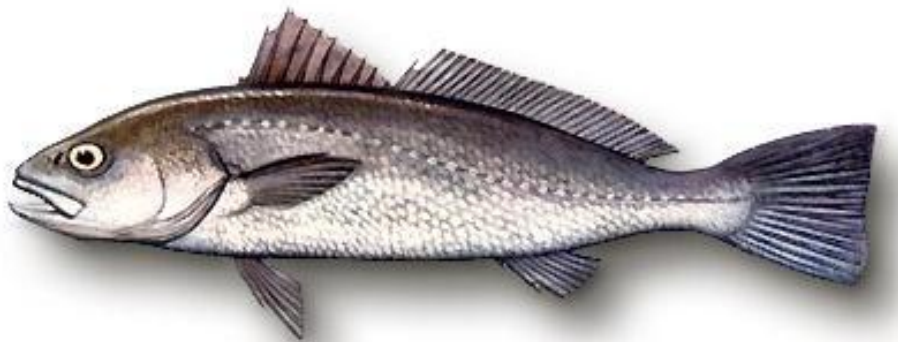




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα: Περιβαλλοντική Βιολογία- Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων

Τίτλος: Συγκριτική πρόκληση φωτοκίας στον κρανίο (*Argyrosomus regius*) με χρήση πολλαπλών ενέσεων ή εμφυτευμάτων GnRHα.



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ευφροσύνη Φατήρα

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Μιχάλης Παυλίδης

Επιβλέπων ερευνητής: Δρ. Κωνσταντίνος Μυλωνάς

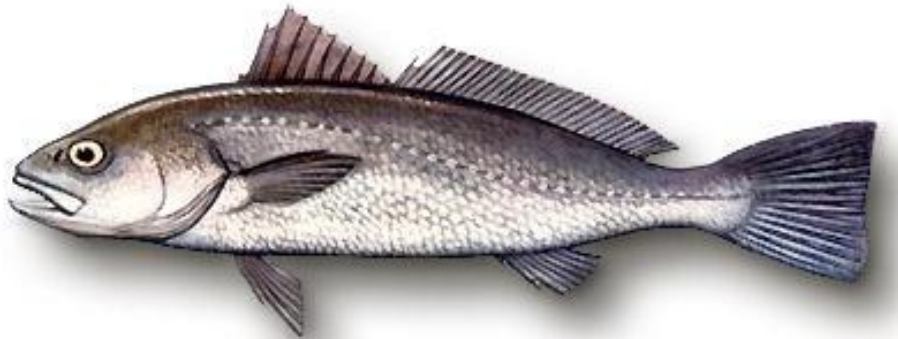
Ηράκλειο, 2013



**UNIVERSITY OF CRETE
BIOLOGY DEPARTMENT**

Master Program: Environmental Biology- Management of Terrestrial and Marine Biological Resources

Dissertation Title: Comparative induction of spawning success in meagre (*Argyrosomus regius*) using GnRH α injections or implants.



Master Thesis

Effrosyni Fatira

Supervisor: Dr. Constadinos Mylonas

Heraklion, 2013

Επιβλέπων:

Κωνσταντίνος Μυλωνάς (Ερευνητής Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών)

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Μαρουδιώ Κεντούρη (Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Μιχαήλ Παυλίδης (Αναπληρωτής καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Κωνσταντίνος Μυλωνάς (Ερευνητής Α, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών)

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013.

Η παρούσα μελέτη υποστηρίχτηκε οικονομικά από το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων, Πολιτισμού και Αθλητισμού (Υ.ΠΑΙ.Θ.Π.Α.) στα πλαίσια του έργου «ΕΘΝΙΚΟ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΟ ΣΧΕΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΕΣΠΑ) 2007-2013, ΔΡΑΣΗ ΕΘΝΙΚΗΣ ΕΜΒΕΛΕΙΑΣ "ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ", ΠΡΑΞΗ 1: Συνεργατικά έργα μικρής και μεσαίας κλίμακας 2007-2013 (KRANIOS, SYN09-24-424)».

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αφιερώνω στους γονείς μου, Μαρίνα και Κώστα και στον αδερφό μου Παύλο, καθώς μόνο εκείνοι γνωρίζουν πόσο πολύ ήθελα να συνεχίσω τις σπουδές μου και με στήριξαν χωρίς δεύτερη σκέψη όλα αυτά τα χρόνια, τόσο ψυχολογικά όσο και οικονομικά. Ήταν πάντα δίπλα μου στις «καλές», αλλά κυρίως στις «κακές» ημέρες μου και με την αμέριστη αγάπη και πίστη τους σε εμένα πάντα μου έδιναν και συνεχίζουν να μου δίνουν δύναμη.

Θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Δρ. Κωνσταντίνο Μυλωνά για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό του και με εμπιστεύτηκε στις δεξαμενές του. Μαζί του αποκόμισα πάρα πολλές γνώσεις, με ενθάρρυνε να δοκιμάσω νέες τεχνικές προτείνοντάς μου να παρακολουθήσω το workshop κρυσυντήρησης γαμετών αλλά και να εξασκήσω την κριτική μου σκέψη. Ο κύριος Ντίνος ήταν πάντα εκεί για εμένα οποιαδήποτε στιγμή τον είχα ανάγκη, και προσπαθούσε να μου περνά κάθε φορά το σωστό τρόπο αντιμετώπισης των θεμάτων, με ηρεμία και λογική. Τον συμβουλευόμουν ακόμα και όταν υποψιαζόμουν ότι αυτά που θα ακούσω δεν θα μου πολυάρεσαν! Τον εκτιμώ και τον σέβομαι σαν επιστήμονα, αλλά κυρίως σαν άνθρωπο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τεχνικό του «wet lab» Ειρήνη Συγκελάκη για την εμπειρία που αποκόμισα στις δεξαμενές με τα ψάρια-γεννήτορες τα οποία μου φάνταζαν αρκετά τρομακτικά μέχρι τότε! Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω την τεχνικό του «dry lab» Μαρία Παπαδάκη, η οποία με βοήθησε πολύ στις αναλύσεις των δεδομένων της παρούσας διατριβής και μου απάντησε χωρίς δισταγμό σε όλες τις ερωτήσεις μου σχετικά με την εγκυμοσύνη!

Καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών δίπλα μου είχα τον καλύτερο φίλο και σύντροφό μου, Νίκο Ψώνη που με βοηθούσε να αντιμετωπίζω οποιαδήποτε αδυναμία μου και να συνειδητοποιώ πολλές φορές τη γκρίνια μου!

Σας ευχαριστώ όλους για την εμπιστοσύνη και την αγάπη που μου δείξατε!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	4
1. Περίληψη	6
1. Abstract.....	7
2. Εισαγωγή	8
2.1 Ιχθυοκαλλιέργεια Κρανιού.....	8
2.2 Αναπαραγωγή Ιχθύων	13
2.2.1 Αναπαραγωγικός κύκλος	13
2.2.2 Ορμονική πρόκληση γαμετοκίας και αναπαραγωγή κρανιού	17
2.3 Στόχοι.....	20
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	21
3.1 Συγκριτική πρόκληση ωοτοκίας με χρήση ενέσεων ή εμφυτευμάτων GnRHα	21
3.1.1 Διαχείριση Γεννητόρων	21
3.1.2 Συλλογή και αξιολόγηση ποιότητας των αυγών.....	31
3.1.3 Στατιστική ανάλυση.....	32
3.2 Περιγραφή ωρίμανσης των ωοκυττάρων	33
4. Αποτελέσματα.....	36
4.1 Συγκριτική πρόκληση ωοτοκίας με χρήση ενέσεων ή εμφυτευμάτων GnRHα	36
4.2 Περιγραφή ωρίμανσης των ωοκυττάρων	55
5. Συζήτηση	61
5.1 Συγκριτική πρόκληση ωοτοκίας με χρήση ενέσεων ή εμφυτευμάτων GnRHα	61
5.2 Περιγραφή ωρίμανσης των ωοκυττάρων	65
6. Βιβλιογραφία	67

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κρυνιός (*Argyrosomus regius*) είναι καινούριο είδος προς εκτροφή στις ιχθυοκαλλιέργειες και παρόλο που έχει επιτευχθεί η εκτροφή του, η αναπαραγωγή του στις ιχθυομονάδες επιτυγχάνεται με την εξωτερική χορήγηση ορμονικών θεραπειών. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύγκριση των δύο ορμονικών θεραπειών, ένεση ή εμφύτευμα GnRHα με σκοπό να επαχθεί η ωοτοκία του αλλά και η μετέπειτα εκτίμηση της ποιότητας των αυγών του. Επιλέχθηκαν τέσσερα θηλυκά και τέσσερα αρσενικά άτομα αρχικού μέσου βάρους (\pm SEM) $7,300 \pm 682$ g και $6,760 \pm 627$ g, αντίστοιχα που προέρχονταν από εκτροφή του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. του έτους 2005. Στα θηλυκά άτομα ανά δύο χορηγήθηκαν οι θεραπείες με ενέσεις ($n=5$) και εμφυτεύματα GnRHα ($n=3$) αντίστοιχα, ενώ σε όλα τα αρσενικά χορηγήθηκαν εμφυτεύματα ($n=3$) στην περίοδο Απριλίου - Ιουνίου 2012. Το πρότυπο ωοτοκίας διέφερε μεταξύ των θεραπειών ($n=2$) με τις ενέσεις να παρουσιάζουν ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο σύντομων ωοτοκιών σε αντίθεση με τα εμφυτεύματα που οι τρεις χορηγήσεις δεν επέφεραν το ίδιο μοτίβο ωοτοκιών. Η θεραπεία με ενέσεις GnRHα παρουσίασε υψηλότερες τιμές σχετικής γονιμότητας και ποσοστού γονιμοποίησης από τη αυτή των εμφυτευμάτων. Στα θηλυκά άτομα παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών ως προς την Τεστοστερόνη (T), ενώ δεν παρατηρήθηκε ως προς την Οιστραδιόλη (E_2). Στα αρσενικά άτομα δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών ως προς τις T και 11-Κετοτεστοστερόνη (11-KT). Ακόμα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών ως προς το ποσοστό επιβίωσης των αυγών/εμβρύων στις 24 h, το ποσοστό εκκόλαψης και το ποσοστό επιβίωσης των νυμφών την 5^η ημέρα. Η παρούσα μελέτη επιδεικνύει πως η προγραμματισμένη ωοτοκία με την παραγωγή σταθερού αριθμού αυγών χρησιμοποιώντας τη θεραπεία των ενέσεων, αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα για τις ιχθυοκαλλιέργειες που θέλουν να συμπεριλάβουν τον κρυνιό στην εκτροφή του, καθώς είναι ευκολότερο να προγραμματίσουν τις δραστηριότητες που αφορούν την εκτροφή των νυμφών. Επιπλέον, η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην περιγραφή της ωρίμανσης των ωοκυττάρων μετά από θεραπεία GnRHα, σαν ένα επιπλέον εργαλείο για την μελλοντική εφαρμογή τεχνητής γονιμοποίησης. Η τεχνητή γονιμοποίηση που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυγών και από τις δύο θεραπείες επέφερε μηδενικό ποσοστό γονιμοποίησης, αφού η ωορρηξία είχε πραγματοποιηθεί αρκετές ώρες ωρίτερα.

1. ABSTRACT

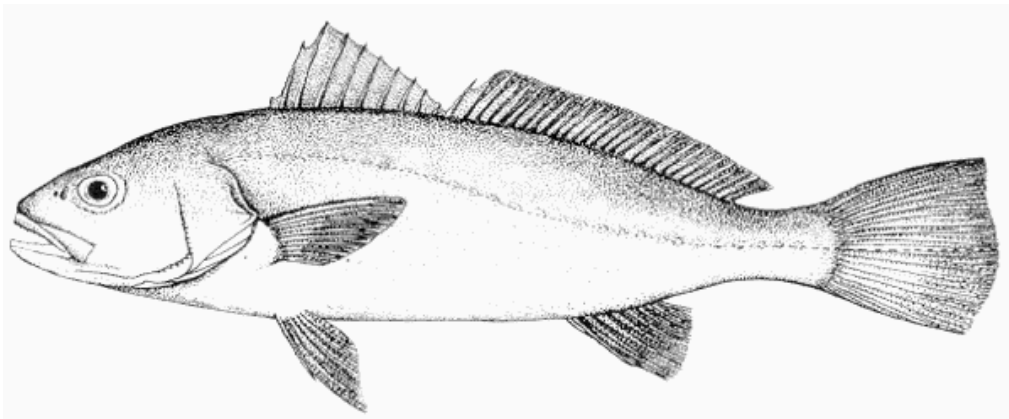
Meagre (*Argyrosomus regius*) is a new species in the aquaculture industry and do not reproduce without external hormonal, treatment although its on growing techniques are successful. The aim of the study is the comparative induction of spawning success using GnRHa injections or implants and monitoring of egg quality. Four females and four males mean weight (\pm SEM) $7,300 \pm 682$ g and $6,760 \pm 627$ g, respectively were used from 2005 broodstock in the Hellenic Center of Marine Research (H.C.M.R). Two females were injected (n=5) and other two were implanted (n=3) with GnRHa hormone, and all the males were implanted (n=3) during the period April - June 2012. The spawning kinetics differed between the two treatments. Treatment with GnRHa injections demonstrated a repeatable pattern of small numbered spawnings in contrast to GnRHa implants treatment than the spawning pattern was not repeatable between the administrations. In addition, GnRHa injections demonstrated higher values of relative fecundity and fertilization success in contrast to those from treatment with implants. There was significant difference between treatment groups in female testosterone (T) but there was not in female Estradiol (E₂). In males, there was no significant difference between treatment groups as far as T and 11-Ketotestosterone (11-KT) concerns. In addition, there was no significant difference between treatment groups in 24h egg survival rate, hatching rate and 5 d survival rate. The present study demonstrates that spawning on schedule using multiple GnRHa injections, is a big advantage in the aquaculture industry as it is easier to predict the larva rearing activities. In addition, the present study provided a morphological description of oocytes after treatment with GnRHa, as a useful tool in artificial insemination technique.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΙΧΘΥΟΚΑΛΜΙΕΡΓΕΙΑ ΚΡΑΝΙΟΥ

Η μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια κυριαρχείται από την εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Όμως, η αγορά εμφανίζεται κορεσμένη γι αυτά τα δύο είδη, οι τιμές είναι χαμηλές και η υδατοκαλλιέργεια βρίσκεται σε κρίση από τα τέλη του 1990. Ένα σημαντικό βήμα για να αντιμετωπιστεί η κρίση είναι η ένταξη καινούριων ειδών (Cardia and Lovatelli, 2007) που να παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά από τα υφιστάμενα είδη, και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (π.χ., φιλέτα). Ο κρανιός *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) θεωρείται ένα από τα πιο υποσχόμενα είδη για εκτροφή μεγάλης κλίμακας στη Μεσογειακή λεκάνη εξαιτίας των ευνοϊκών βιολογικών χαρακτηριστικών του (Monfort, 2010; Roo *et al.*, 2010; Duncan *et al.*, 2013) και έχει καταταχθεί στην όγδοη θέση ανάμεσα σε 27 υποψήφια είδη (Quémener, 2002).

Ο κρανιός ανήκει στην οικογένεια Sciaenidae (Chao and Trewavas, 1990), η οποία περιλαμβάνει 70 γένη και 270 είδη. Τα είδη αυτά κατανέμονται στα τροπικά και υποτροπικά νερά του νότιου-ανατολικού Ατλαντικού, του Ινδικού και δυτικού Ειρηνικού Ωκεανού (Griffiths and Heemstra, 1995; Duncan *et al.*, 2013). Το γένος *Argyrosomus* περιλαμβάνει οχτώ είδη (Quémener, 2002). Το επιστημονικό όνομα του γένους προέρχεται ετυμολογικά από την ελληνική λέξη άργυρος που σημαίνει ασήμι και τη λέξη σώμα. Έτσι, μορφολογικά το σώμα του ιχθύος που είναι ατρακτοειδές, εμφανίζεται γκρι-ασημί με χάλκινα χαρακτηριστικά στη ράχη του (Εικόνα 1). Οι βάσεις των πτερυγίων του έχουν χρώμα κόκκινο-καφέ ενώ η στοματική κοιλότητα του ψαριού είναι κίτρινη. Το κεφάλι είναι σχετικά μεγάλο αναλογικά του σώματός του με μάτια αρκετά μικρά. Διαθέτει πλευρική γραμμή που είναι πολύ έντονη και εκτείνεται μέχρι το ουραίο πτερύγιο ενώ το δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο είναι πιο μακρύ από το πρώτο (Food and Aquaculture Organization - FAO, www.fao.org). Ο κρανιός μπορεί να φτάσει τα δύο μέτρα σε μήκος και τα 103 kg σε βάρος (www.fishbase.gr).

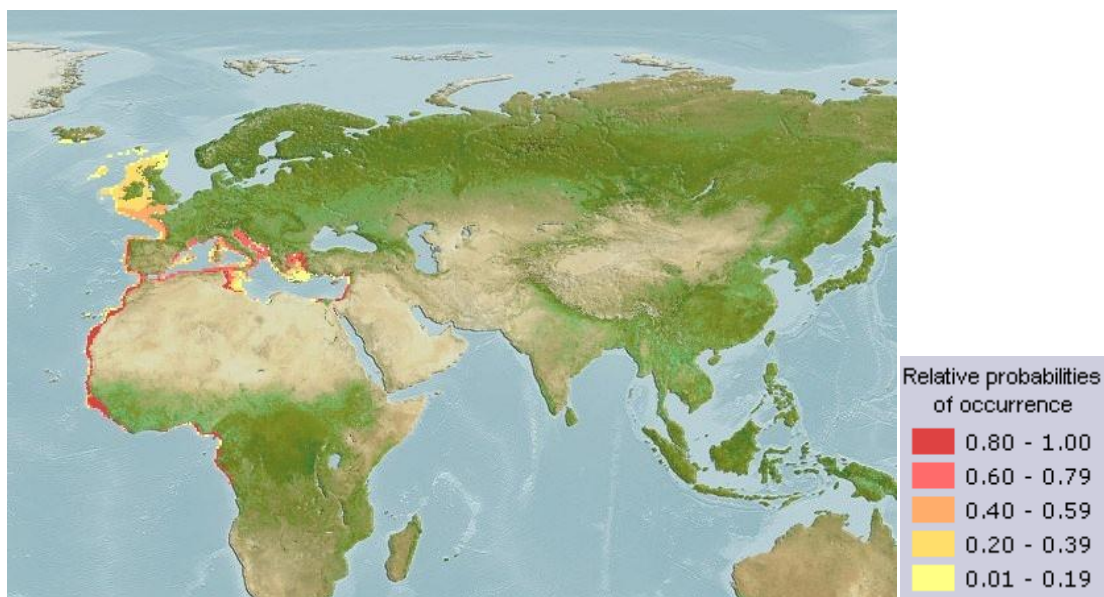


Εικόνα 1. Κρανιός *Argyrosomus regius* (Schneider, 1990).

