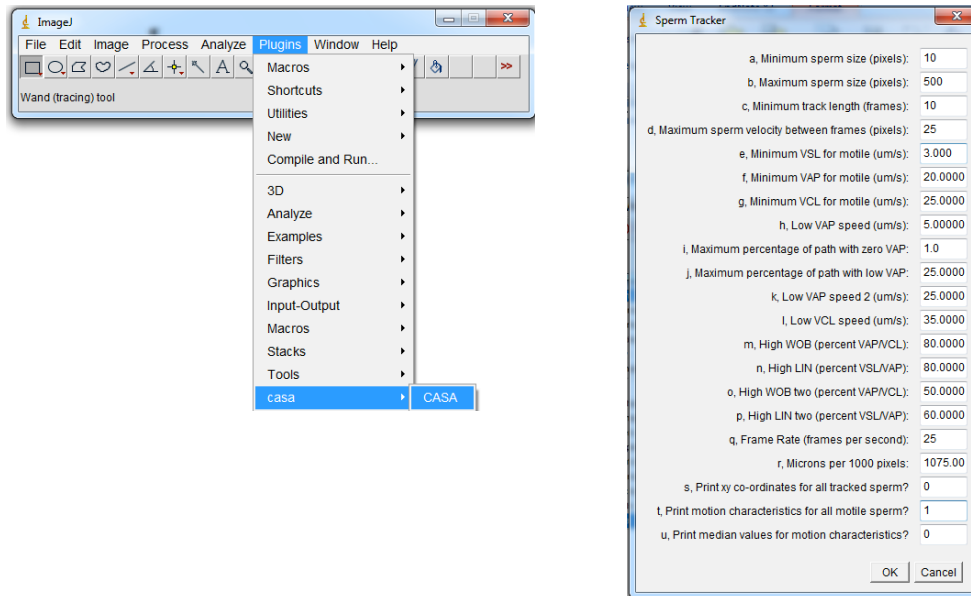
Maximum sperm size (pixels): 500 (εξαρτάται από το video)

Minimum track length (frames): ~10

Maximum sperm velocity between frames: 25

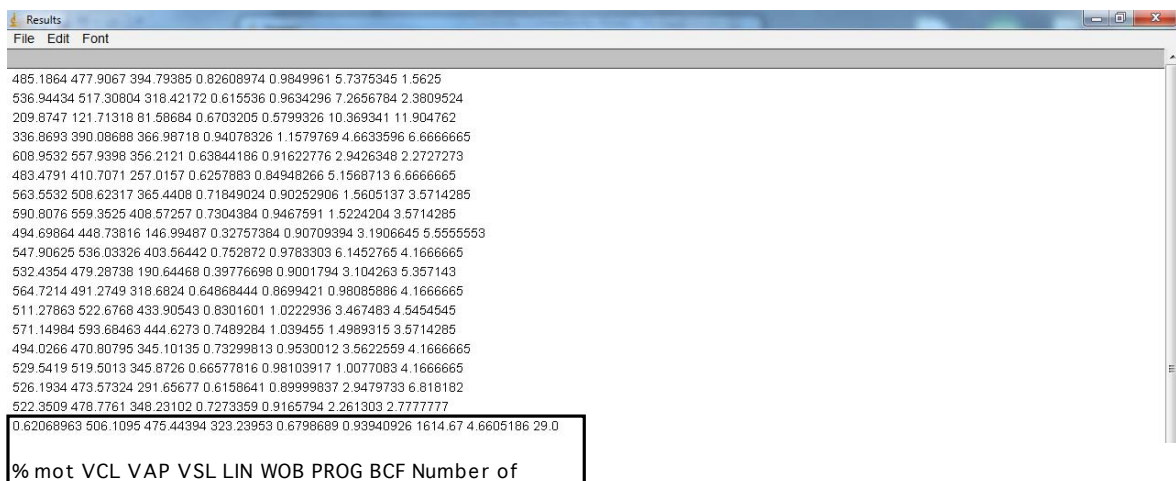
Frame rate (frame per second): 25

Print motion characteristics for all motion sperm: 1 (Εικόνα 7)