Το ψάρι αυτό, συναντάται κατά μήκος των ακτών του ανατολικού Ατλαντικού Ωκεανού, βόρεια του Αγγλικού Καναλιού μεταξύ Μεγάλης Βρετανίας και Γαλλίας (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 και στα νότια του Κονγκό (Whitehead *et al.*, 1986). Είναι ψάρι βενθοπελαγικό με κατανομή στη στήλη του νερού από 15 έως 300 m βάθος (www.fao.org) και συναντάται σε υποτροπικά κλίματα με εύρος 65°N - 6°S, 23°W - 36°E (www.fishbase.gr) (Εικόνα 2). Είναι είδος γονοχωριστικό χωρίς φυλετικό διμορφισμό και στη φύση η πρώτη αναπαραγωγική ωρίμανσή του επιτυγχάνεται σε ολικό μήκος 45-62 cm για τα αρσενικά και 47-70 cm για τα θηλυκά άτομα (González-Quirós *et al.*, 2011; Abou Shabana *et al.*, 2012). Υπό συνθήκες εκτροφής, οι αρσενικοί και θηλυκοί κρανιοί ωριμάζουν αναπαραγωγικά στα δύο χρόνια με ολικό μήκος 27 cm και στα τρία χρόνια με ολικό μήκος 36 cm, αντίστοιχα (Schianone *et al.*, 2012). Η γρηγορότερη αυτή αναπαραγωγική ωρίμανση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι κάποια είδη ωριμάζουν γρηγορότερα σε συνθήκες εκτροφής από ότι στη φύση (Zohar, 1989) όπου υπάρχει πλαστικότητα στις παραμέτρους που επηρεάζουν την αναπαραγωγή (για παράδειγμα η θερμοκρασία νερού) και είναι αυξημένη η διαθεσιμότητα της τροφής (Gil *et al.*, 2013). Παρόλα αυτά, μελέτη αναφέρει ότι η πρώτη αναπαραγωγική ωρίμανση στους αρσενικούς εκτρεφόμενους κρανιούς επήλθε

στα 2.7 χρόνια με ολικό μήκος 49.3 cm και στους θηλυκούς στα 3.5 χρόνια με 57.2 cm (Gil *et al.*, 2013). Στη νηκτική κύστη του κρανιού είναι παρούσες αρκετές προεξοχές οι οποίες μπορούν να δονούνται παράγοντας ένα τυπικό «γρύλισμα» (Lagardère and Mariani, 2006). Η οικογένεια των Sciaenidae είναι από τις πιο μεγάλες οικογένειες ψαριών που παράγουν ήχους, περιλαμβάνοντας 150 είδη εντός 30 γενών (Chao, 1986). Έχει παρατηρηθεί ότι τόσο τα θηλυκά όσο και τα αρσενικά άτομα παράγουν ήχους δύο τύπων γρυλίσματος, παρατεταμένου ή σύντομου, όταν είναι η εποχή του ζευγαρώματος (Lagardère and Mariani, 2006).

Ο κρανιός προτιμά παράκτια οικοσυστήματα που γειτνιάζουν με υφαλοκρηπίδες και μπορεί να βρεθεί σε λιμνοθάλασσες ή στα Δέλτα ποταμών (Griffiths and Heemstra, 1995) όπου και ωοτοκεί κατά την άνοιξη. Τα ενήλικα άτομα κατανέμονται στην υφαλοκρηπίδα από τα 10 m έως τα 200 m βάθος, ενώ κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου μεταναστεύουν σε παράκτιες περιοχές (10-15 m βάθος) με έντονη ροή νερού που σχετίζεται με εκβολές ποταμών και/ή παλίρροιες με σκοπό να γεννήσουν (Tixerant, 1974). Οι περιοχές που είναι σημαντικές για την αναπαραγωγή του κρανιού είναι οι εκβολές του ποταμού Gironde στη Γαλλία (Quémener, 2002), του ποταμού Tagus στην Πορτογαλία, του ποταμού Guadiana στα σύνορα Νότιας Ισπανίας και Πορτογαλίας (González-Quirós *et al.*, 2011) και του ποταμού Νείλου (El Hehyewi, 1974). Η αναπαραγωγική του περίοδος ξεκινά τον Απρίλιο και τελειώνει τον Ιούνιο (Mylonas *et al.*, 2013a) ενώ έχει καταγραφεί ωοτοκία και κατά τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάρτιο στα δυτικά παράλια της Αφρικής (Μαυριτανία) (Griffiths and Heemstra, 1995). Κατά την αναπαραγωγική περίοδο σε θερμοκρασία 17-22°C, ένα θηλυκό άτομο, μήκους σώματος 1.2 m παράγει περίπου 800,000 αυγά σε τρεις με πέντε ωοτοκίες (www.fao.org) καθώς το ψάρι αυτό είναι πολύ-εναποθέτης (Schiavone *et al.*, 2012). Τα πελαγικά αυγά (990 μm διάμετρο) εκκολάπτονται μέσα σε 28 h και παρατηρείται το άνοιγμα του στόματος μέσα σε δύο με τρεις ημέρες μετά την εκκόλαψη ενώ η απορρόφηση της λεκίθου πραγματοποιείται μέσα σε επτά ημέρες μετά την εκκόλαψη (Tixerant, 1974). Οι πλαγκτονικές λάρβες αναπτύσσονται μέσα σε λιμνοθάλασσες και λιμνώδη νερά όπου η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 20°C (Quéro and Vayne, 1987). Τα ανήλικα άτομα μεταναστεύουν στις εκβολές και στις ρηχές παράκτιες περιοχές (60-200 m, 12°C) κατά το δεύτερο χρόνο ζωής τους (Quéro, 1985; Chao, 1986; Quéro and Vayne, 1987).



Εικόνα 2. Περιοχές όπου κατανέμεται ο κρανιός (www.fishbase.gr).

Η παγκόσμια αλιευτική παραγωγή του κρανιού ήταν 4408 τόνοι ετησίως από το 2005 έως το 2007 (www.fao.org), αλλά η πραγματική ποσότητα πιθανόν να είναι μεγαλύτερη διότι τα δεδομένα του FAO για κάποιες χώρες έχουν πιθανότατα υποτιμηθεί (González-Quirós *et al.*, 2011). Στην Ευρώπη, η αλιευτική του παραγωγή του κρανιού κυμαίνεται ετησίως από μερικές εκατοντάδες έως 1,500 τόνους (www.fao.org). Η εκτροφή του κρανιού ξεκίνησε στην Ευρώπη, στα τέλη της δεκαετίας του ενενήντα στη Γαλλία και στην Ιταλία, το 2004 ακολούθησε η Ισπανία, το 2007 η Ελλάδα και η Τουρκία (Monfort, 2010), ενώ από το 1996 καλλιεργούνταν στην Αίγυπτο (Sadek, 1997). Η συνολική παραγωγή του έχει αυξηθεί από μερικούς τόνους που ήταν το 2000 σε περίπου 4,000 τόνους το 2008 (Monfort, 2010). Το 2009, η παραγωγή του έφτασε τους 2,200 τόνους στην Αίγυπτο, τους 1,348 τόνους στην Ισπανία, τους 418 τόνους στη Γαλλία τους 102 τόνους στην Ιταλία και τους 44 τόνους στην Πορτογαλία (www.fao.org).

Οι τεχνικές εκτροφής που χρησιμοποιούνται είναι παρόμοιες με αυτές του λαβρακιού και της τσιπούρας και η πάχυνση γίνεται κυρίως σε κυκλικούς ιχθυοκλωβούς (διαμέτρου 25m) (Mañanós *et al.*, 2008), ενώ στην Αίγυπτο γίνεται σε χωμάτινες τάφρους και τεχνητές λίμνες (Sadek, 1997). Αρκετά είδη της οικογένειας αποτελούν καινούρια πρόκληση στις παγκόσμιες ιχθυοκαλλιέργειες (Mañanós *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα το *Argyrosomus japonicus* εκτρέφεται στην Αυστραλία, στη

νότια Αφρική και στην Ταϊβάν, το *Sciaena umbra* στην Ελλάδα και Τουρκία, το *Sciaenops ocellatus* στην Κίνα, στις Η.Π.Α., στο Ισραήλ, στο Μεξικό και στην Ταϊβάν, το *Umbrina cirrosa* στην Κύπρο, Ισπανία, Ελλάδα, Ιταλία και Τουρκία (Mañanós *et al.*, 2008).

Ο κρανιός είναι σαρκοφάγο ψάρι και στη φύση τρέφεται με μυσιδώδη, δεκάποδα και τελεόστεους (Chakroun and Ktari, 1981; Cabral and Ohmert, 2001). Σε συνθήκες εκτροφής τρέφεται με βιομηχανική τροφή και προς το παρόν με τροφές λαβρακιού και τσιπούρας. Παρόλα αυτά, υπάρχει λίγη πληροφόρηση σχετικά με τις διατροφικές απαιτήσεις του κρανιού σχετικά με τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εξειδικευμένη διατροφή αυτού του είδους (Skalli *et al.*, 2004). Ο κρανιός σε συνθήκες εκτροφής επιτυγχάνει υψηλούς ρυθμούς αύξησης (Quéro and Vayne, 1997; Quémèner, 2002), μεγαλώνοντας περίπου 1 kg κάθε χρόνο (Monfort, 2010; González-Quirós *et al.*, 2011; Duncan *et al.*, 2012), ενώ υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο κρανιός έχει τη δυνατότητα να φτάσει τα 2.5 kg σε 24 μήνες εξαρτώμενο από τις συνθήκες εκτροφής του (Monfort, 2010). Επομένως μπορεί να φτάσει ένα σχετικά μεγάλο εμπορικό μέγεθος αρκετά γρήγορα (Schianone *et al.*, 2012). Για παράδειγμα, εάν εκτραφεί σε περιοχές με υψηλότερη θερμοκρασία όπως είναι η νότια Ισπανία, οι Κανάριοι νήσοι και η νότια Μεσόγειος, ο ρυθμός αύξησης θα είναι γρηγορότερος (Monfort, 2010). Επιπρόσθετα πλεονεκτήματα της ένταξης του κρανιού προς εκτροφή στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια, αποτελούν ο γρήγορος εγκλιματισμός του σε συνθήκες εκτροφής (Duncan *et al.*, 2012), η σχετικά εύκολη διαχείριση των γεννητόρων που εξασφαλίζουν καλής ποιότητας αυγά (Mañanós *et al.*, 2008), ο χαμηλός δείκτης μετατρεψιμότητας τροφής (feed conversion ratio) που κυμαίνεται από 0.9 έως 1.2 (Monfort, 2010), η σχετικά εύκολη εκτροφή των νυμφών (Roo *et al.*, 2010; Vallés and Estévez, 2013) και η ανοχή του σε μεγάλες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της αλατότητας (Quémèner, 2002).

Από άποψη αγοράς, ο κρανιός είναι προικισμένος με εγγενή χαρακτηριστικά, όπως είναι το ελκυστικό του σχήμα, το οποίο μοιάζει με αυτό του λαβρακιού, η πλούσια θρεπτική του αξία (Monfort, 2010), η χαμηλή περιεκτικότητα λιπαρών στη σάρκα του (Poli *et al.*, 2003; Piccolo *et al.*, 2008; Monfort, 2010; Grigorakis *et al.*, 2011; Duncan *et al.*, 2013) η εξαιρετική γεύση και η υφή του που το καθιστά κατάλληλο ψάρι για μια μεγάλη ποικιλία συνταγών (Monfort, 2010). Ακόμη, η

ποιότητα της σάρκας του κρανιού έχει χαρακτηριστεί εξαιρετική και ιδιαίτερα θρεπτική, και το όνομα του είδους *regius* προέρχεται από τη λέξη *royal* που σημαίνει βασιλικός, λόγω της ιδιαίτερα αγαπητής ποιότητας της σάρκας του (Poli *et al.*, 2003).

2.2 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΧΘΥΩΝ

Η παραγωγή του κρανιού έχει αυξηθεί πολύ τα τελευταία χρόνια (Duncan *et al.*, 2013), όμως σε συνθήκες εκτροφής το ψάρι αυτό δεν ωριμάζει αναπαραγωγικά και δεν ωοτοκεί αυθόρμητα υπό συνθήκες αιχμαλωσίας (Duncan *et al.*, 2013) με ελάχιστες εξαιρέσεις (Mylonas *et al.*, 2013a). Η εξωγενής χορήγηση ορμονών αποτελεί απαραίτητο εργαλείο για να επαχθεί η ωοτοκία του (Duncan *et al.*, 2012; Mylonas *et al.*, 2013a).

2.2.1 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο αναπαραγωγικός κύκλος αποτελείται από ένα σύνολο διαδοχικών διαδικασιών όπου τα ανώριμα γεννητικά κύτταρα αυξάνονται και διαφοροποιούνται σε ώριμους γαμέτες, με τελικό στόχο την ένωση τους και την παραγωγή γονιμοποιημένου αυγού. Τόσο οι θηλυκοί όσο και οι αρσενικοί γαμέτες προέρχονται από τα εμβρυικά πρωτογενή βλαστικά κύτταρα (embryonic primordial germ cells, PGC), τα οποία μεταναστεύουν κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης στο βλαστικό επιθήλιο. Τα PGC πολλαπλασιάζονται μέσω μιτωτικών διαιρέσεων και σχηματίζουν τα ωογόνια και σπερματογόνια, τα οποία εισέρχονται στη μείωση και γίνονται ωοκύτταρα και σπερματοκύτταρα, εξαρτώμενα από το φύλο του εκάστοτε ατόμου (Mellinger, 2002; Bernard, 2005). Ο αναπαραγωγικός κύκλος χωρίζεται στη φάση της γοναδικής ανάπτυξης (γαμετογένεση) και τη φάση της ωρίμανσης, που περιλαμβάνει την ωορρηξία και σπερμίαση αντίστοιχα. Η απελευθέρωση των ώριμων γαμετών στο εξωτερικό περιβάλλον είναι ένα υψηλά συγχρονισμένο γεγονός το οποίο οδηγεί στην γονιμοποίηση του αυγού (Mañanós *et al.*, 2008).

Η διαδικασία της παραγωγής των ωοκυττάρων και αυγών στα θηλυκά άτομα περιλαμβάνει τη φάση της ωογένεσης, της ωρίμανσης και της ωοτοκίας. Ο αναπαραγωγικός κύκλος των θηλυκών ιχθύων χαρακτηρίζεται από την διαδικασία της λεκιθογένεσης. Το λεκιθογόνο (vitellogenin, VTG) είναι μια λιποφωσφογλυκοπρωτεΐνη που η σύνθεσή της πραγματοποιείται στο συκώτι των ψαριών μετά από διέγερση από την Οιστραδιόλη (E_2). Η VTG απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος και ενσωματώνεται προοδευτικά μέσα στα αναπτυσσόμενα

ωοκύτταρα. Η άριστη συσσώρευση της είναι ζωτικής σημασίας για την ποιότητα των αυγών και τη μετέπειτα επιβίωση της εκκολαπτόμενης νύμφης, αφού θα αποτελέσει την λέκιθο, από όπου ο προνύμφη θα τρέφεται τις πρώτες ημέρες μετά την γονιμοποίηση του αυγού. Τα επίπεδα της VTG στο αίμα των θηλυκών ιχθύων αποτελούν ένδειξη της έναρξης και της εξέλιξης της περιόδου της ωογένεσης (Mañanós *et al.*, 2008). Στην φάση της ωογένεσης το ωοκύτταρο αυξάνεται σημαντικά σε μέγεθος (περίπου 95% του συνολικού) (Tyler *et al.*, 1991) λόγω της λήψης VTG από το αίμα που αποτελεί το κυριότερο χαρακτηριστικό της λεκιθογένεσης (Mylonas *et al.*, 2010a). Οι πρωτεΐνες χρησιμεύουν στην παροχή των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των εμβρύων-νυμφών μέχρι τη λήψη εξωγενούς τροφής. Παράλληλα, διακρίνεται και η παρουσία λιπιδίων, υπό μορφή τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων και εστέρων (Lund *et al.*, 2000). Έτσι, τα ωοκύτταρα παρουσιάζουν ανεπτυγμένο κυτταρόπλασμα, γεμάτο με λεκιθικά σφαιρίδια που αποθηκεύεται η VTG, στις περισσότερες περιπτώσεις σταγονίδια λιπιδίων, κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα και ακτινωτή ζώνη κάτω από το ωοθυλάκιο (Babin *et al.*, 2007; Mylonas and Zohar, 2009). Στο τέλος της λεκιθογένεσης τα ωοκύτταρα είναι έτοιμα για την τελική ωρίμανση, και περιέχουν μητρικό RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, βιταμίνες και ορμόνες που είναι απαραίτητα για την σωστή ανάπτυξη του εμβρύου στα πρώτα στάδια (Lubzens *et al.*, 2010). Μετά την λεκιθογένεση, το ωοκύτταρο υποβάλλεται στην τελική του ωρίμανση με μείωση και προώθησή του στη μετάφαση II, κατά την οποία το πολικό σωματίο απελευθερώνεται. Μετά την ωοτοκία μπορούν να βρεθούν μέσα στην ωοθήκη, μετα-ωοθυλακιορρηκτικά θυλάκια (post-ovulatory follicles, POF) που είναι τα άδεια ωοθυλάκια που παραμένουν όταν το ωοκύτταρο απελευθερώνεται. Επιπλέον, μπορούν να βρεθούν ατρητικά ή αποπτωτικά ωοκύτταρα μέσα στην ωοθήκη, ο αριθμός των οποίων αντανακλά την επιτυχία της αναπαραγωγής των θηλυκών ιχθύων (Mañanós *et al.*, 2008).

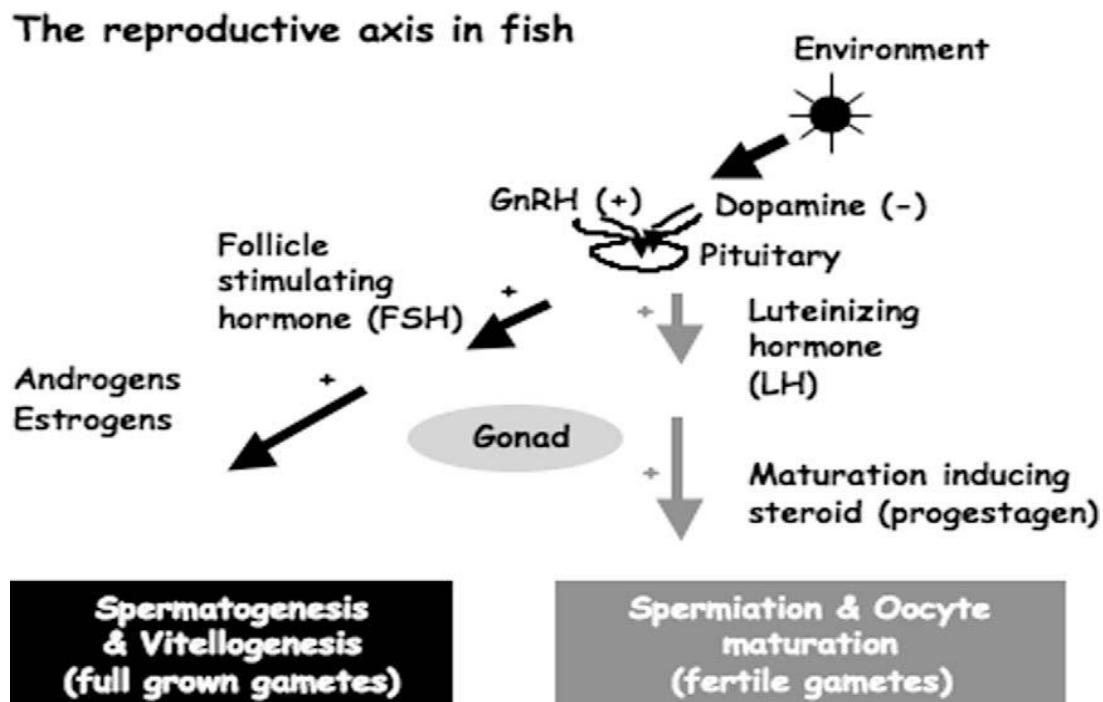
Στα αρσενικά άτομα διακρίνονται δύο φάσεις του αναπαραγωγικού κύκλου που είναι η σπερματογένεση και η σπερμιάση. Η διαδικασία της σπερματογένεσης ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων, την παραγωγή σπερματοκυττάρων I με πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις μέσα σε ξεχωριστές σπερματοκύστες, την παραγωγή των σπερματοκυττάρων II έπειτα από μείωση και τη διαφοροποίησή τους σε σπερματίδες. Με την απόκτηση του μαστιγίου, οι

σπερματίδες μετασχηματίζονται σε μαστιγοφόρα σπερματοζωάρια. Στην φάση της σπερμίας, τα κύτταρα Sertoli που περιβάλλουν τις σπερματοκύστες, διαρρηγνύονται απελευθερώνοντας τα σπερματοζωάρια στο σπερματικό σωλήνα (Schulz and Miura, 2002; Mylonas and Zohar, 2009; Schulz *et al.*, 2010) και με την παραγωγή του σπερματικού ορρού τα σπερματοζωάρια αποκτούν την δυνατότητα για πρόσθια κίνηση μετά την απελευθέρωση τους στο νερό (Schulz and Miura, 2002).