Εικόνα 7: Image j. Ρύθμιση παραμέτρων CASA

Στα αποτελέσματα οι τιμές αναφέρονται στις βασικότερες παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων (%mot, VCL, VAP, VSL, LIN, NST) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 Image j. Αποτελέσματα CASA

Όπου:

Percent motility: Percent of tracked sperm identified by the plugin as exhibiting motility during the 1 s period of analysis.

Velocity curvilinear (VCL): The total point to point distance traveled by the sperm over the time period analyzed averaged to a per second value.

Velocity average path (VAP): Velocity over an average path, generated by a roaming average of sperm position from one-sixth of the video's frame rate, such that each point is generated by averaging the coordinates of a set number of locations on the

VCL path (using 97 fps, the location of a sperm in 16 frames are averaged to generate one VAP point and the first VAP point represents frames 1–16, the second point frame 2–17); averaged to a per second value.

Velocity straight line (VSL): The maximum distance moved on the VAP path by the sperm from the first VAP point during in the video segment analyzed, calculated to a per second value based on the number of frames for which VAP points were calculated.

Linearity (LIN) A measure of path curvature determined by dividing VSL by VAP.

Straightness (STR): A measure of VCL side to side movement determined by dividing VAP by VCL.

6. Βιβλιογραφία

- Agulleiro MJ, Anguis V, Cañavate JP, Martínez-Rodríguez G, Mylonas CC, Cerdà J. 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257: 511-524.
- Amann RP, Katz DF. 2004. Reflections on CASA After 25 Years. *J Androl* 25: 317-325.
- Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E. 2007. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. The Netherlands: Springer.
- Barbaro A, Francescon A, Bozzato G, Merlin A, Belvedere P, Colombo L. 1997. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture* 154: 349-359.
- Battaglione SC, Talbot RB. 1994. Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture* 126: 73-81.
- Bennett HS, Wyrick AD, Lee SW, McNeil JH. 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stains. *Stain Technology* 51: 71-94.
- Berlinsky DL, Specker JL. 1991. Changes in gonadal hormones during oocyte development in the striped bass, *Morone saxatilis*. *Fish Physiology and Biochemistry* 9: 51-62.
- Berlinsky DL, Jackson LF, Smith TIJ, Sullivan CV. 1995. The Annual Reproductive Cycle of the White Bass *Morone chrysops*. *Journal of the World Aquaculture Society* 26: 252-260.
- Berlinsky DL, William K, Hodson RG, Sullivan CV. 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 28: 79-86.

- Berois N, Bolatto C, Brauer MM, Barros C. 2004. Gametogenesis, histological gonadal cycle and in vitro fertilization in the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823). *Journal of Applied Ichthyology* 20: 169-175.
- Billard R, Cosson MP. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *The Journal of Experimental Zoology* 261: 122-131.
- Borg B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 109: 219-245.
- Bromage NR, Roberts RJ. 1995. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford: Blackwell Science.
- Brooks S, Tyler CR, Sumpter JP. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 387-416.
- Brown-Peterson N, Thomas P, Arnold CR. 1988. Reproductive biology of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, in South Texas. *Fishery Bulletin* 86: 373-388.
- Cabral, N. H, Ohmert, Barbara. 2001. Diet of juvenile meagre, *Argyrosomus regius*, within the Tagus estuary. Roscoff, France: Ed. de la station biologique.
- Carragher JF, Pankhurst NW. 1993. Plasma levels of sex steroids during sexual maturation of snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae), caught from the wild. *Aquaculture* 109: 375-388.
- Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerda J, Ramos J, Mañanos E, Bromage N. 1995. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Pages 138-168 in Bromage NR, Roberts RJ, eds. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford: Blackwell Science.
- Chang JP, Jobin RM. 1994. Regulation of gonadotropin release in vertebrates: a comparison of GnRH mechanisms of action. Pages 41-51 in Davey KG, Peter RE, Tobe SS, eds. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada.

- Chatzifotis S, Panagiotidou M, Papaioannou N, Pavlidis M, Nengas I, Mylonas CC. 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture* 307: 65-70.
- Chauvaud L, Cosson J, Suquet M, Billard R. 1995. Sperm motility in turbot, (*Scophthalmus marimus*) initiation of movement and changes with time of swimming characteristics. *Environmental Biology of Fishes* 43: 341-349.
- Clearwater SJ, Crim LW. 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 19: : 349-357.
- Crim LW, Evans DM. 1979. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology* 37: 192-196.
- Crim LW, Bettles S. 1997. Use of GnRH analogues in fish culture. Pages 369-382 in Fingerman M, Nagabhushanam R, Thompson MF, eds. *Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 1: Endocrinology and Reproduction*. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co.
- Crim LW, Sherwood NM, Wilson CE. 1988. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 74: 87-95.
- Cuisset B, Pradelles P, Kime DE, Kühn ER, Babin P, Davail S, Le Menn F. 1994. Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 108: 229-241.

- Donaldson EM. 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science* 42: 381-392.
- Duncan N, Estevez A, Padros F, Aguilera C, Montero FE, Norambuena F, Carazo I, Carbo R, Mylonas CC. 2008. Acclimation to captivity and GnRHa-induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). *Cybium* 32: 332-333.
- El-Shebly AA. 2005. Studies on growth and production of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in brackish water fish farms. *J. Egypt. Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development* 6: 19-30.
- El-Shebly AA, Siliem NA. 2003. Studies on growth and production of sea bream *Sparus aurata* in brackish water fish farms. *Bulletin national institute of oceanography and fisheries A.R.E.* 29: 267-279.
- EL-Shebly AA, El-Kady MAH, Hussin AB, Y.Hossain M. 2007. Preliminary observations on the pond culture of Meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Scianidae) in Egypt. *Journal of fisheries and aquatic science* 5: 345-352.
- Fasano P, Zilli L, Vilella S, Comparata LDF. 2006. Assessing genetics diversity of a *Argyrosomus regius* stock using amplified fragment length polymorphism analysis. Paper presented at Aqua 2006, Italy.
- Fauvel C, Savoye O, Dreanno C, Cosson J, Suquet M. 1999. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology* 54: 356-369.
- Fish MP, Mowbray WH. 1970. *Sounds of western North Atlantic fishes*. Baltimore: Johns Hopkins Press.
- Forniés MA, Mañanós E, Carrillo M, Rocha A, Laureau S, Mylonas CC, Zohar Y, Zanuy S. 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 202: 221-234.

- Garcia LMB. 1993. Sustained production of milt in rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, by weekly injection of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa). *Aquaculture* 113: 261-267.
- Griffiths MH, Heemstra PC. 1995. A contribution to the taxonomy of the marine fish genus *Argyrosomus* (Perciformes: Sciaenidae), with descriptions of two new species from southern Africa. *Bioline International* 65: 40.
- Guraya SS. 1979. Recent Advances in the Morphology, Cytochemistry, and Function of Balbiani's Vitelline Body in Animal Oocytes. Pages 249-321 in G.H. Bourne JFD, Jeon KW, eds. *International Review of Cytology*, vol. 59 Academic Press.
- Hernández MD, López MB, Álvarez A, Ferrandini E, García García B, Garrido MD. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry* 114: 237-245.
- Holland MC, Mylonas C, Zohar Y. 1996. Sperm Characteristics of Precocious 1-year-old Male Striped Bass *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 27: 208-212.
- Houssay BA. 1930. Accion sexual de la hipofisis en los peces y reptiles. *Revision de la Societa Argentina de la Biologia* 106 686-688.
- Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Tacon AGJ. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197: 25-42.
- Jackson I, Sullivan c. 1995. Reproduction of White Perch: The Annual Gametogenic Cycle. *Transactions of the American Fisheries Society* 124: 563-577.
- Kadmon G, Yaron Z, Gordin H. 1985. Sequence of gonadal events and oestradiol levels in *Sparus aurata* (L.) under two photoperiod regimes. *Journal of Fish Biology* 26: 609-620.
- Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130: 425-433.