Η διαδικασία της αναπαραγωγής στα ψάρια ελέγχεται από τον άξονα «εγκέφαλος-υπόφυση-γονάδες» (brain-pituitary-gonad, BPG, axis) εκλύοντας μία σειρά από ορμόνες. Ο εγκέφαλος λαμβάνει περιβαλλοντικά ερεθίσματα (θερμοκρασία, φωτοπερίοδος, κοινωνικοί παράγοντες) και από τον υποθάλαμο εκλύεται η γοναδοεκλυτίνη (gonadotropin releasing hormone, GnRH) η οποία δρα στην υπόφυση και προκαλεί την έκλυση των γοναδοτροπινών (Gonadotropic hormones, GTH), της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle-Stimulating Hormone, FSH) και της ωχρινοποιητικής ορμόνης (Luteinizing-Hormone, LH) (Peter and Yu, 1997). Οι γοναδοτροπίνες μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και δρουν στις γονάδες προκαλώντας την σύνθεση των φυλετικών στεροειδών ορμονών (οιστρογόνα, ανδρογόνα, προγεστερόνης), που αποτελούν τους τελικούς παράγοντες στην γοναδική ανάπτυξη (Mañanós *et al.*, 2008) (Εικόνα 3). Οι κυρίαρχες στεροειδείς ορμόνες που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της γαμετογένεσης των ψαριών είναι η E_2 στα θηλυκά και η 11-Κετοτεστοστερόνη (11-KT) στα αρσενικά. Η ωοθήκη των τελεόστεων συνθέτει την Τεστοστερόνη (T) που είναι η πρόδρομος ουσία στην παραγωγή της E_2 και 11-KT (Prat *et al.*, 1990; Pavlidis *et al.*, 2000). Οι αρσενικοί τελεόστεοι συνθέτουν την E_2 , αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από αυτά των θηλυκών ατόμων. Οι όρχεις παράγουν και άλλα ανδρογόνα εκτός από 11-KT, για παράδειγμα τη T που ασκεί συμπληρωματικές λειτουργίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των όρχεων (Schulz and Miura, 2002).

Καθώς οι γοναδοτροπίνες αποτελούν τα κλειδιά παράγοντες που ρυθμίζουν την ωρίμανση των γονάδων, ο καθορισμός των επιπέδων τους στο πλάσμα και στην υπόφυση των ιχθύων, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη μελέτη της φυσιολογίας της αναπαραγωγής. Το περιοδικό μοτίβο της έκκρισης στα είδη των ψαριών υποδεικνύει πως οι ορμόνες FSH και LH εκκρίνονται διαφορετικά κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου (Levani-Sivan *et al.*, 2010). Η αρχή του αναπαραγωγικού κύκλου χαρακτηρίζεται από την αύξηση των επιπέδων της FSH,

που παραμένουν υψηλά καθόλη τη διάρκεια της γαμετογένεσης, ενώ τα επίπεδα της LH είναι μη ανιχνεύσιμα. Κατά τη διάρκεια της γοναδικής ωρίμανσης τα επίπεδα της FSH μειώνονται ενώ της LH αυξάνονται, παρουσιάζοντας μία μεγάλη αύξηση των επιπέδων της πριν την ωορρηξία (Mañanós *et al.*, 2008).



Εικόνα 3. Ο αναπαραγωγικός άξονας στα ψάρια, brain-pituitary-gonad (BPG) axis, όπου φαίνονται οι κύριες ορμόνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αναπαραγωγής των ψαριών. Η αναπαραγωγική διαδικασία ξεκινά από τον εγκέφαλο, ο οποίος δέχεται τα εξωτερικά ερεθίσματα (π.χ. περιβαλλοντικά) και ανταποκρίνεται εκλύοντας την γοναδοεκλυτίνη, gonadotropin releasing hormone (GnRH). Η GnRH διεγείρει τη σύνθεση και απελευθέρωση των γοναδοτροπινών της υπόφυσης, pituitary gonadotropins (GTHs), την ωθηλακιοτρόπο ορμόνη, follicle stimulating hormone (FSH) και την ωχρινοποιητική ορμόνη, luteinizing hormone (LH), που δρουν στη γονάδα (ωθήκη ή όρχεις) με σκοπό να διεγείρουν τη σύνθεση των φυλετικών στεροειδών που αποτελούν τους τελεστές της γοναδικής ανάπτυξης (Mañanós *et al.*, 2008).

2.2.2 ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΓΑΜΕΤΟΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΡΑΝΙΟΥ

Πολλά είδη ιχθύων αδυνατούν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της αναπαραγωγής λόγω δυσλειτουργιών που οφείλονται σε ορμονικές διαταραχές (Mylonas and Zohar, 2001; Mylonas *et al.*, 2010a). Τα θηλυκά άτομα ενώ ολοκληρώνουν την ωογένεση και την παραγωγή λεκιθικών ωοκυττάρων, δεν ολοκληρώνουν την ωρίμανση με αποτέλεσμα τα ωοκύτταρα να μπαίνουν σε φάση απόπτωσης (Babin *et al.*, 2007) και να μην απελευθερώνονται καθόλου αυγά. Η μη ωρίμανση των ωοκυττάρων μετά την ολοκλήρωση της λεκιθογένεσης αποτελεί την πιο κοινή αναπαραγωγική δυσλειτουργία στις υδατοκαλλιέργειες (Mylonas and Zohar, 2009; Mylonas *et al.*, 2010b). Αυτή η δυσλειτουργία μπορεί να σχετίζεται με το ακατάλληλο περιβάλλον εκτροφής των ιχθύων (π.χ. μέγεθος ή βάθος των δεξαμενών), την ποιότητα του νερού (π.χ. θερμοκρασία ή αλατότητα) ή την καταπόνηση λόγω μη εγκλιματισμού σε συνθήκες εκτροφής (Schreck, 2010). Για το λόγο αυτό έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τον έλεγχο της αναπαραγωγής με τη χρήση ορμονών (Zohar and Mylonas, 2001). Η ανάπτυξη και εφαρμογή των ορμονικών θεραπειών έχει επιτρέψει την αναπαραγωγή πολλών ψαριών που δεν γεννούν αυθόρμητα σε συνθήκες εκτροφής. Οι ορμονικές θεραπείες όχι μόνο επιτρέπουν την αναπαραγωγή αλλά επέτρεψαν τη βελτίωση των αναπαραγωγικών επιδόσεων των γεννητόρων και την ανάπτυξη μιας τεχνολογικής και οικονομικά επιτυχημένης υδατοκαλλιέργειας για πολλά είδη ψαριών (Donaldson, 1996; Mylonas and Zohar, 2001; Zohar and Mylonas, 2001).

Η εφαρμογή των θεραπειών που βασίζονται στη GnRH (Dubois *et al.*, 2002) έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με προηγούμενες θεραπείες καθώς δρουν σε ένα πιο υψηλό επίπεδο του αναπαραγωγικού άξονα και προωθούν έτσι μια πιο γενική και φυσιολογική διέγερση του συνόλου της αναπαραγωγικής διαδικασίας (Mañanós *et al.*, 2008). Μελέτες οδήγησαν στην ανάπτυξη θεραπείας με αγωνιστές της γοναδοεκλυτίνης (GnRH_a), που είναι δομικά τροποποιημένη GnRH και παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα απελευθέρωσης GnRH όταν χορηγείται εξωγενώς. Στα θηλυκά άτομα, η θεραπεία με GnRH_a επάγει την τελική ωρίμανση ωοκυττάρων, την ωορρηξία και την ωοτοκία, ενώ στα αρσενικά αυξάνει την παραγωγή του σπέρματος και μερικές φορές βελτιώνει την κινητικότητά του (Mañanós *et al.*, 2008). Λόγω της τεχνητής σύνθεσής της GnRH_a δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος μόλυνσης των ιχθύων από τη χρήση της θεραπείας όπως συμβαίνει

από τις εξαγωγές ορμονών (π.χ. GTH κυπρίνου) από ζωντανούς οργανισμούς (Zohar and Mylonas, 2001).

Η χρήση GnRHα μπορεί να γίνει είτε με χορήγηση της ορμόνης σε ενέσιμες μορφές (injections) είτε με χρήση εμφυτευμάτων (implants) (Donaldson, 1996; Crim and Bettles, 1997; Zohar and Mylonas, 2001). Σε πολλά είδη, λόγω της στρατηγικής αναπαραγωγής που ακολουθούν δεν είναι αρκετή η χορήγηση μιας δόσης ορμόνης σε ενέσιμη μορφή. Η σχετικά σύντομη (μερικές ώρες ή ημέρες) αύξηση της LH που επιτυγχάνει μία ένεση GnRHα δεν είναι ικανή να επιφέρει την ωρίμανση των ωοκυττάρων (Nagahama, 1994). Αντίθετα, η σταδιακή και παρατεταμένη απελευθέρωση της GnRHα που προκαλεί συνεχή ή σταθερή αύξηση έκκρισης της LH (Nagahama, 1994), καθώς και η μείωση του αριθμού των απαραίτητων χειρισμών είναι μερικά από τα προτερήματα της χρήσης των εμφυτευμάτων έναντι των κλασσικών ενέσεων GnRHα που οδηγούν στην επιτυχημένη ωρίμανση και ωοτοκία (Mylonas and Zohar, 2001; Mylonas *et al.*, 2010b). Μία εφάπαξ χορήγηση εμφυτεύματος είναι ικανή να αντικαταστήσει την επίδραση από τέσσερις με πέντε ενέσεις (Mañanós *et al.*, 2008).

Η ποιότητα των γαμετών είναι πολύ σημαντική παράμετρος στην επιτυχία της αναπαραγωγής, αφού από αυτή εξαρτάται η εμβρυογένεση και η ανάπτυξη των προνυμφών. 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 πρακτικούς δείκτες της ποιότητας των αυγών (Bromage and Roberts, 1995). Όμως υπάρχουν πολλοί παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα των αυγών (Lahnsteiner *et al.*, 2001). Για τα μη γονιμοποιημένα αυγά, η διαφάνεια και η ομοιογενής κατανομή των σταγόνων λίπους αποτελούν σημαντικά κριτήρια στα Σαλμονοειδή (Lahnsteiner *et al.*, 1999). Για τα γονιμοποιημένα αυγά η μορφολογία του βλαστομεριδίου είναι παράγοντας πρόβλεψης της ποιότητας καθώς η δομή του συνάπτει με την βιωσιμότητα του εμβρύου στο wolfish (*Anarchicas lupus*), στον μπακαλιάρο (*Gadus morhua*) και στον μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Hippoglossus hippoglossus*) (Kjørsvik, 1994; Pavlov and Moksness, 1994; Shields *et al.*, 1997) όπως επίσης και η πλευστότητα αποτελούν ενδείξεις καλής ποιότητας των αυγών (Bromage and Roberts, 1995). Ακόμα, η μηχανική αντοχή του χορίου στο αυγό επηρεάζει τη βιωσιμότητα του αυγού στον μπακαλιάρο (Kjørsvik and Lønning, 1983), ενώ τα

επίπεδα του pH και των πρωτεϊνών στην ωοθήκη συσχετίζονται με την βιωσιμότητα του αυγού στο καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) (Fauvel *et al.*, 1993) και στην πέστροφα (*Salmo trutta lacustris*) (Lahnsteiner *et al.*, 1999). Βιοχημικοί παράγοντες όπως τα λιπίδια (Bell and Sargent, 2003; Tveiten *et al.*, 2004), τα αμινοξέα (Rønnestad and Fyhn, 1993) ή οι βιταμίνες (Mæland *et al.*, 2003) αποτελούν παράγοντες της ποιότητας των αυγών. Αρκετές ενώσεις και ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων έχουν αναγνωριστεί ως καλοί δείκτες της ποιότητας των αυγών στα είδη της οικογένεια Sparidae, όπως η τσιπούρα και το μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*) (Lahnsteiner and Patarnello, 2004). Λιπίδια και λιπαρά οξέα επίσης χρησιμοποιούνται ώστε να συγκριθεί η ποιότητα των αυγών από γεννήτορες που προέρχονται από άγριους πληθυσμούς ή από εκτροφή (Rodríguez *et al.*, 2004; Salze *et al.*, 2005). Εφόσον επιτευχθεί η αναπαραγωγή, δείκτης καλής ποιότητας των αυγών αποτελεί η ικανότητα ενός αυγού να παράξει μία βιώσιμη νύμφη (Kjørsvik *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1997).

Η ποιότητα του σπέρματος επηρεάζει το ποσοστό γονιμοποίησης και κατά συνέπεια τον αριθμό των βιώσιμων αυγών κατά την αναπαραγωγική περίοδο (Mylonas *et al.*, 2003). Για την ποιοτική ανάλυση του σπέρματος, μελετάται η πυκνότητα, η κινητικότητα, καθώς και η επιβίωσή του (Bromage and Roberts, 1995). Σημαντικότερος παράγοντας επιτυχίας της γονιμοποίησης είναι η κινητικότητα του σπέρματος καθώς μειωμένα επίπεδα 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. Τέλος, η πυκνότητα του σπέρματος αποτελεί ακόμη ένα στοιχείο εκτίμησης των αρσενικών γαμετών (Bromage and Roberts, 1995).

2.3 ΣΤΟΧΟΙ

Ο κρυνιός είναι ένα ψάρι που έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ιχθυοκαλλιεργειών σχετικά με την πιθανή εκτροφή του για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Η παραγωγή του έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια και σήμερα παράγεται σχεδόν σε όλες τις χώρες της Μεσογείου στις οποίες δραστηριοποιούνται μονάδες θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας. Παρόλα αυτά, το είδος παρουσιάζει δυσλειτουργίες όσον αφορά την αναπαραγωγή του, με αποτέλεσμα να απαιτείται χρήση εξωγενών ορμονών για την πρόκληση της ωρίμανσης και ωοτοκίας. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αποτελεσματικότητας και των παραγωγικών παραμέτρων δύο μεθόδων πρόκλησης της ωοτοκίας με τη χρήση εμφυτευμάτων ή ενέσεων GnRHα. Και οι δύο μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί από διαφορετικούς ερευνητές μέχρι σήμερα στον έλεγχο της αναπαραγωγής του κρυνιού σε συνθήκες εκτροφής, και στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογήσει και τις δύο μεθόδους κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ώστε να προταθεί η πιο αποτελεσματική μέθοδος για χρήση από την βιομηχανία. Η ανάπτυξη αποτελεσματικών πρωτόκολλων επαγωγής της ωοτοκίας αποτελεί απαραίτητο εργαλείο για τους ιχθυογεννητικούς σταθμούς που ενδιαφέρονται να συμπεριλάβουν τον κρυνιό στην παραγωγή τους. Ακόμη, στην παρούσα μελέτη γίνεται μορφολογική περιγραφή της διαδικασίας ωρίμανσης των ωοκυττάρων μετά από τη θεραπεία με GnRHα, σαν ένα επιπλέον εργαλείο για την μελλοντική εφαρμογή τεχνητής γονιμοποίησης, π.χ. σε προγράμματα γενετικής επιλογής.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΤΟΚΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΕΣΕΩΝ Η ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ GnRHα

Στις 27 Απριλίου, 2012 πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία με σκοπό να διαλεχτούν εκείνα τα άτομα που θα ήταν κατάλληλα για το πείραμα συγκριτικής πρόκλησης ωοτοκίας στον κρανιό με τη χρήση ενέσεων ή εμφυτευμάτων GnRHα. Το πείραμα έλαβε μέρος στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.).

3.1.1 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΕΝΝΗΤΟΡΩΝ

Εξετάστηκαν 17 άτομα (9 θηλυκά, 8 αρσενικά) που προέρχονταν από εκτροφή του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. του έτους 2005, ως προς το στάδιο ανάπτυξης των ωοκυττάρων και το στάδιο σπερμιάσης με σκοπό να επιλεγθούν τέσσερα θηλυκά και τέσσερα αρσενικά άτομα για την υλοποίηση του πειράματος. Τα κριτήρια επιλογής των θηλυκών ατόμων έγιναν με βάση την αξιολόγηση του σταδίου της ωογένεσης και την μέτρηση της μέσης διαμέτρου των μεγαλύτερων λεκιθικών ωοκυττάρων ενώ στα αρσενικά άτομα εξετάστηκε εάν ήταν σπερμιάζοντα. Έτσι, αρχικά στο νερό της δεξαμενής μειώθηκε η στάθμη μέχρι το 0.5 m βάθος και χορηγήθηκε γαρυφαλέλαιο σε συγκέντρωση 0.01 ml l⁻¹, για μερική αναισθησία των κρανίων. Στη συνέχεια, κάθε ψάρι μεταφέρθηκε ξεχωριστά με τη χρήση πλαστικού φορείου σε κυκλική δεξαμενή χωρητικότητας 340 l. Αυτή η δεξαμενή περιείχε γαρυφαλέλαιο σε συγκέντρωση 0.03 ml l⁻¹ για ολική αναισθησία των κρανίων με σκοπό την λήψη βιοψιών καθώς και την χορήγηση των θεραπειών (Εικόνα 4).

Με τη χρήση passive integrated transponder (PIT) reader (AVID, UK), ανιχνεύονταν το PIT tag κάθε ψαριού και γνωστοποιούνταν το φύλο. Στα θηλυκά άτομα, πραγματοποιούνταν βιοψία των ωοκυττάρων τους και χορήγηση ένεσης ή εμφυτεύματος. Η βιοψία στα θηλυκά ψάρια πραγματοποιούνταν με γυάλινο καθετήρα (Natelson tube, 2.9 έως 3.05 mm εξωτερική διάμετρος) που ήταν συνδεδεμένος σε λάστιχο ίδιας διατομής. Το δείγμα εξεταζόταν νωπό σε οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUS CH-2, OLYMPUS OPTICAL CO.LTD.) προκειμένου να εκτιμηθεί το στάδιο ωρίμανσης και η διάμετρος των ωοκυττάρων και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Nikon E4500, Nikon Corporation) (Εικόνα 5). Στα αρσενικά πραγματοποιούνταν εκτίμηση της σπερμιάσης (με βάση την ευκολία απελευθέρωσης και ποσότητας σπέρματος) με απαλές κοιλιακές μαλάξεις. Στην περίπτωση ύπαρξης σπέρματος, έπειτα από καθαρισμό του γενετικού πόρου με

θαλασσινό νερό και στέγνωμα με χαρτί, το σπέρμα συλλέγονταν με πλαστική πιπέτα ή ένεση και φυλάσσονταν σε πάγο (Εικόνα 6).



Εικόνα 4. Δεξαμενή αναισθησίας όπου τα ψάρια τοποθετούνταν για τη λήψη βιοψιών από τις γονάδες, αιμοληψία και θεραπεία με GnRHα.



Εικόνα 5. Βιοψία ωοθηκών με τη χρήση γυάλινου καθετήρα (A) και παρατήρηση του σταδίου, του μεγέθους και την ποιότητας των ωοκυττάρων με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (B).



Εικόνα 6. Συλλογή σπέρματος με τη χρήση πλαστικής ένεσης από το γενετικό πόρο με απαλές μαλάξεις στην κοιλιακή χώρα του κρανίου.