- Kjørsvik E, Mangor-Jensen A, Holmefjord I. 1990. Egg Quality in Fishes. Pages 71-113 in Blaxter JHS, Southward AJ, eds. *Advances in Marine Biology*, vol. 26 Academic Press.
- Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. 1987. Hormone changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 67: 24-32.
- Kokokiris L, Mourot B, Le Menn F, Kentouri M, Fostier A. 2000. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei, Sparidae). *Fish Physiology and Biochemistry* 23: 1-11.
- Kokokiris L, Menn, Kentouri, Kagara, Fostier. 2001. Seasonal cycle of gonadal development and serum levels of vitellogenin of the red porgy, (Teleostei: Sparidae). *Marine Biology* 139: 549-559.
- Koldras M, Bieniarz K, Kime DE. 1990. Sperm production and steroidogenesis in testes of the common carp, *Cyprinus carpio* L., at different stages of maturation. *Journal of Fish Biology* 37: 635-645.
- Lagardère JP, Mariani A. 2006. Spawning sounds in meagre *Argyrosomus regius* recorded in the Gironde estuary, France. *Journal of Fish Biology* 69: 1697-1708.
- Lahnsteiner F, Patzner RA. 1998. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. *Journal of Fish Biology* 52: 726-742.
- Lam TJ. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39 11-137.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165: 367-389.
- Lund E, Sullivan C, Place A. 2000. Annual cycle of plasma lipids in captive reared striped bass: effects of environmental conditions and reproductive cycle. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 263-275.

- Marino G, Panini E, Longobardi A, Mandich A, Finoia MG, Zohar Y, Mylonas CC. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219: 841-858.
- Mayer I, Shackley SE, Witthames PR. 1990. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. II. Fecundity and pattern of oocyte development. *Journal of Fish Biology* 36: 141-148.
- Mazorra de Quero C, Shields RJ, Scott AP, Mylonas C, Zohar Y, Bromage N. 2000. Effects of late season GnRHa implants on male Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* spermiation in Flos R, Cresswell L, eds. *Aqua 2000*. Nice, France: European Aquaculture Society.
- Micale V, Perdichizzi F, Santangelo G. 1987. The gonadal cycle of captive white bream, *Diplodus sargus* (L.). *Journal of Fish Biology* 31: 435-440.
- Micale V, Perdichizzi F, Basciano G. 1996. Aspects of the reproductive biology of the sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). I. Gametogenesis and gonadal cycle in captivity during the third year of life. *Aquaculture* 140: 281-291.
- Micale V, Maricchiolo G, Genovese L. 1999. The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerilii* (Risso 1810). I. Oocyte development in captivity. *Aquaculture Research* 30: 349-355.
- Miura T, Miura CI. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 181-186.
- Mylonas C, Zohar Y. 2000. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 463-491.
- Mylonas C, Zohar Y. 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 202: 205-220.

- Mylonas C, Zohar Y. 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. Pages 433-470 in Babin PJ, Cerdá J, Lubzens E, eds. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Mylonas C, Zohar Y. 2009. Controlling reproduction in aquaculture. Pages 1-38 in Burnell G, Allan G, eds. *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Mylonas C, Scott AP, Zohar Y. 1997a. Plasma Gonadotropin II, Sex Steroids, and Thyroid Hormones in Wild Striped Bass (*Morone saxatilis*) during Spermiation and Final Oocyte Maturation. *General and Comparative Endocrinology* 108: 223-236.
- Mylonas C, Papadaki M, Divanach P. 2003a. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research* 34: 1161-1170.
- Mylonas C, Fostier A, Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165: 516-534.
- Mylonas C, Zohar Y, Richardson BM, Minkinen SP. 1995. Induced Spawning of Wild American Shad *Alosa sapidissima* using Sustained Administration of Gonadotropin-Releasing Hormone Analog (GnRHa). *Journal of the World Aquaculture Society* 26: 240-251.
- Mylonas C, Gissis A, Magnus Y, Zohar Y. 1997b. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa-delivery system. *Aquaculture* 153: 301-313.
- Mylonas C, Woods Iii LC, Thomas P, Zohar Y. 1998a. Endocrine Profiles of Female Striped Bass (*Morone saxatilis*) in Captivity, during Postvitellogenesis and Induction of Final Oocyte Maturation via Controlled-Release GnRHa-Delivery Systems. *General and Comparative Endocrinology* 110: 276-289.

- Mylonas C, Magnus Y, Gissis A, Klebanov Y, Zohar Y. 1996. Application of controlled-release, GnRH α -delivery systems in commercial production of white bass X striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. *Aquaculture* 140: 265-280.
- Mylonas C, Magnus Y, Klebanov Y, Gissis A, Zohar Y. 1997c. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *Journal of Fish Biology* 51: 234-250.
- Mylonas C, Zohar Y, L. CW, Thomas P, Schulz RW. 1998b. Hormone Profiles of Captive Striped Bass (*Morone saxatilis*) During Spermiation, and Long-Term Enhancement of Milt Production. *Journal of the World Aquaculture Society* 29: 379-392.
- Mylonas C, Papandroulakis N, Smboukis A, Papadaki M, Divanach P. 2004a. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerilii*) using GnRH α implants. *Aquaculture* 237: 141-154.
- Mylonas C, Sigelaki I, Divanach P, Mananõs E, Carrillo M, Afonso-Polyviou A. 2003b. Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRH α . *Aquaculture* 221: 605-620.
- Mylonas C, Kyriakou G, Sigelaki I, Georgiou G, Stephanou D, Divanach P. 2004b. Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRH α . *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 56: 75-92.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology* 38: 217-229.
- Nash JP, Cuisset BD, Bhattacharyya S, Suter HC, Le Menn F, Kime DE. 2000. An enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for testosterone, estradiol, and 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one using acetylcholinesterase as tracer: application to measurement of diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 355-363.
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Iinuma N, Hirose K. 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 163-169.

- Panini EB, Mylonas* CC, Zanuy S, Carrillo M, Ramos J, Bruce MP. 2002. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. *Aquaculture International* 9: 189-196.
- Pankhurst NW, Carragher JF. 1991. Seasonal endocrine cycles in marine teleosts. Pages 131-135 in Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS, eds. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Sheffield.
- Pastor Garcia E, Grau Jofre A, Massuti Pascual E, Sanchez-Lamadrid A. 2002. Preliminary results of growth of meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) in sea cages and indoor tanks. *Aquaculture Europe* 2002.
- Patiño R, Sullivan C. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 57-70.
- Pavlidis M, Greenwood L, Mourot B, Kokkari C, Le Menn F, Divanach P, Scott AP. 2000. Seasonal Variations and Maturity Stages in Relation to Differences in Serum Levels of Gonadal Steroids, Vitellogenin, and Thyroid Hormones in the Common Dentex (*Dentex dentex*). *General and Comparative Endocrinology* 118: 14-25.
- Peter RE, Yu KL. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 173-197.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, de Mones A, Fostier A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General and Comparative Endocrinology* 78: 361-373.
- Quéméner L, Suquet M, Mero D, Gaignon J-L. 2002. Selection method of new candidates for finfish aquaculture: the case of the French Atlantic, the Channel and the North Sea coasts. *Aquatic Living Resources* 15: 293-302.
- Quero JC, Vayne JJ. 1987. Le maigre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Pisces, Perciformes, Sciaenidae) du Golfe de Gascogne, et des eaux plus septentrionales. Paris, FRANCE: Institut des ches maritimes.