Στο εργαστήριο, γινόταν ενεργοποίηση με θαλασσινό νερό του σπέρματος που είχε συλλεχθεί κατά τη δειγματοληψία και εκτίμηση της κινητικότητας του με χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Nikon Eclipse 50i). Τμήμα δείγματος ωοκυττάρων από τη βιοψία, εμβαπτιζόταν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης και 1% γλουταραλδεΰδης, για τη μονιμοποίηση του, προκειμένου να υποβληθεί σε ιστολογική εξέταση. Στη συνέχεια και μετά από τη διαδικασία της αφυδάτωσης τα δείγματα τοποθετούνταν σε πλακίδια με υδροξυεθυλμεθακρυλική πολυμεριζόμενη ρητίνη (Technovit 7100, Heraeus Kulzer, Germany) και παρέμειναν έως ότου πολυμεριστεί. Οι τομές γινόταν με τη χρήση μικροτόμου (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 (Bennet *et al.*, 1976). Τα δείγματα εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse 50i) και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Jenoptik progress C12 plus).

Επιλέχθηκαν τέσσερις θηλυκοί κρانيοί που τηρούσαν τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν, αρχικού μέσου βάρους (\pm SEM) $7,300 \pm 682$ g, που τα ωοκύτταρά τους μετά από βιοψία βρίσκονταν στο στάδιο της λεκιθογένεσης με μέση διάμετρο 648 ± 6 μm . Ακόμα, επιλέχθηκαν τέσσερα αρσενικά άτομα αρχικού μέσου βάρους $6,760 \pm 627$ g που έβγαζαν ικανοποιητική ποσότητα σπέρματος μετά από απαλή πίεση στην κοιλιακή χώρα. Σε δύο θηλυκά άτομα χορηγήθηκαν πέντε διαδοχικές ενέσεις GnRHa (des-Gly10, [D-Ala6]-gonadotropin releasing hormone ethylamide) δοσολογίας $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ στην βάση του πίσω μέρους του δεύτερου ραχιαίου πτερυγίου (Εικόνα 7) με διάστημα περίπου δέκα ημερών μεταξύ των χορηγήσεων. Στα άλλα δύο θηλυκά, χορηγήθηκαν τρία διαδοχικά εμφυτεύματα GnRHa (αιθυλενίου-βινυλικού πολυεστέρα, Ethylene-vinyl acetate copolymer, EVAc) σύμφωνα με τους Mylonas and Zohar (2001), δοσολογίας $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ στον πλάγιο μυ κάτω από το δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο (Εικόνα 8) με διάστημα περίπου είκοσι ημερών μεταξύ των χορηγήσεων. Και τις τρεις ημέρες πραγματοποίησης της θεραπείας των εμφυτευμάτων στα θηλυκά, χορηγήθηκε εμφύτευμα GnRHa ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) και στα τέσσερα αρσενικά άτομα για να βελτιωθεί η ποιότητα και να μεγιστοποιηθεί η ποσότητα του σπέρματος.



Εικόνα 7. Χορήγηση θεραπείας GnRHα σε ενέσιμη μορφή στην βάση του πίσω μέρους του δεύτερου ραχιαίου πτερυγίου σε θηλυκό κρανιό.



Εικόνα 8. Χορήγηση θεραπείας GnRHα σε μορφή εμφυτεύματος στον πλάγιο μυ κάτω από το δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο σε θηλυκό κρυνιό.

Στη συνέχεια, τα ψάρια τοποθετήθηκαν ανά ζευγάρια (θηλυκό-αρσενικό) σε 4 ορθογώνιες δεξαμενές των 5 m³ όπου και αφήθηκαν να γεννήσουν (Εικόνα 9). Η διατροφή των κρυνιών κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου περιελάμβανε καθημερινά βιομηχανική τροφή (Vitalis-Repro 9.0 mm, SKRETTING), ενώ η καταμέτρηση της θερμοκρασίας (°C) καθώς και του οξυγόνου (saturation %) στο νερό γινόταν μία φορά την εβδομάδα.

Από όλα τα εξεταζόμενα άτομα πάρθηκε δείγμα αίματος τις ημερομηνίες χορήγησης των τριών εμφυτευμάτων. Η δειγματοληψία του αίματος πραγματοποιήθηκε από την ουραία φλέβα/αρτηρία των ψαριών, με χρήση σύριγγας των 2.5 ml εμποτισμένη σε ηπαρίνη για να αποφευχθεί η θρόμβωσή του. Το αίμα τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo) στις 6.000 στροφές και στη συνέχεια συλλέχθηκε το πλάσμα που αποθηκεύτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι την ποσοτικοποίηση των στεροειδών ορμονών. Για την ποσοτικοποίηση της E₂, της T και της 11-KT στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκε ενζυμική ανοσοανάλυση (enzyme-linked immunoassay, ELISA) σύμφωνα με τους (Cuisset et al. 1994; Nash et al. 2000) με ορισμένες τροποποιήσεις, και με αντιδραστήρια από τη SpiBio (France). Για την εκχύλιση των παραπάνω 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, τοποθέτηση της οργανικής φάσης σε νέα δοχεία και παροχή αέριου αζώτου (Reacti-vap III, Pierce, Germany) ώστε να εξατμιστεί ο διαιθυλαιθέρας (Reacti-vap III, Pierce, Germany). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανασύσταση των δειγμάτων σε 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος (reaction buffer).

Στις 7 Μαΐου πραγματοποιήθηκε η χορήγηση της δεύτερης ένεσης GnRHα στους δύο θηλυκούς κρυνιούς, ενώ στους δύο αρσενικούς που βρίσκονταν στις ίδιες δεξαμενές, δεν χορηγήθηκε εμφύτευμα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έγινε σύμφωνα με τα παραπάνω. Στις 18 Μαΐου πραγματοποιήθηκε επανάληψη χορηγήσεων θεραπειών. Έτσι, ενέσεις (3^η φορά) και εμφυτεύματα GnRHα (2^η φορά) έγιναν στα θηλυκά άτομα ενώ εμφυτεύματα έγιναν σε όλα τα αρσενικά. Επιπρόσθετα, πάρθηκαν δείγματα αίματος από όλα τα άτομα σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία. Στις 28 Μαΐου έγινε η τέταρτη ένεση στα θηλυκά ψάρια, ενώ πάλι δεν πάρθηκαν δείγματα αίματος. Στις 8 Ιουνίου πραγματοποιήθηκε η τελευταία επανάληψη χορήγησης θεραπειών, ενέσεις (5^η φορά) και εμφυτεύματα (3^η φορά) στα

θηλυκά άτομα και εμφυτεύματα σε όλα τα αρσενικά. Ακόμη πάρθηκαν δείγματα αίματος από όλα τα άτομα. Τέλος στις 20 Ιουνίου πραγματοποιήθηκε η τελευταία δειγματοληψία καθώς οι κρανιοί βρίσκονταν στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου τους.



Εικόνα 9. Ορθογώνιες δεξαμενές (n=4) των 5 m³ όπου φιλοξένησαν τα υπό μελέτη άτομα συνδεδεμένες με δεξαμενές-συλλέκτες των αυγών. Κάθε δεξαμενή περιείχε ένα θηλυκό και ένα αρσενικό κρανιό χωρίς να γίνεται ανταλλαγή συντρόφων.

3.1.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΥΓΩΝ

Η συλλογή των αυγών από κάθε δεξαμενή αναπαραγωγής πραγματοποιούνταν από ένα παθητικό σύστημα παγίδευσης των αυγών από το εξερχόμενο νερό. Τα αυγά μαζεύονταν με απόχη από το συλλέκτη και συγκεντρώνονταν σε δοχείο των 10 l. Στη συνέχεια γινόταν έντονο ανακάτεμα των αυγών στο νερό με την χρήση πιπέτας 10 ml, για τον ομοιόμορφο καταμερισμό τους στο δοχείο, και παίρνονταν δείγμα 10 ml με την ίδια πιπέτα. Ακολουθούσε εξέταση του δείγματος με τη χρήση στερεοσκοπίου (SZH-ILLK, OLYMPUS OPTICAL CO.LTD.) για την εκτίμηση του αριθμού των αυγών (γονιμότητα, fecundity), μετρώντας τα ζωντανά αυγά (επιπλέοντα, διαυγή, με εμφανές το αναπτυσσόμενο έμβρυο) και τα νεκρά αυγά (στον πυθμένα, θολά, με νεκρό ή καθόλου έμβρυο) και ανάγοντάς τα στα 10 l. Το ποσοστό γονιμοποιημένων αυγών (ποσοστό γονιμοποίησης, % fertilization) υπολογίστηκε από τον αριθμό των ζωντανών αυγών/εμβρύων ως προς το σύνολο των αυγών στο δείγμα των 10 ml.

Για την εκτίμηση της ποιότητας των αυγών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των πλακών μικροτιτλοδότησης (microtiter plates, mct plates) (Panini *et al.*, 2001). Κάθε πλάκα αποτελούνταν από 96 θήκες και κάθε μία από αυτές περιείχε 200 μl αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και ένα ζωντανό αυγό όπου για 5 ημέρες παρακολουθούνταν τα αυγά/νύμφες για να υπολογιστεί το ποσοστό εκκόλαψης, καθώς και η επιβίωση των νυμφών. Με αυτή τη μέθοδο πολλές διαφορετικές παρτίδες αυγών μπόρεσαν να διατηρηθούν ξεχωριστά σε ένα πολύ μικρό θερμοελεγχόμενο χώρο που διατηρούσε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος σταθερή και ίδια με την θερμοκρασία ωοτοκίας. Επιπλέον, ήταν εύκολη και γρήγορη η καθημερινή παρακολούθηση των εμβρύων/νυμφών, καθώς η εξέταση γινόταν με τη χρήση στερεοσκοπίου και δεδομένου ότι κάθε έμβρυο τοποθετούνταν ξεχωριστά σε ξεχωριστό πηγαδάκι, ήταν δυνατή η παρακολούθηση του καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του.

Για την τοποθέτηση των αυγών στις πλάκες μικροτιτλοδότησης σταματούσε για 5 λεπτά η παροχή αερισμού στο δοχείο των 10 l όπου συλλέγονταν τα αυγά κάθε ωοτοκίας, ώστε να διαχωριστούν τα επιπλέοντα (ζωντανά) από τα βυθιζόμενα (νεκρά) αυγά. Ένας αριθμός από τα επιπλέοντα αυγά (~500-700) τοποθετούνταν σε γυάλινο δοχείο 1,500 ml με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό όπου παρέμεναν για μερικά λεπτά, πάλι για να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των ζωντανών αυγών. Στη συνέχεια, μετά από πλύση με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό τα ζωντανά αυγά τοποθετούνταν εκ νέου σε καθαρό γυάλινο δοχείο 500 ml με αποστειρωμένο

θαλασσινό νερό. Έπειτα, περίπου 300 από τα αυγά μεταφέρονταν σε δισκίο Petri προκειμένου να τοποθετηθούν ατομικά στα πηγαδάκια των πλακών μικροτιτλοδότησης

3.1.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Διαφορές μεταξύ (α) των δύο μεθόδων πρόκλησης ωοτοκίας (GnRHα ένεσης ή εμφυτεύματα) ή (β) των επαναληπτικών θεραπειών της κάθε μεθόδου όσον αφορά τη γονιμότητα, τη γονιμοποίηση και την ποιότητα των αυγών, αναλύθηκαν με One-way ANOVA, η οποία ακολουθούταν από τη διαδικασία πολλαπλών συγκρίσεων Duncan's New Multiple Range (DNMR) με επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. Διαφορές στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών στο πλάσμα αναλύθηκαν με Two-way (δειγματοληψία x θεραπεία) ANOVA με επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού SuperAnova (Abacus Concepts, Inc., USA) και SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc., USA), ενώ τα γραφήματα έγιναν με τη βοήθεια του λογισμικού DeltaGraph 5 (Red Rock Software, Inc., USA).

3.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΩΝ ΩΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. από τις 29 έως τις 31 Μαΐου του 2012. Στις 29 Μαΐου επιλέχθηκαν τρία θηλυκά μετά από βιοψία ωοκυττάρων, και τους χορηγήθηκε ορμονική θεραπεία. Στα δύο ψάρια χορηγήθηκε εμφύτευμα GnRH α (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ενώ στο τρίτο ένεση GnRH α (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Τα τρία ψάρια παρέμεναν όλα μαζί σε δεξαμενή 2 m³ καθόλη τη διάρκεια του πειράματος από τις 29 μέχρι τις 31 Μαΐου.

Η πρώτη δειγματοληψία βιοψιών πραγματοποιήθηκε στις 30 Μαΐου, 24 h μετά την χορήγηση των ορμονών. Στις δειγματοληψίες που ακολούθησαν, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν 29 h και 35 h από τη διαλογή των κρانيών και τη χορήγηση των θεραπειών τους, πάρθηκαν βιοψίες ωοκυττάρων μόνο από τους δύο κρانيούς που είχαν τη θεραπεία με το εμφύτευμα. Στις φωτογραφίες της βιοψίας, προστέθηκε, διάλυμα αιθανόλης, φορμόλης και κρυσταλλικού οξικού οξέος (6:3:1, EFA), κάνοντας με αυτόν τον τρόπο διαφανές το κυτταρόπλασμα και πιο εμφανή την θέση του πυρήνα και την δομή των σταγονιδίων λίπους. Στις 31 Μαΐου, 50 h μετά τη χορήγηση των ορμονών, πραγματοποιήθηκε η τελευταία δειγματοληψία όπου και πάρθηκαν αυγά από όλα τα ψάρια.

Στα αυγά που συλλέχθηκαν 50 h μετά την θεραπεία με GnRH α , πραγματοποιήθηκε τεχνητή γονιμοποίηση, αν και δεν αναμενόταν να υπάρξει επιτυχία, αφού η ωορρηξία είχε πραγματοποιηθεί αρκετές ώρες νωρίτερα. Από τα δύο ψάρια πάρθηκαν 400 gr και 40 gr αυγά, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, αναμειχθηκε δείγμα σπέρματος από προηγούμενη δειγματοληψία από 2 διαφορετικά αρσενικά άτομα. Οι κινήσεις ανάμειξης ήταν απαλές και κυκλικές ενώ προστέθηκε και θαλασσινό νερό (Εικόνα 10). Έπειτα, μεταφέρθηκαν σε επωαστήρες όπου την επόμενη ημέρα πάρθηκε δείγμα για να αξιολογηθεί το ποσοστό γονιμοποίησης μέσω της επιβίωση των αυγών (Εικόνα 11).



Εικόνα 10. Τεχνητή γονιμοποίηση. Συλλογή αυγών με απαλές μαλάξεις της κοιλιακής χώρας (Α), τοποθέτηση (Β) και μίξη σπέρματος με τα ωοκύτταρα (Γ) και προσθήκη θαλασσινού νερού (Δ).



Εικόνα 11. Κυκλικές δεξαμενές χωρητικότητας 300 l όπου επωάζουν τα αυγά (επωαστήρες).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

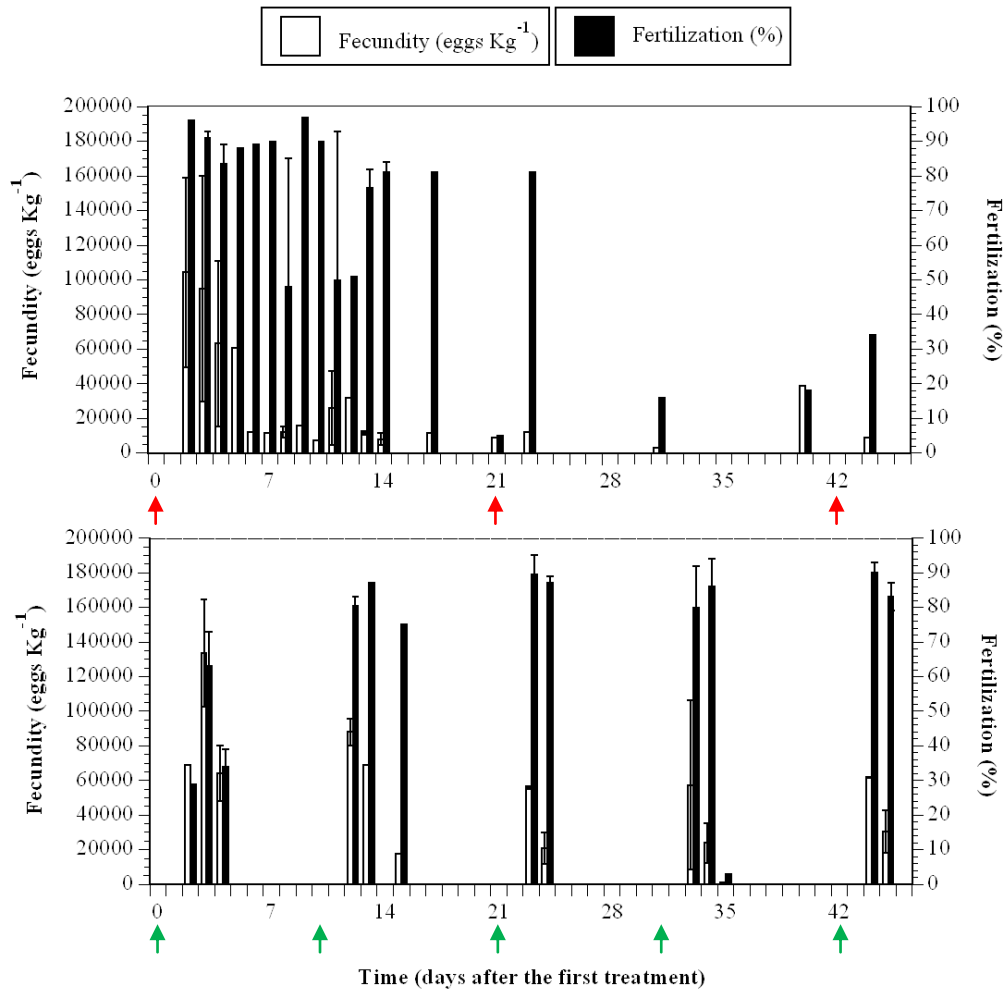
4.1 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΤΟΚΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΕΣΕΩΝ Η ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ GnRHa

Μετά τη χορήγηση κάθε ενέσιμης θεραπείας ή θεραπείας εμφυτεύματος GnRHa, η ωοτοκία πραγματοποιούνταν έπειτα από δύο ημέρες (Εικόνα 12). Η κινητική της ωοτοκίας διέφερε μεταξύ των δύο ορμονικών θεραπειών. Έπειτα από κάθε ένεση GnRHa οι κρانيοί ωοτοκούσαν δύο ή τρεις ημέρες. Έπειτα από τη χορήγηση του πρώτου εμφυτεύματος ακολούθησαν 15 συνεχόμενες ημέρες ωοτοκίας, μετά το δεύτερο οι κρانيοί ωοτόκησαν μόνο για τρεις ημέρες με αρκετές ημέρες διαφορά μεταξύ τους και μετά το τρίτο πραγματοποιήθηκε μόνο μία ημέρα ωοτοκίας (Εικόνα 12).

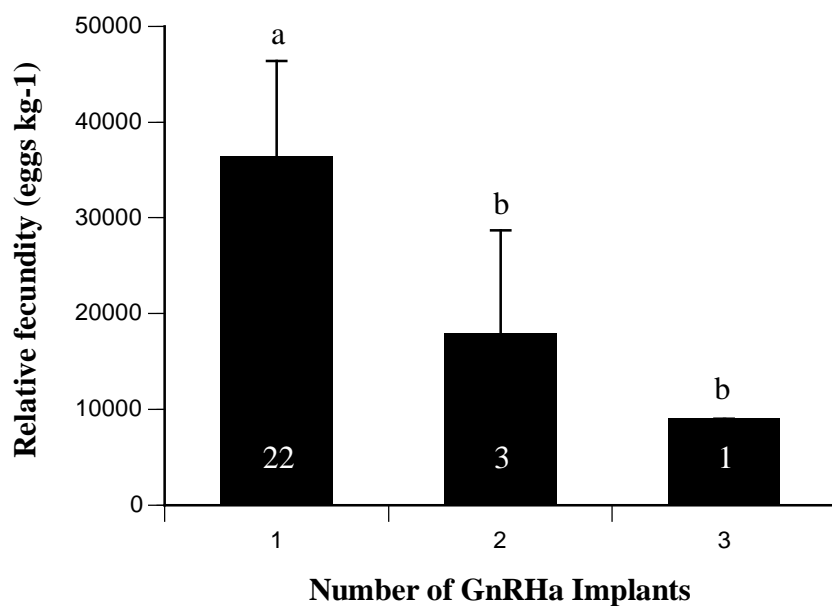
Η ημερήσια σχετική γονιμότητα (αυγά kg^{-1}) των θηλυκών ατόμων που επετεύχθη στο πρώτο εμφύτευμα ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τη χορήγηση τόσο του δεύτερου ($P < 0.05$), όσο και του τρίτου εμφυτεύματος ($P < 0.05$) (Εικόνα 13). Η μέση τιμή (\pm SEM) ήταν $36,393 \pm 9,993$, $17,928 \pm 10,740$ και $8,971 \pm 0$ για το πρώτο, δεύτερο και τρίτο εμφύτευμα αντίστοιχα. Στα θηλυκά άτομα με τις χορηγήσεις των ενέσεων, η σχετική γονιμότητα ήταν $92,992 \pm 19,945$, $65,764 \pm 16,887$, $38,477 \pm 10,698$, $32,748 \pm 19,257$ και $46,235 \pm 10,344$ μετά τη δράση της πρώτης, της δεύτερης, της τρίτης, της τέταρτης και της πέμπτης ένεσης, αντίστοιχα και δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις διαφορετικές χορηγήσεις των ενέσεων (Εικόνα 14).

Η συνολική σχετική γονιμότητα στους θηλυκούς κρانيούς με τη χορήγηση των ενέσεων ήταν μεγαλύτερη ($P < 0.05$) με μέση τιμή (\pm SEM) $55,936 \pm 8,450$ που επετεύχθη σε συνολικά 45 ημέρες, έναντι της θεραπείας των εμφυτευμάτων GnRHa με $33,207 \pm 8,623$ σε συνολικά 44 ημέρες. Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται οι τιμές της σχετικής γονιμότητας και του ποσοστού γονιμοποίησης της θεραπείας με εμφυτεύματα (Εικόνα 15A) και της θεραπείας με ενέσεις (Εικόνα 15B) ανά περίοδο 10 ημερών, η οποία αντιστοιχεί στο διάστημα χορήγησης των ενέσεων. Συγκρίνοντας τη μέση σχετική γονιμότητα των δύο θεραπειών ανά δέκα ημέρες φάνηκε πως υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, με τις ενέσεις GnRHa να παρουσιάζουν σε σχέση με τα εμφυτεύματα μεγαλύτερες τιμές ($55,243 \pm 15,426$ έναντι $22,065 \pm 8,117$), ενώ παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά και ως προς τις διαφορετικές περιόδους (Εικόνα 16). Ομοίως για το ποσοστό γονιμοποίησης υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των θεραπειών, με τις ενέσεις GnRHa να παρουσιάζουν σε σχέση με

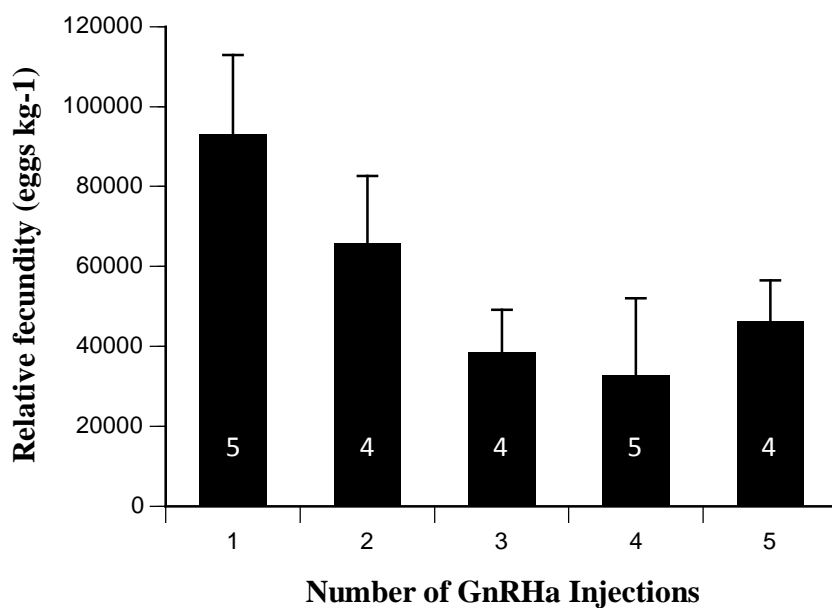
τα εμφυτεύματα μεγαλύτερες τιμές (73 ± 7 έναντι 50 ± 11). Επίσης υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ της αλληλεπίδρασης των θεραπειών με τις περιόδους (Εικόνα 17).



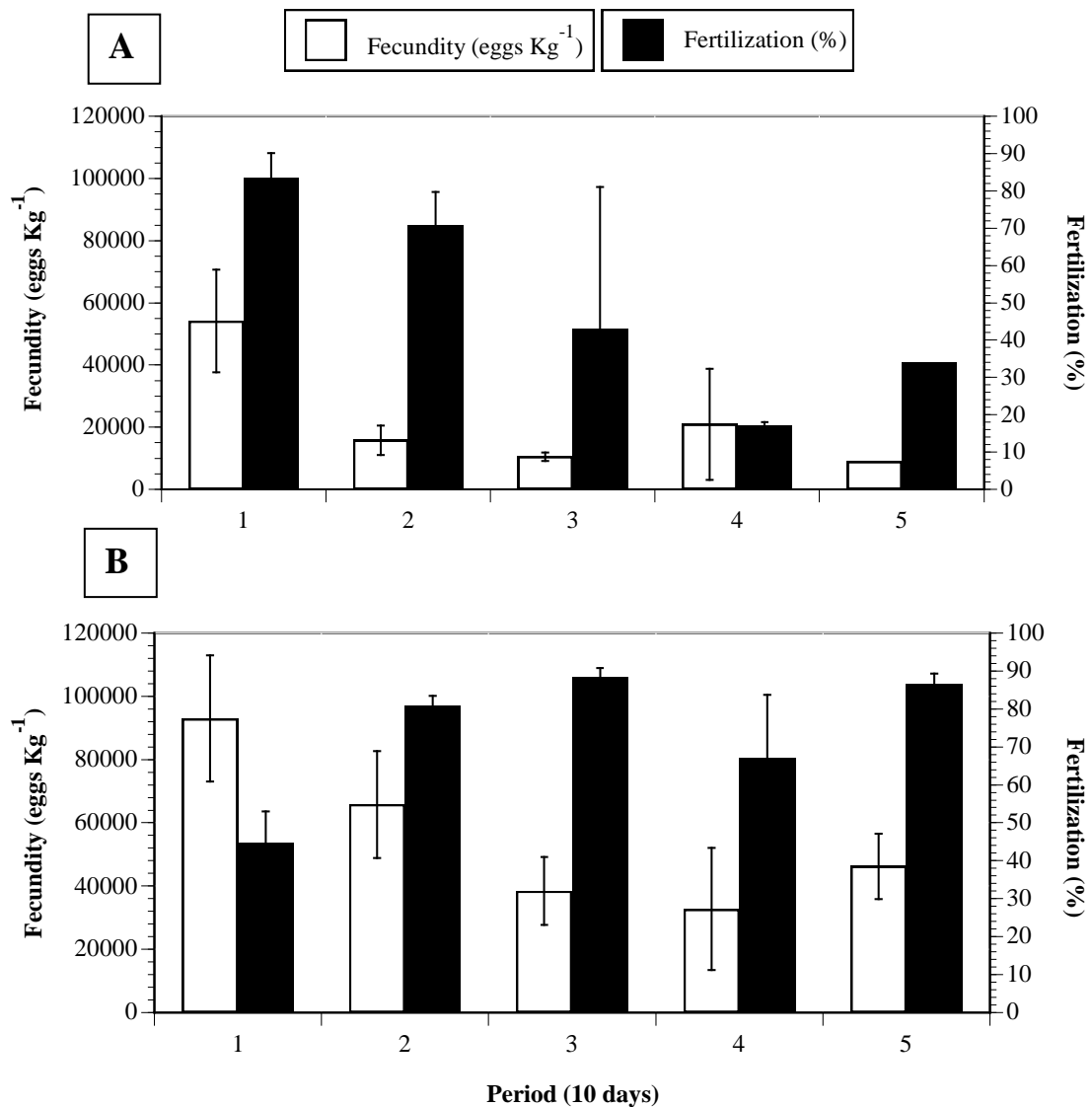
Εικόνα 12. Συγκριτική παρουσίαση της κινητικής της ωοτοκίας των δύο θεραπειών. Καθημερινή σχετική γονιμότητα και ποσοστό γονιμοποίησης μετά από θεραπεία κρανίων (n =2) με ενέσεις GnRHα (πράσινα βέλη) ή εμφυτεύματα (κόκκινα βέλη) κατά τη διάρκεια Απριλίου – Ιουνίου 2012.



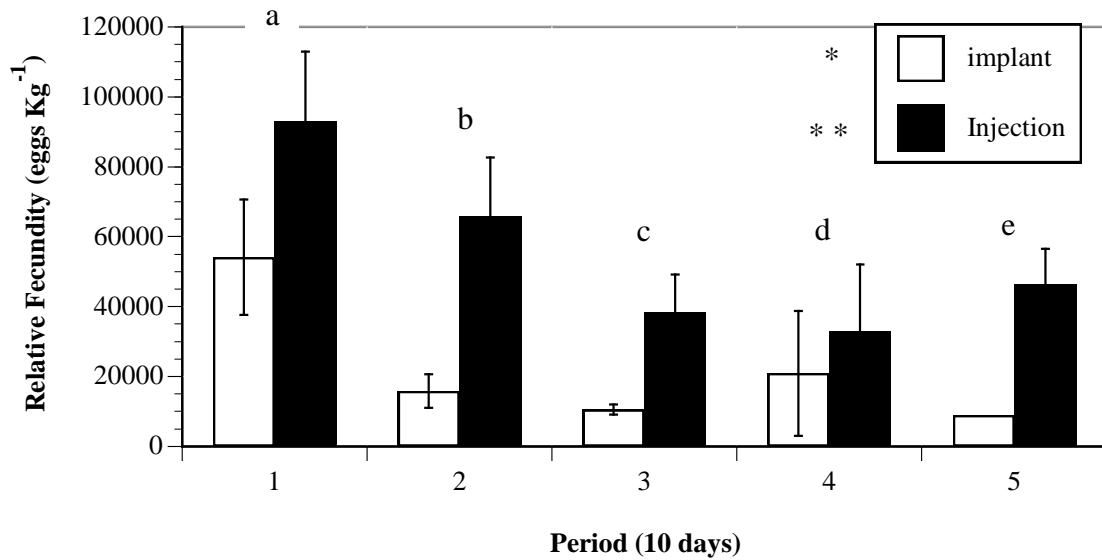
Εικόνα 13. Ημερήσια σχετική γονιμότητα (eggs kg⁻¹) ανά χορήγηση εμφυτεύματος. Η χορήγηση των εμφυτευμάτων χρονικά διέφερε 20 ημέρες περίπου. Τα νούμερα μέσα στις μπάρες δηλώνουν τις ωοτοκίες ανά χορήγηση εμφυτεύματος. Το γράμμα a πάνω από τη μπάρα του πρώτου εμφυτεύματος δηλώνει ότι διαφέρει σημαντικά τόσο από το δεύτερο ($P < 0.05$) όσο και από το τρίτο εμφύτευμα ($P < 0.05$).



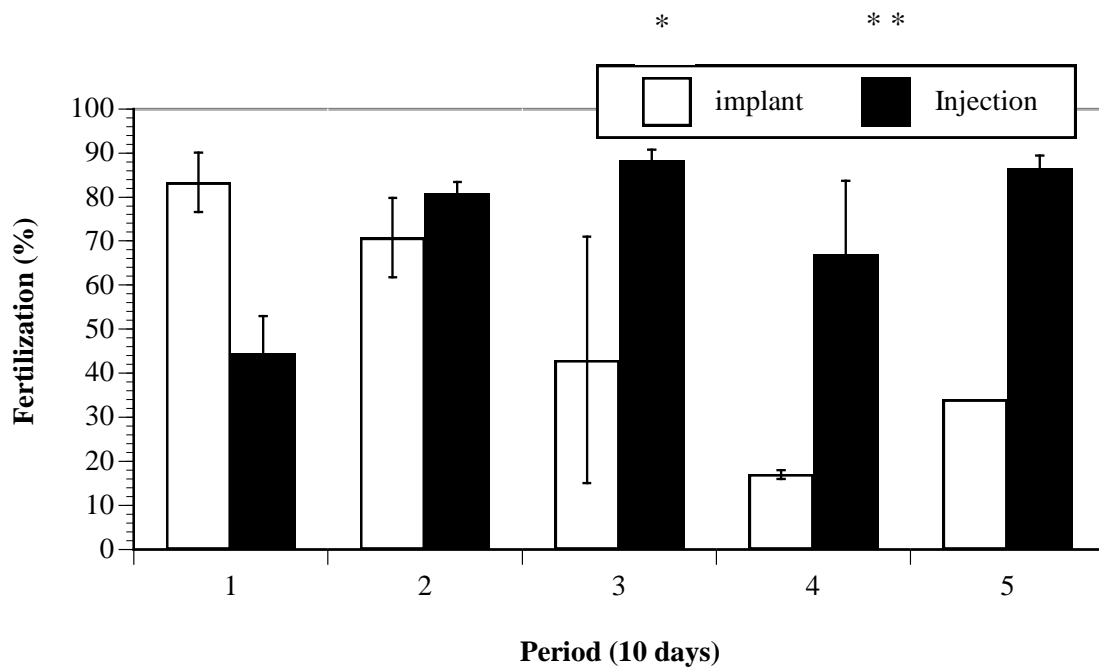
Εικόνα 14. Ημερήσια σχετική γονιμότητα (eggs kg⁻¹) ανά χορήγηση ένεσης. Η χορήγηση των ενέσεων χρονικά διέφερε 10 ημέρες περίπου. Τα νούμερα μέσα στις μπάρες δηλώνουν τις ωτοκίες ανά χορήγηση ένεσης. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών από τις διαφορετικές θεραπείες με ενέσεις ($P = 0.102$).



Εικόνα 15. Μέση ημερήσια σχετική γονιμότητα και ποσοστό γονιμοποίησης ανά δέκα ημέρες (χρονικό διάστημα χορήγησης των ενέσεων) των εμφυτευμάτων (A) και των ενέσεων (B) GnRHα κατά τη διάρκεια Απριλίου – Ιουνίου.



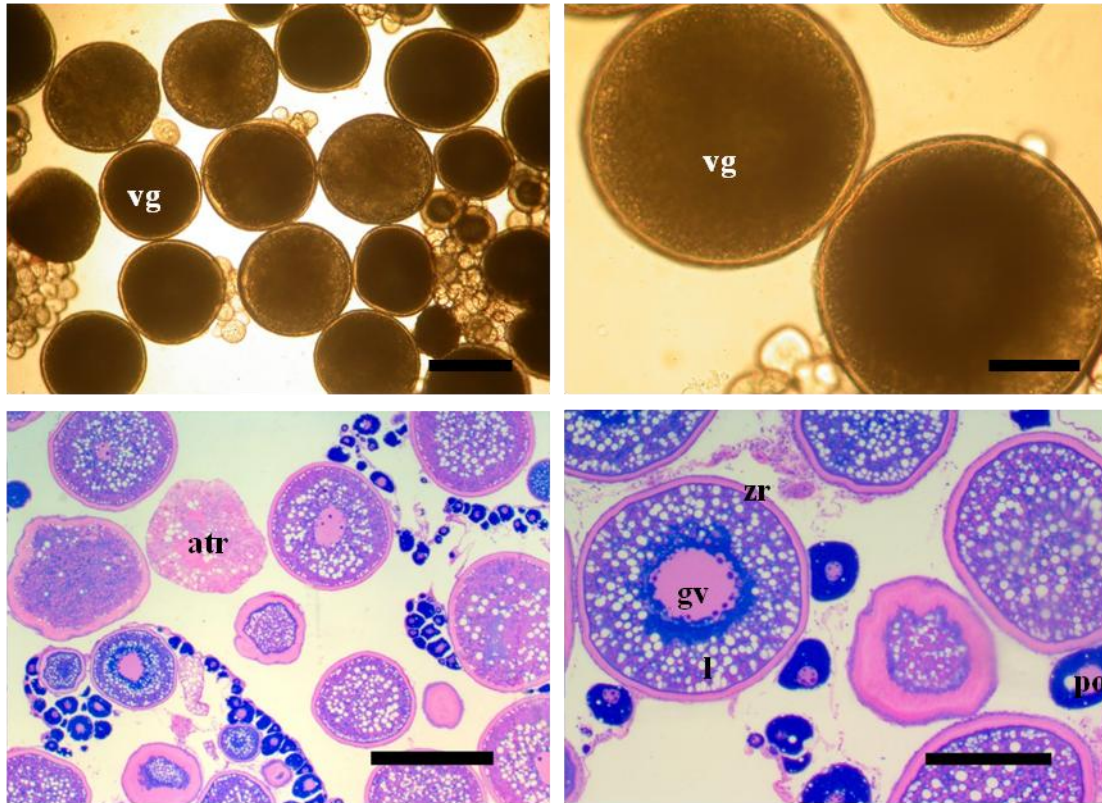
Εικόνα 16. Μέση ημερήσια σχετική γονιμότητα ανά δέκα ημέρες (ημέρες χορήγησης των ενέσεων) των δύο θεραπειών, ενέσεων ή εμφυτευμάτων GnRHα. Υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών ($P < 0.05$) και μεταξύ των διαφορετικών περιόδων ($P < 0.05$). Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ της αλληλεπίδρασης των θεραπειών με τις διαφορετικές περιόδους ($P = 0.916$).



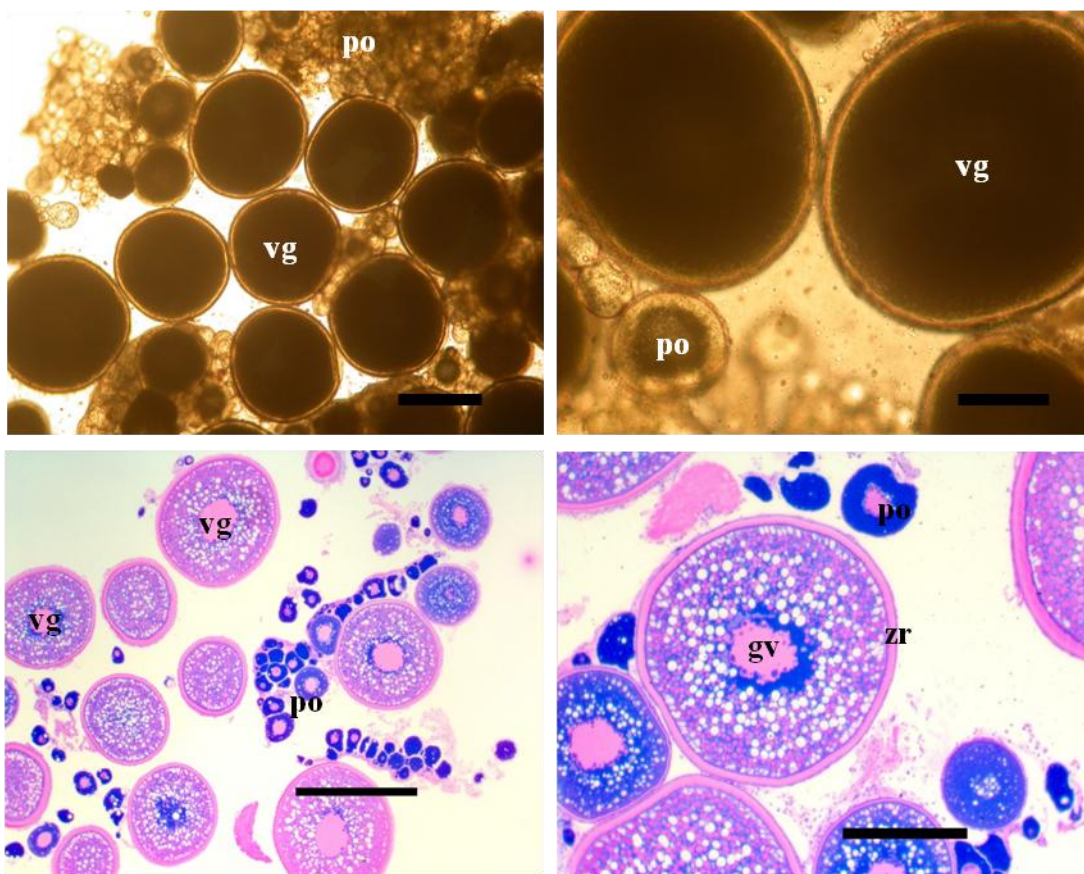
Εικόνα 17. Ποσοστό γονιμοποίησης ανά δέκα ημέρες (ημέρες χορήγησης των ενέσεων) των δύο θεραπειών, ενέσεων ή εμφυτευμάτων GnRHα. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών ($P < 0.05$) αλλά δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των περιόδων ($P = 0.132$). Τέλος, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ της αλληλεπίδρασης των θεραπειών με τις διαφορετικές περιόδους ($P < 0.05$).