- Rainis S, Mylonas C, Kyriakou Y, Divanach P. 2003. Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture* 219: 873-890.
- Rana K. 1995. Preservation of gametes. Pages 53-75 in Bromage NR, Roberts RJ, eds. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford: Blackwell Science.
- Rinchard J, Kestemont P, Kühn ER, Fostier A. 1993. Seasonal Changes in Plasma Levels of Steroid Hormones in an Asynchronous Fish the Gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *General and Comparative Endocrinology* 92: 168-178.
- Rocha MJ, Arukwe A, Kapoor BG. 2008. *Fish Reproduction*. Enfield, NH, USA: Science Publishers.
- Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. 2000. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiology and Biochemistry* 23: 141-150.
- Roo J, Hernández-Cruz CM, Borrero C, Schuchardt D, Fernández-Palacios H. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302: 82-88.
- Schulz RW, Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 43-56.
- Schulz RW, de França LR, Lareyre J-J, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 390-411.
- Selman K, Wallace RA. 1986. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *American Zoologist* 26 173-192.
- Serif SS, Mohamed SA, Mahmoud AS. 2009. Meagre, a new candidate in Egyptian aquaculture. *Aquaculture europe* 34: 13-17.

- Sorbera LA, Mylonas C, Zanuy S, Carillo M, Zohar Y. 1996. Sustained administration of GnRH α increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. *The Journal of Experimental Zoology* 276: 361-368.
- Sulistyo I, Fontaine P, Rinchard J, Gardeur J-N, Migaud H, Capdeville B, Kestemont P. 2000. Reproductive cycle and plasma levels of steroids in male Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources* 13: 99-106.
- Suquet M, Billard R, Cosson J, Dorange G, Chauvaud L, Mugnier C, Fauvel C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources* 7: 283-294.
- Suwa K, Yamashita M. 2007. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. Pages 323-347 in Babin PJ, Cerdá J, Lubzens E, eds. *The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Thomas P, Copeland PA, Prentice JA. 1994. Preliminary Observations on the Reproductive Physiology of Female Orangemouth Corvina in Captivity. *Journal of the World Aquaculture Society* 25: 214-224.
- Tyler CR, Sumpter JP. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287-318.
- Tyler CR, Sumpter JP, Campbell PM. 1991. Uptake of vitellogenin into oocytes during early vitellogenic development in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* 38: 681-689.
- Utoh T, Okamura A, Yamada Y, Tanaka S, Mikawa N, Akazawa A, Horie N, Oka HP. 2004. Reproductive cycle in reared male common Japanese conger, *Conger myriaster*. *Aquaculture* 240: 589-605.
- Vermeirssen ELM, Shields RJ, Mazorra de Quero C, Scott AP. 2000. Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 77-87.

- Wagner E, Arndt R, Hilton B. 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* 211: 353-366.
- Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E. 1986. *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Paris: Unesco.
- Zohar Y. 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations. Pages 47-62 in Zohar Y, Breton B, eds. *Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. Paris: INRA Press.
- Zohar Y. 1989. Endocrinology and fish farming: Aspects in reproduction, growth, and smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry* 7: 395-405.
- Zohar Y, Mylonas C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.
- Zohar Y, Harel M, Hassin S, Tandler A. 1995. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Pages 94-117 in Bromage NR, Roberts RJ, eds. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford: Blackwell Science.
- Παπουτσόγλου ΣΕ. 1998. Ορμονικά συστήματα ιχθύων. Pages 85-420. *Ενδοκρινολογία ιχθύων*. Αθήνα: Αθανάσιος Σταμούλης.

www.fishbase.gr

www.fao.org