Από την λήψη φωτογραφιών των βιοψιών ωοκυττάρων καθώς και από την ιστολογική τους εξέταση, φαίνεται πως κατά την έναρξη των θεραπειών (27/04/2012) τα λεκιθικά ωοκύτταρα καταλάμβαναν το μεγαλύτερο μέρος της ωοθήκης με μέση διάμετρο (\pm SD) $648 \pm 13 \mu\text{m}$ ενώ η παρουσία των πρωτογενών ήταν εμφανής (Εικόνα 18). Πριν τη δεύτερη και τρίτη χορήγηση ένεσης η ωοθήκη περιείχε λεκιθικά ωοκύτταρα με μέση διάμετρο 600 ± 0 και $645 \pm 7 \mu\text{m}$, αντίστοιχα (Εικόνα 19). Πριν την τέταρτη χορήγηση της ένεσης παρατηρήθηκαν λεκιθικά με μέση διάμετρο $580 \pm 71 \mu\text{m}$ και περιορισμένα ωοκύτταρα στη φάση της ωορρηξίας (Εικόνα 20). Πριν την τελευταία χορήγηση της θεραπείας των ενέσεων παρατηρήθηκαν λεκιθικά ωοκύτταρα με μέση διάμετρο $600 \pm 28 \mu\text{m}$ (Εικόνα 21). Σε όλες τις δειγματοληψίες, στις βιοψίες ήταν εμφανής και ένας σημαντικός αριθμός πρωτογενών ωοκυττάρων.

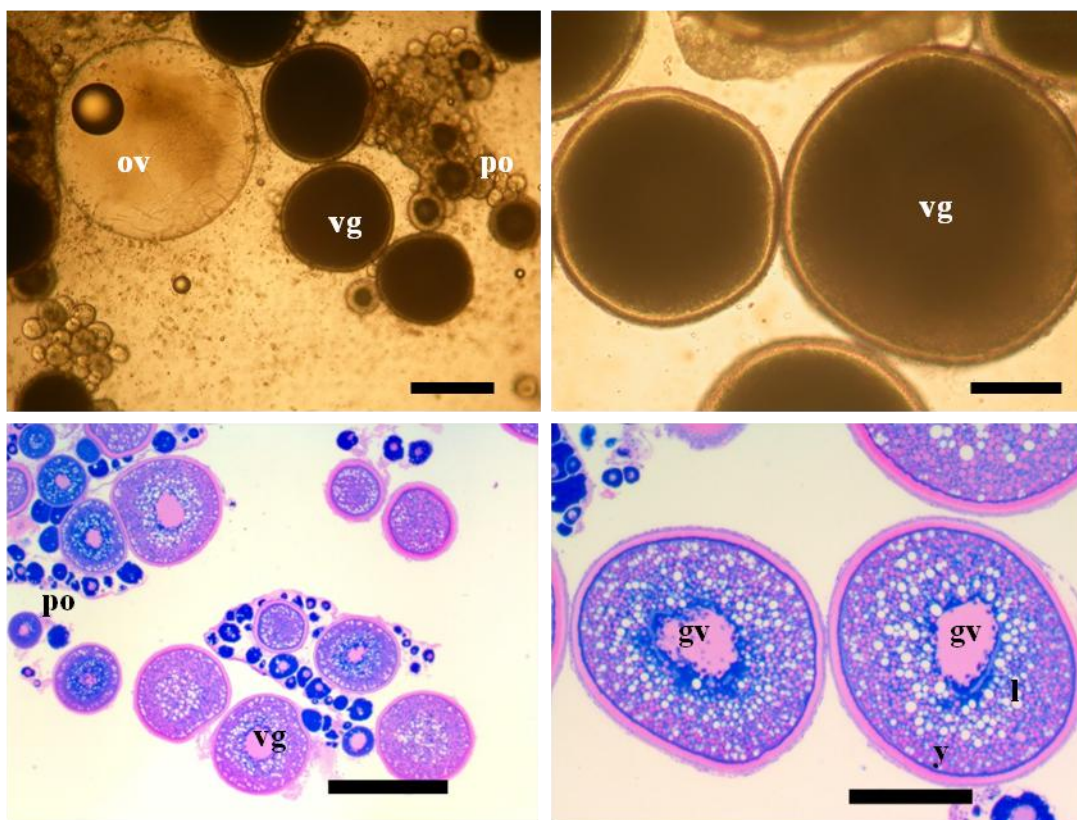
Πριν τη δεύτερη και τρίτη χορήγηση της θεραπείας των εμφυτευμάτων, παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός πρωτογενών ωοκυττάρων και κάποιων ωοκυττάρων στη φάση της ωορρηξίας με κεντρικά τοποθετημένη τη σταγόνα λιπιδίου, ενώ ήταν περιορισμένα τα λεκιθικά ωοκύτταρα με μέση διάμετρο (\pm SD) 615 ± 21 και 630 ± 71 , για την δεύτερη και τρίτη χορήγηση της θεραπείας, αντίστοιχα (Εικόνες 22 και 23).



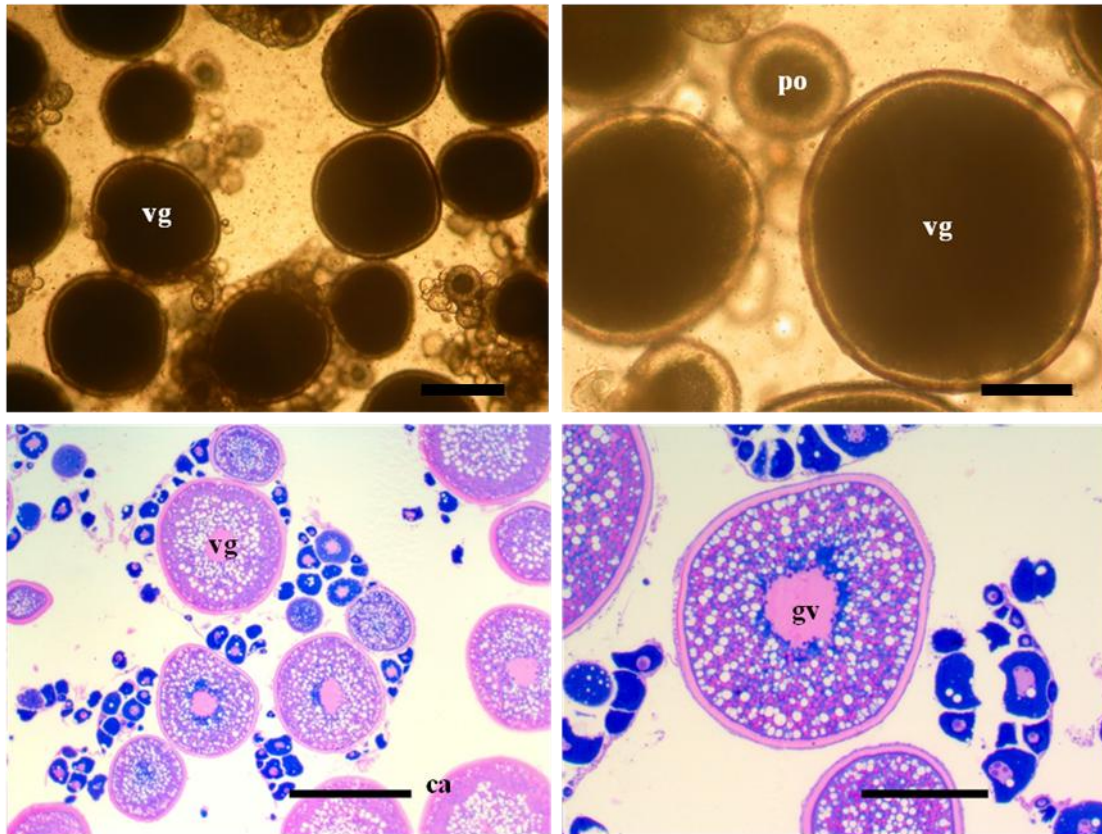
Εικόνα 18. Φωτογραφίες βιοψίας και ιστολογίας ωοκυττάρων πριν τη χορήγηση θεραπειών με ένεση ή εμφύτευμα GnRHα (27/04/2012). Στην αριστερή στήλη οι μπάρες αναπαριστούν τα 500 μm και στη δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes, po), ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (post-vitellogenic oocytes, vg), και λεκιθικά ωοκύτταρα στη φάση της απόπτωσης (atretic oocytes, atr). Ακόμη, διακρίνονται ο πυρήνας (germinal vesicle, gv), σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l) και η διάφανη ζώνη (zona radiata, zr).



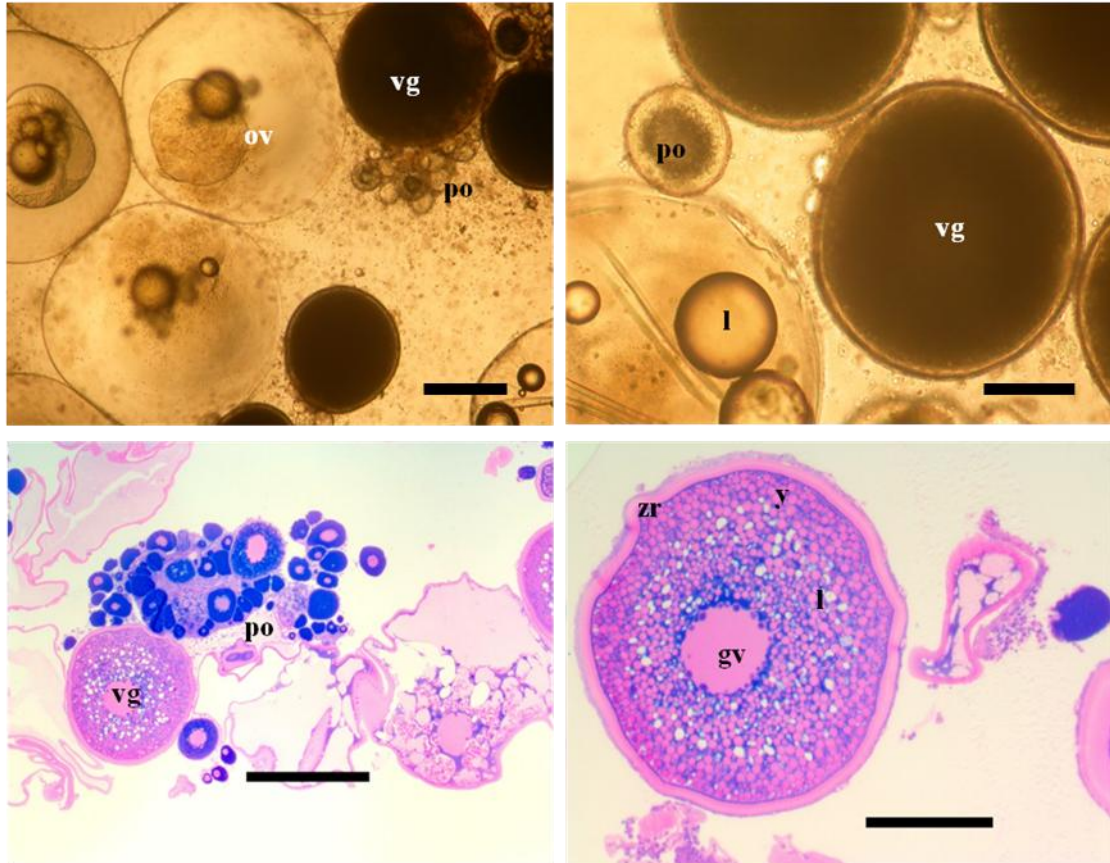
Εικόνα 19. Φωτογραφίες βιοψίας και ιστολογίας ωοκυττάρων πριν τη δεύτερη (7/05/2012) και την τρίτη χορήγηση θεραπείας με ένεση GnRHα (18/05/2012). Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στη δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes, po) και ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (post-vitellogenic oocytes, vg). Ακόμη, διακρίνονται ο πυρήνας (germinal vesicle, gv) και η διάφανη ζώνη (zona radiata, zr).



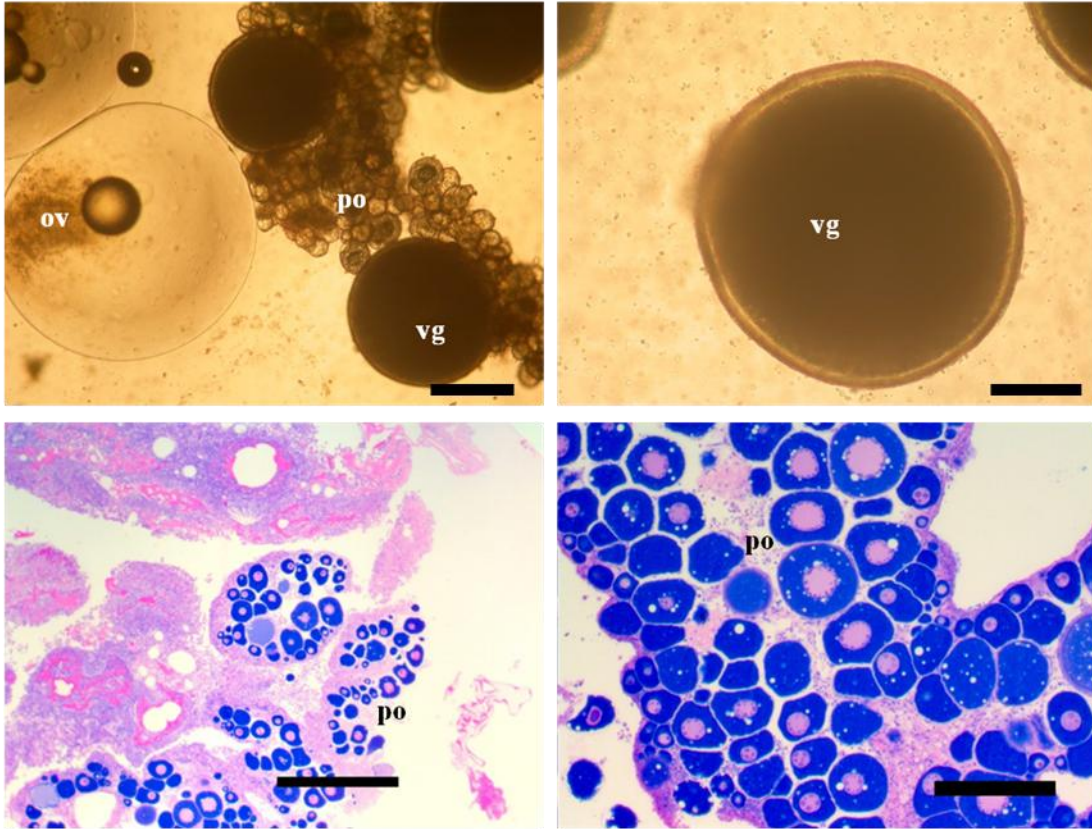
Εικόνα 20. Φωτογραφίες βιοψίας και ιστολογίας ωοκυττάρων πριν την τέταρτη χορήγηση θεραπείας με ένεση GnRHα (28/05/2012). Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στη δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes, po), ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (post-vitellogenic oocytes, vg) και ωοκύτταρα στη φάση της ωορρηξίας (oocyte ovulation, ov). Ακόμη, διακρίνονται ο πυρήνας (germinal vesicle, gv), σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l) και τα λεκιθικά κυστίδια (yolk globules, y).



Εικόνα 21. Φωτογραφίες βιοψίας και ιστολογίας ωοκυττάρων πριν την πέμπτη χορήγηση θεραπείας με ένεση GnRH α (8/06/2012). Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μ m και στη δεξιά τα 200 μ m. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes, po) και ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vitellogenic oocytes, vg). Ακόμη, διακρίνονται ο πυρήνας (germinal vesicle, gv) και φλοιϊκά κυστίδια (cortical alveoli, ca).



Εικόνα 22. Φωτογραφίες βιοψίας και ιστολογίας ωοκυττάρων πριν τη δεύτερη χορήγηση θεραπείας με εμφύτευμα GnRHα (18/05/2012). Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στη δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes, po), ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (post-vitellogenic oocytes, vg) και ωοκύτταρα στη φάση της ωορρηξίας (oocyte ovulation, ov). Ακόμη, διακρίνονται: πυρήνας (germinal vesicle, gv), σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l), λεκιθικά σφαιρίδια (yolk globules, y) και η διάφανη ζώνη (zona radiata, zr).



Εικόνα 23. Φωτογραφίες βιοψίας και ιστολογίας ωοκυττάρων πριν τη τρίτη χορήγηση θεραπείας με εμφύτευμα GnRHα (8/06/2012). Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στη δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes, po), ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vitellogenic oocytes, vg) και αυγά μετά την ωορρηξία (ovulation, ov).

Από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο τα επίπεδα της E₂ στο πλάσμα του αίματος των θηλυκών ατόμων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών αλλά ούτε και στις διαφορετικές ημερομηνίες μέσα σε κάθε θεραπεία (Πίνακας 1, Εικόνα 24). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις της T στο πλάσμα του αίματος των θηλυκών ατόμων, παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές στα άτομα τα οποία χορηγήθηκαν με ενέσεις GnRHα.

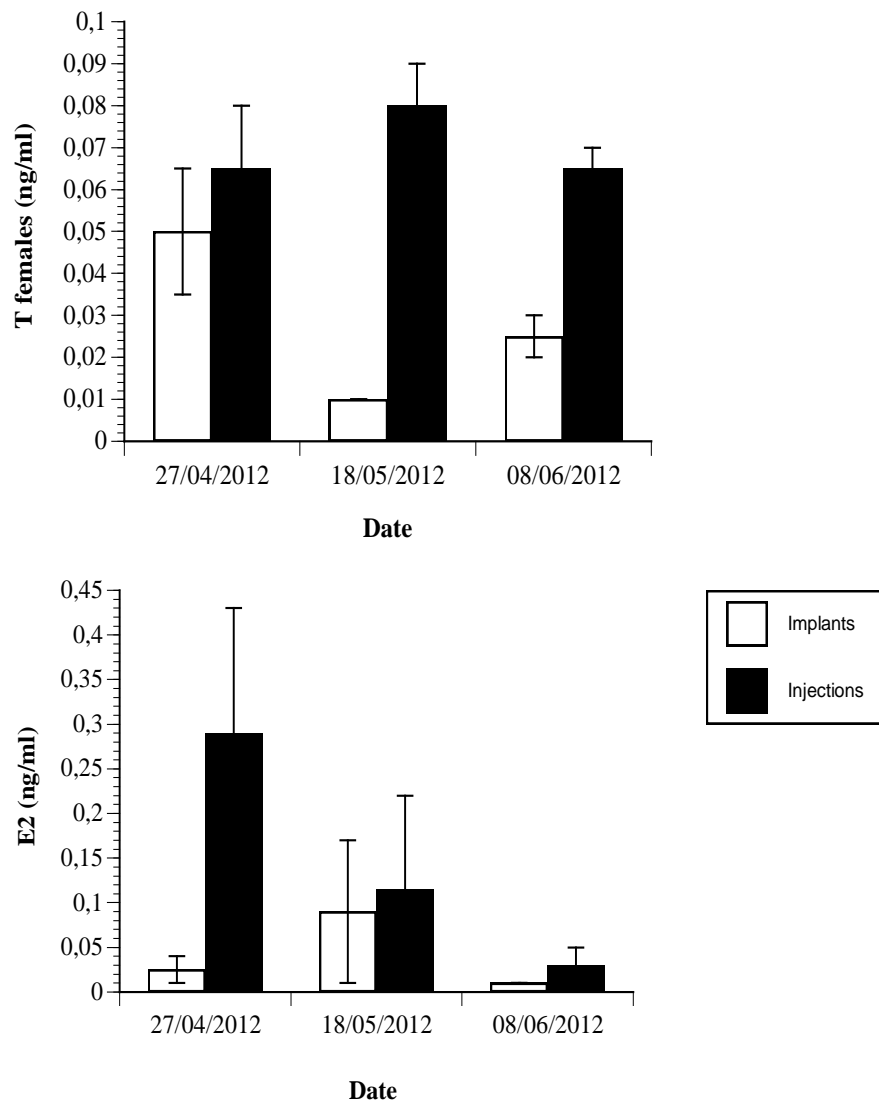
Από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο τα επίπεδα της T και 11-KT στο πλάσμα του αίματος των αρσενικών ατόμων, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών αλλά ούτε και στις διαφορετικές ημερομηνίες μέσα σε κάθε θεραπεία (Πίνακας 2, Εικόνα 25).

Πίνακας 1. Μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα και επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$) στις συγκεντρώσεις στεροειδών ορμονών θηλυκών ατόμων για όλες τις δειγματοληψίες μεταξύ των δύο θεραπειών (ng ml^{-1}).

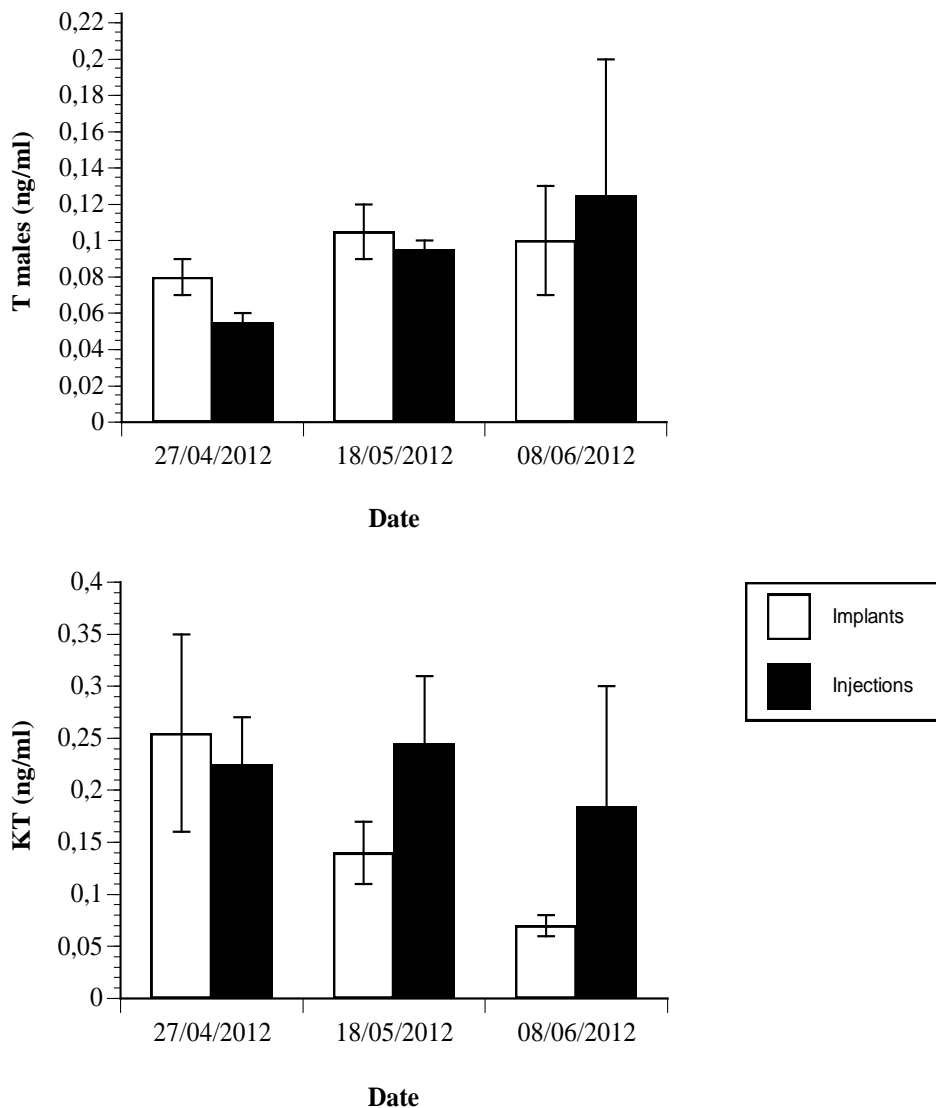
Παράμετρος	Εμφύτευμα	Ένεση	ANOVA
Τεστοστερόνη (T, ng/ml)	0.03 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	P < 0.05
Οιστραδιόλη (E2, ng/ml)	0.12 \pm 0.08	0.15 \pm 0.09	P > 0.05

Πίνακας 2. Μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα και επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 0.05$) στις συγκεντρώσεις στεροειδών ορμονών των αρσενικών ατόμων μεταξύ των δύο θεραπειών (ng ml^{-1}).

Παράμετρος	Εμφύτευμα	Ένεση	ANOVA
Τεστοστερόνη (T, ng/ml)	0.10 \pm 0.02	0.09 \pm 0.03	P > 0.05
Κετοτεστοστερόνη (11-KT, ng/ml)	0.16 \pm 0.05	0.22 \pm 0.08	P > 0.05

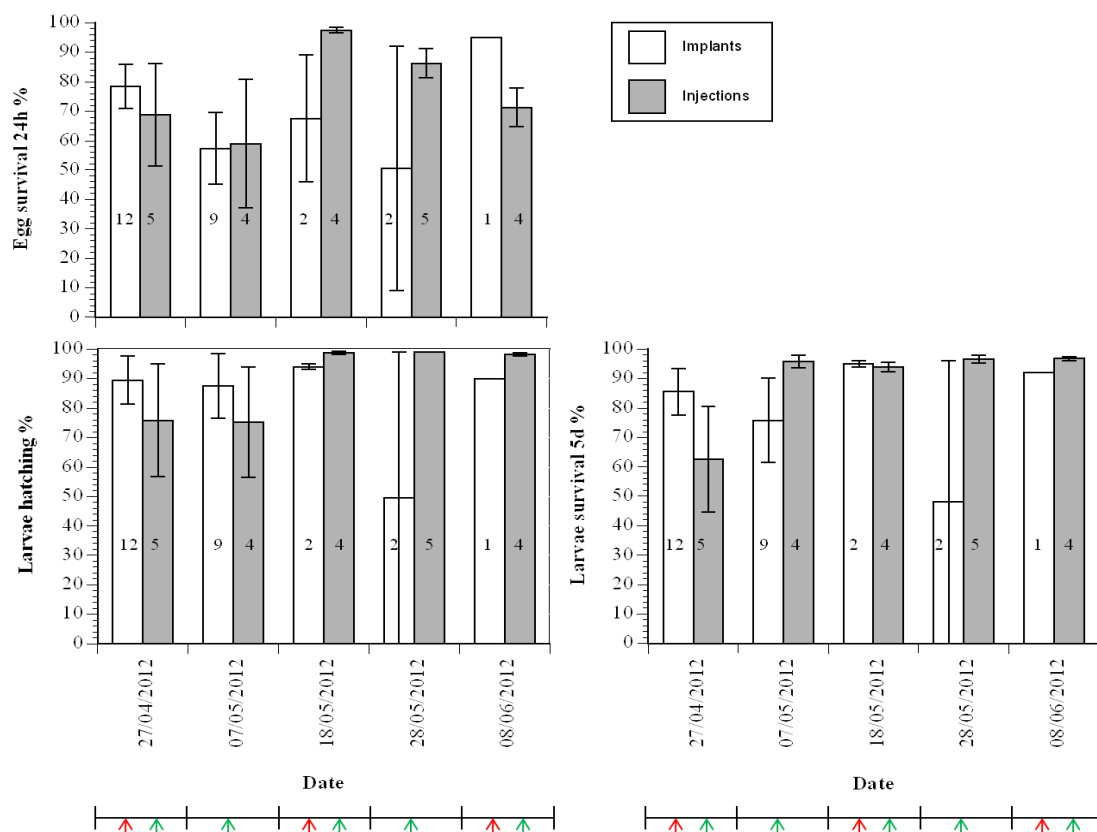


Εικόνα 24. Συγκεντρώσεις των ορμονών Τεστοστερόνης (T) και Οιστραδιόλης (E₂) στο πλάσμα αίματος θηλυκών κρυνίων, κατά την χορήγηση GnRHα με ενέσεις (1^η, 3^η, και 5^η ένεση) ή εμφυτεύματα (1^ο, 2^ο και 3^ο εμφύτευμα) σε τρεις ημερομηνίες. Οι ημερομηνίες δειγματοληψίας συμπίπτουν με τις ημερομηνίες χορήγησης των θεραπειών GnRHα σε μορφή εμφυτεύματος. Η περίοδος μεταξύ των επαναληπτικών δειγματοληψιών είναι περίπου 20 ημέρες. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών ως προς την T ($P < 0.05$), ενώ δεν παρατηρήθηκε ως προς την E₂ ($P = 0.161$). Ακόμα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ημερομηνιών ως προς τις T ($P = 0.296$) και E₂ ($P = 0.291$). Τέλος, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ της αλληλεπίδρασης των θεραπειών και των ημερομηνιών ως προς τις T ($P = 0.640$) και E₂ ($P = 0.284$).



Εικόνα 25. Συγκεντρώσεις των ορμονών Τεστοστερόνης (T) και 11-Κετοτεστοστερόνης (11-KT) στο πλάσμα αίματος αρσενικών κρανίων, κατά την χορήγηση GnRHα σε μορφή εμφυτεύματος σε τρεις ημερομηνίες. Οι ημερομηνίες δειγματοληψίας συμπίπτουν με τις ημερομηνίες χορήγησης των εμφυτευμάτων GnRHα στα θηλυκά. Η περίοδος μεταξύ των επαναληπτικών δειγματοληψιών είναι περίπου είκοσι ημέρες. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών ως προς τις T ($P = 0.908$) και 11-KT ($P = 0.311$). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ημερομηνιών ως προς τις T ($P = 0.442$) και 11-KT ($P = 0.340$). Τέλος, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ της αλληλεπίδρασης των θεραπειών και των ημερομηνιών ως προς τις T ($P = 0.760$) και 11-KT ($P = 0.548$).

Στη συνέχεια εξετάστηκαν τρεις δείκτες ποιότητας των αυγών, το ποσοστό επιβίωσης των αυγών/εμβρύων στις 24h, το ποσοστό εκκόλαψης και το ποσοστό επιβίωσης των νυμφών την 5^η ημέρα (Εικόνα 26). Φάνηκε πως δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δεικτών ως προς τις δύο διαφορετικές θεραπείες (Πίνακας 3). Επίσης, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε μεταξύ των ημερομηνιών αλλά και ούτε και υπήρξε αλληλεπίδραση των ημερομηνιών και των θεραπειών.



Εικόνα 26. Σύγκριση ποιότητας αυγών που παρήχθησαν από κρانيούς μετά από θεραπεία με εμφυτεύματα ή ενέσεις GnRHα. Τα κόκκινα και τα πράσινα βέλη δηλώνουν την εφαρμογή της χορήγησης των εμφυτευμάτων και των ενέσεων, αντίστοιχα, στη διάρκεια του πειράματος. Οι αριθμοί μέσα στις στήλες δηλώνουν τον αριθμό των ωοτοκίων στο διάστημα μεταξύ δύο ενέσεων.

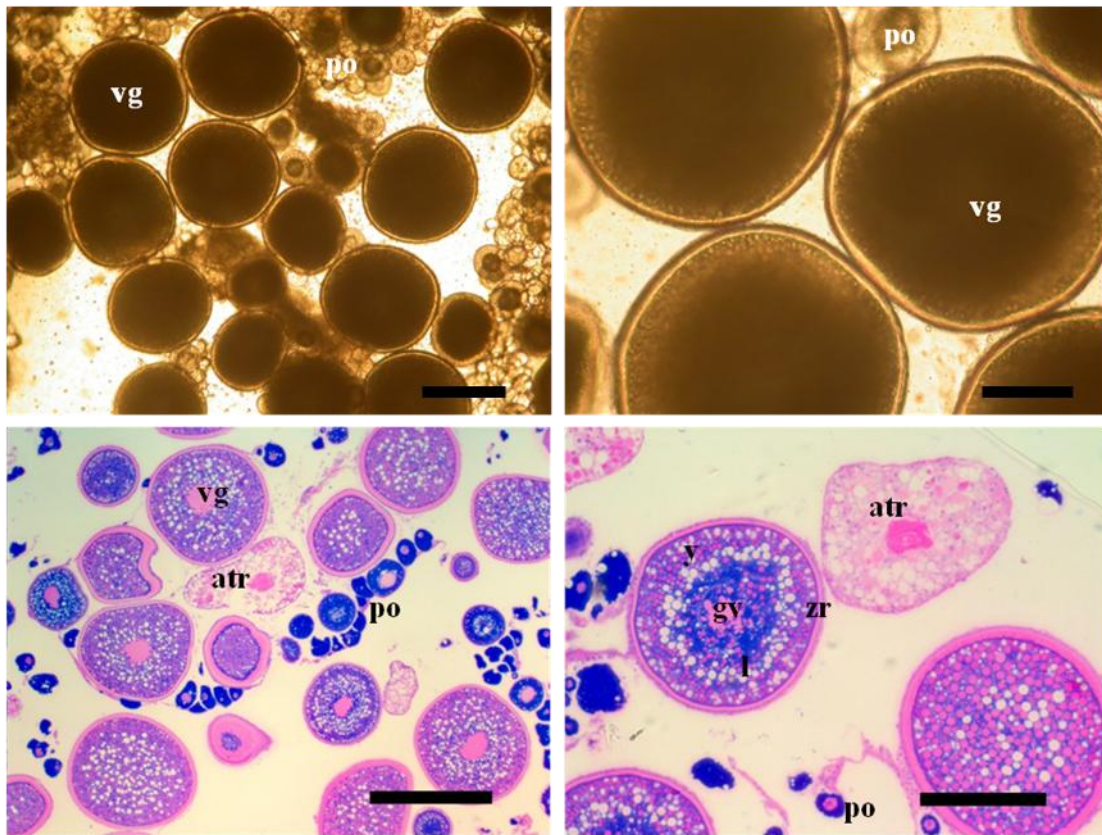
Πίνακας 3. Συγκεντρωτικός πίνακας της ποιότητας των αυγών (μέσος όρος \pm SEM) που παρήχθησαν από κρانيούς μετά από θεραπεία με εμφυτεύματα ή ενέσεις GnRHα.

Δείκτης ποιότητας των αυγών	Εμφύτευμα	Ένεση	ANOVA
Επιβίωση των αυγών 24h (%)	70 \pm 17	77 \pm 10	P > 0.05
Εκκόλαψη (%)	82 \pm 14	89 \pm 8	P > 0.05
Επιβίωση νυμφών μέχρι 5d (%)	79 \pm 14	89 \pm 5	P > 0.05

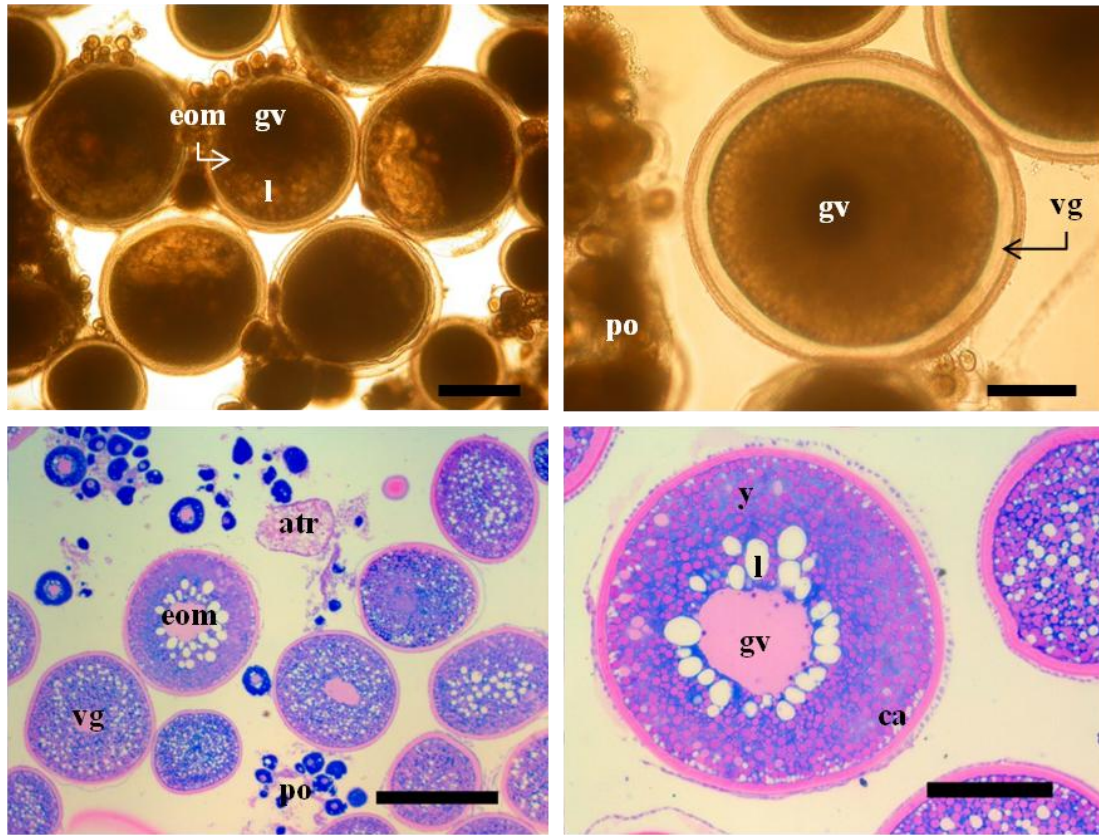
4.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΩΝ ΩΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στις 29 Μαΐου πριν τη χορήγηση των θεραπειών GnRH α , στις ωοθήκες των κρυνιών υπήρχαν ωοκύτταρα που βρίσκονταν στο τελευταίο στάδιο της λεκιθογένεσης με μέση διάμετρο (\pm SD) 607 ± 40 μm , όπως επίσης και αρκετά πρωτογενή ωοκύτταρα και πολύ μικρός αριθμός από ατρητικά ωοκύτταρα (Εικόνα 27). Στα λεκιθικά αυτά ωοκύτταρα εντοπίστηκε κεντρικά τοποθετημένος ο πυρήνας, ενώ περιμετρικά του πυρήνα βρίσκονταν διάσπαρτα σταγονίδια λίπους, λεκιθικά κυστίδια, ενώ εμφανής ήταν και η διάφανη ζώνη (Εικόνα 27). Στις 30 Μαΐου, 24h μετά την χορήγηση της GnRH α , βρέθηκαν λεκιθικά ωοκύτταρα στο ένα θηλυκό, με μέση διάμετρο 580 μm , σε άλλο θηλυκό βρέθηκαν ωοκύτταρα σε πρώιμη ωρίμανση με μέση διάμετρο 750 μm με κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα και συνένωση των σταγονιδίων λίπους σε μεγαλύτερες μάζες, και τέλος στο τρίτο άτομο βρέθηκαν ωοκύτταρα στη φάση της ωρίμανσης με μέση διάμετρο 800 μm (Εικόνα 28). Έπειτα από 29h μετά την χορήγηση των θεραπειών, στην ωοθήκη των δύο κρυνιών υπήρχαν λεκιθικά ωοκύτταρα και ωοκύτταρα στη φάση της ωρίμανσης με μέση διάμετρο 940 ± 85 μm , με τα σταγονίδια λίπους να έχουν συνενωθεί σε μια ομοιογενή μάζα (σταγόνα λίπους) και το κυτταρόπλασμα να έχει γίνει περισσότερο διαυγές (Εικόνα 29). Στο τρίτο θηλυκό δεν ήταν δυνατή η λήψη βιοψίας των ωοκυττάρων.

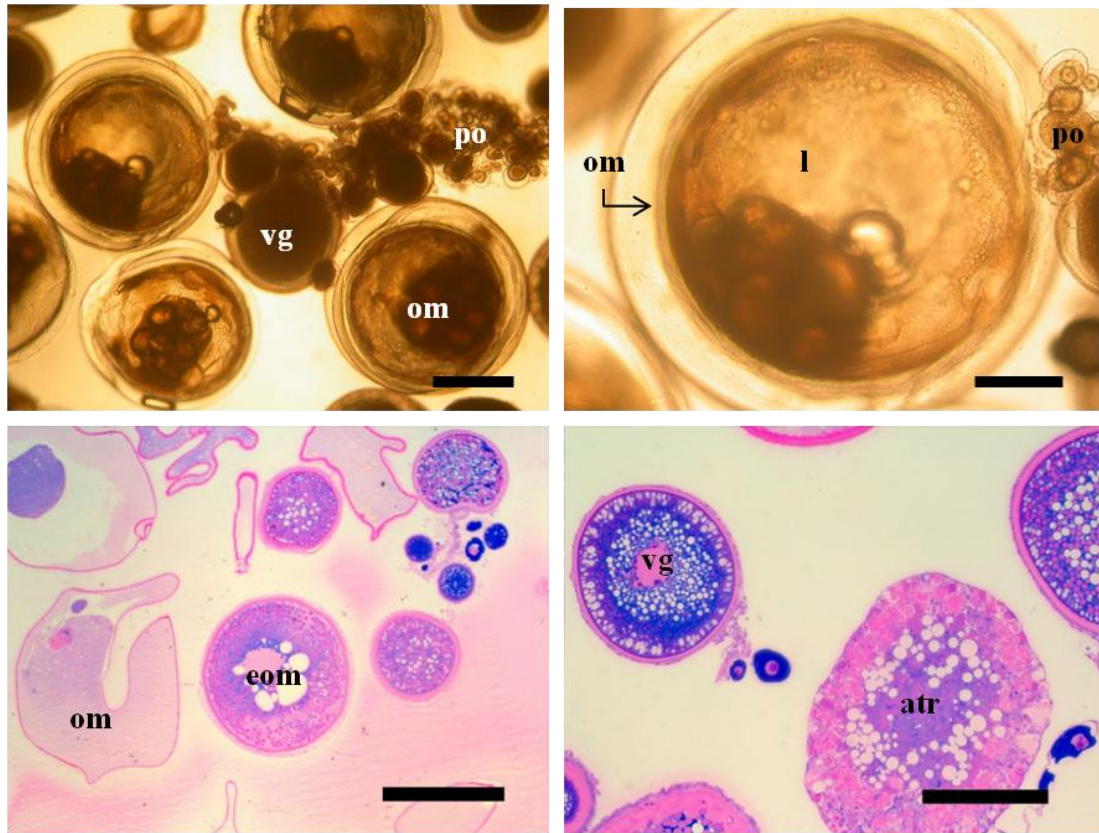
Έπειτα από 35h από την χορήγηση της GnRH α στους κρυνιούς, τα περισσότερα ωοκύτταρα που βρέθηκαν στην ωοθήκη τους βρίσκονταν στο στάδιο της ωορρηξίας στο ένα θηλυκό με μέση διάμετρο 1,125 μm (Εικόνα 30), ενώ στο δεύτερο εκτιμήθηκε ότι η ωορρηξία θα γινόταν μετά από μερικές ώρες (1-2 h). Δεν δοκιμάστηκε να γίνει τεχνητή γονιμοποίηση σε αυτή την δειγματοληψία, γιατί ο αριθμός των αυγών που μπορούσαν να συλλεχθούν με κοιλιακή πίεση ήταν μικρός, σε σχέση με τα λεκιθικά ωοκύτταρα, και εκτιμήθηκε ότι το ψάρι αυτό δεν ολοκλήρωσε την ωορρηξία. Τέλος, μετά από 50 h μέσα στην ωοθήκη υπήρχαν λεκιθικά ωοκύτταρα με μέση διάμετρο 670 μm , ωοκύτταρα στη φάση της πρώιμης ωρίμανσης με μέση διάμετρο 820 μm και αυγά από την προηγούμενη ωοτοκία με μέση διάμετρο 1,010 μm (Εικόνα 31). Η τεχνητή γονιμοποίηση που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυγών και από τις δύο θεραπείες επέφερε μηδενικό ποσοστό γονιμοποίησης, αφού η ωορρηξία είχε πραγματοποιηθεί αρκετές ώρες νωρίτερα.



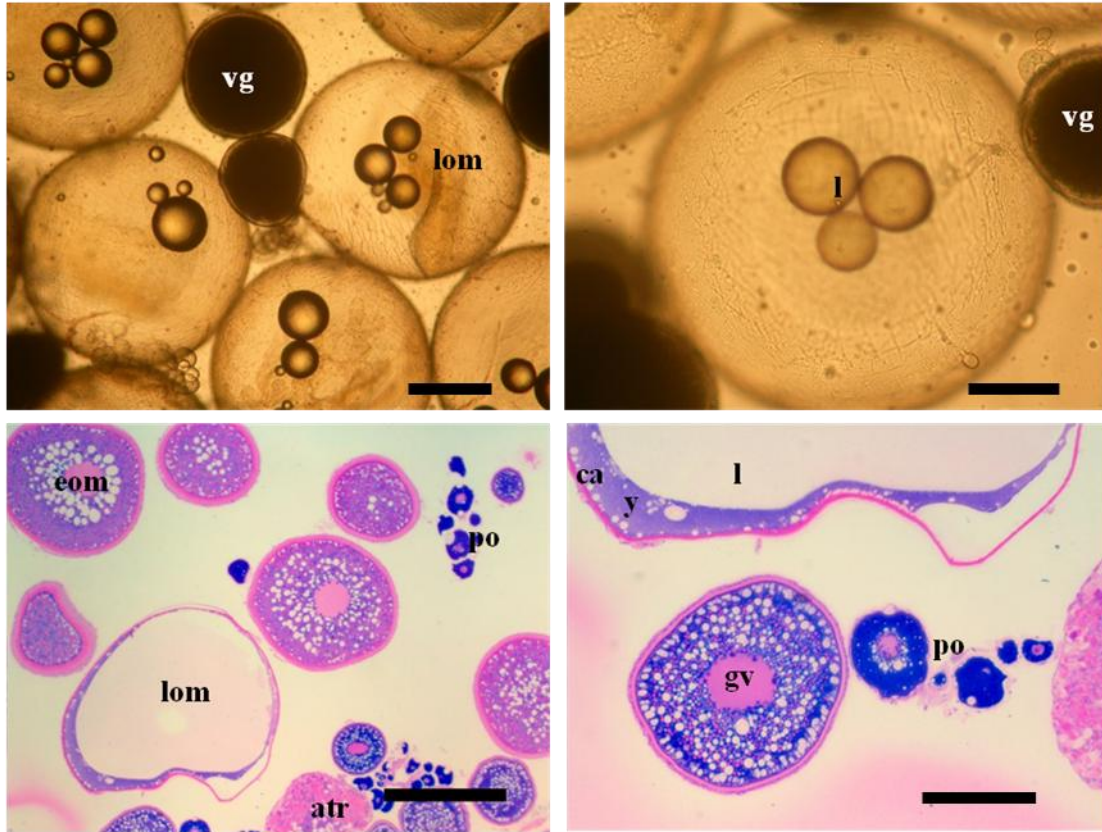
Εικόνα 27. Φωτογραφίες βιοψίας από ωθήκη κρανίων πριν την χορήγηση θεραπείας GnRHα στις 29/05/2012. Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στην δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωκύτταρα (primary oocytes, po), ωκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vitellogenic oocytes, vg), όπως και λεκιθικά ωκύτταρα σε φάση απόπτωσης (atretic oocytes, atr). Ακόμα διακρίνονται: πυρήνας (germinal vesicle, gv), λεκιθικά σφαιρίδια (yolk globules, y), σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l) και η ακτινωτή ζώνη (zona radiata, zr).



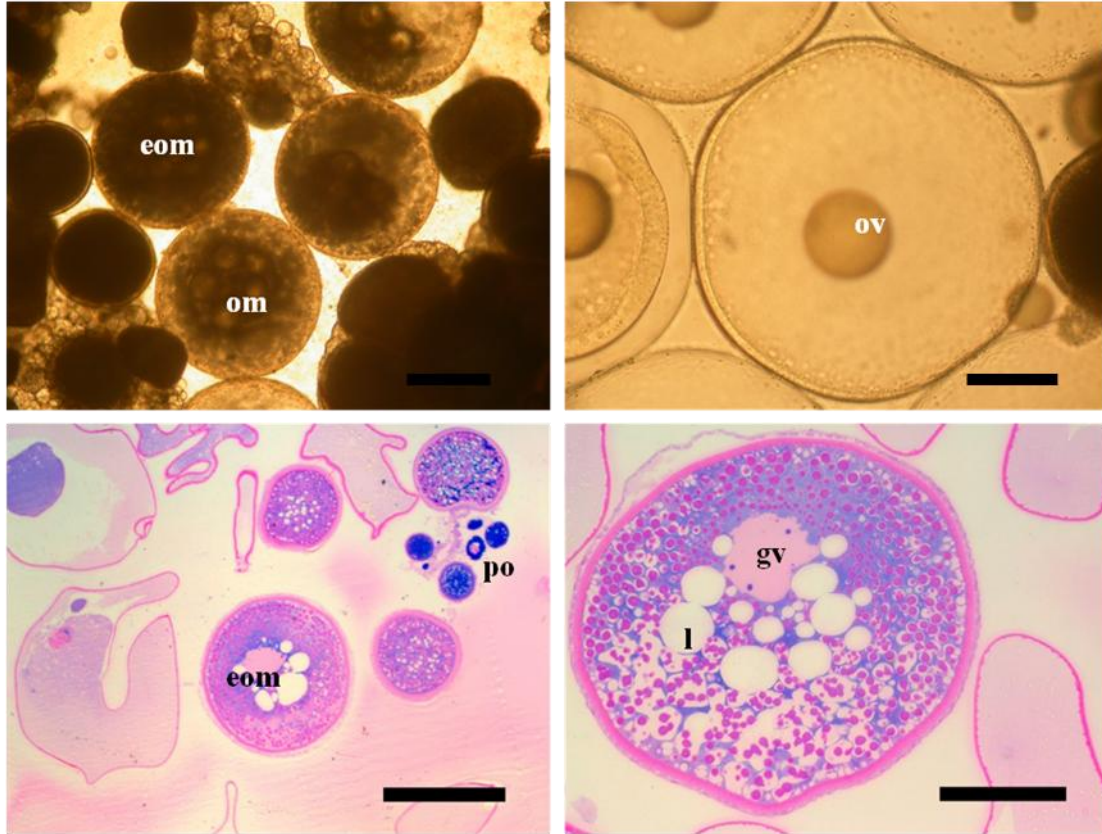
Εικόνα 28. Φωτογραφίες βιοψίας ωοκυττάρων επεξεργασμένες με EFA και ιστολογίας ωοκυττάρων στις 30/05/2012 παρμένα από ωοθήκη κρυνιών 24 h μετά τη χορήγηση θεραπείας ένεσης ή εμφυτεύματος GnRHα. Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στην δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωοκύτταρα (primary oocytes, po), ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (vitellogenic oocytes, vg), λεκιθικά ωοκύτταρα στη φάση της απόπτωσης (atretic oocytes, atr), ωοκύτταρα σε πρώιμη ωρίμανση (early oocyte maturation, eom). Ακόμη, διακρίνονται: πυρήνας (germinal vesicle, gv), σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l), λεκιθικά σφαιρίδια (yolk globules, y) και φλοιϊκά κυστίδια (cortical alveoli, ca).



Εικόνα 29. Φωτογραφίες βιοψίας στις 30/05/2012 από ωθήκη κρανιών 29 h μετά τη χορήγηση θεραπείας εμφυτεύματος GnRHα. Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στην δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωκύτταρα (primary oocytes, po), ωκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης (post-vitellogenic oocytes, vg), λεκιθικά ωκύτταρα στη φάση της απόπτωσης (atretic oocytes, atr), ωκύτταρα σε πρώιμη ωρίμανση (early oocyte maturation, eom) και ωκύτταρα στη φάση της ωρίμανσης (oocyte maturation, om). Ακόμη, διακρίνονται: πυρήνας (germinal vesicle, gv) και σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l).



Εικόνα 30. Φωτογραφίες βιοψίας στις 30/05/2012 από ωθήκη κρανιών 35 h μετά τη χορήγηση θεραπείας εμφυτεύματος GnRHα. Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στην δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωκύτταρα (po), λεκιθικά ωκύτταρα σε φάση απόπτωσης (atr), ωκύτταρα σε φάση πρώιμης ωρίμανσης (early oocyte maturation, eom) και ωκύτταρα στο τέλος της ωρίμανσης (late oocyte maturation, lom). Ακόμα διακρίνονται ο πυρήνας (germinal vesicle, gv), λεκιθικά σφαιρίδια (yolk globules, y), σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l) και φλοιϊκά κυστίδια (cortical alveoli, ca).



Εικόνα 31. Φωτογραφίες βιοψίας στις 31/05/2012 από ωθήκη κρανίων 50 h μετά τη χορήγηση θεραπείας GnRHα. Στην αριστερή στήλη η μπάρα αναπαριστά 500 μm και στην δεξιά τα 200 μm. Διακρίνονται ανώριμα πρωτογενή ωκύτταρα (po), ωκύτταρα στην πρώιμη ωρίμανση (early oocyte maturation, eom), ωκύτταρα στη φάση της ωρίμανσης (oocyte maturation, om) και αυγά μετά την ωορρηξία (oocyte ovulation, ov). Ακόμα διακρίνονται ο πυρήνας (germinal vesicle, gv) και σταγονίδια λίπους (lipid droplets, l).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΩΟΤΟΚΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΕΣΕΩΝ Η ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ GnRHa

Οι θηλυκοί κраниοί πραγματοποίησαν την ωοτοκία επιτυχώς με τη χρήση τόσο της θεραπείας των εμφυτευμάτων όσο και με τη χορήγηση της θεραπείας των ενέσεων GnRHa. Η ωοτοκία διήρκησε από τα τέλη Απριλίου μέχρι τις αρχές Ιουνίου με θερμοκρασία που κυμάνθηκε από 19.2 έως 19.3°C που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες για τον κраниό (Abou Shabana *et al.*, 2012; Mylonas *et al.*, 2013a; Mylonas *et al.*, 2013b) και συμφωνεί πως ο κраниός μπορεί να καλλιεργηθεί στην Ελλάδα χωρίς τη ρύθμιση της θερμοκρασίας με τεχνητά μέσα.

Η πρώτη χορήγηση της θεραπείας του εμφυτεύματος έδωσε περισσότερες ωοτοκίες σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι η πρώτη χορήγηση της ένεσης (Εικόνα 12). Το παραπάνω πρότυπο συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελετών στο ευρωπαϊκό λαβράκι (Mañanós *et al.*, 2002) και στη γλώσσα (*Solea senegalensis*) (Guzmán *et al.*, 2009) που οι συγκεντρώσεις της GnRHa στο αίμα μετά το εμφύτευμα ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες μετά την ένεση. Οι χαμηλότερες αυτές τιμές δηλώνουν πως η GnRHa διατηρείται για περισσότερες ημέρες στην κυκλοφορία του αίματος και δεν «καθαρίζει» από την κυκλοφορία μέσα στην πρώτη εβδομάδα χορήγησης της θεραπείας όπως συμβαίνει με την ένεση (Mañanós *et al.*, 2002; Guzmán *et al.*, 2009). Αυτή η παρατεταμένη απελευθέρωση της GnRHa έχει σαν αποτέλεσμα την μακροπρόθεσμη αύξηση των επιπέδων της LH στο πλάσμα, που με τη σειρά της διεγείρει τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών και προκαλεί πολλαπλούς τους κύκλους της ωρίμανσης, της ωορρηξίας και της ωοτοκίας (Forníes *et al.*, 2001).

Η κινητική της ωοτοκίας διέφερε μεταξύ των δυο θεραπειών. Μετά από κάθε θεραπεία με ένεση το πρότυπο της ωοτοκίας ήταν ίδιο. Οι Mañanós *et al.* (2008) υποστηρίζουν πως μία ένεση GnRHa είναι ικανή να επάγει την ωοτοκία δύο με τρεις ημέρες μετά τη χορήγηση και πως η επαναλαμβανόμενη χρήση της θεραπείας είναι αποτελεσματική στα ασύγχρονα είδη. Στην παρούσα μελέτη, έπειτα από κάθε χορήγηση ένεσης η ωοτοκία πραγματοποιούνταν δύο μέρες μετά και διαρκούσε δύο με τρεις ημέρες (Εικόνα 12) με σχετική γονιμότητα που δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των χορηγήσεων. Ο συνδυασμός λοιπόν της προγραμματισμένης ωοτοκίας με την παραγωγή σταθερού αριθμού αυγών αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα για τις ιχθυοκαλλιέργειες που θέλουν να συμπεριλάβουν τον κраниό στην εκτροφή του,

καθώς είναι ευκολότερο να προγραμματίσουν τις δραστηριότητες που αφορούν την εκτροφή των νυμφών.

Με τη θεραπεία των εμφυτευμάτων δεν παρατηρήθηκε το ίδιο πρότυπο ωοτοκίας μετά από κάθε χορήγηση της θεραπείας (Εικόνα 12). Θα μπορούσε να γίνει η υπόθεση ότι το δεύτερο και τρίτο εμφύτευμα δεν λειτούργησαν σωστά. Σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να ισχύσει ότι δεν χορηγήθηκε η σωστή δόση και πως μία υψηλότερη δόση θα ήταν πιο αποτελεσματική καθώς, σύμφωνα με τους Ibarra-Castro and Duncan (2007), σε μελέτες που διεξήχθησαν σε άλλα είδη, όταν το μέγεθος του ωοκυττάρου ήταν το σωστό και η δόση GnRHα ήταν μικρότερη από το ιδανικό, τα ψάρια έδιναν ωοτοκίες μικρής συχνότητας, ενώ αντίθετα όταν η δόση ήταν μεγαλύτερη από το ιδανικό, τότε τα αυγά που παράγονταν μετά τη θεραπεία ήταν μειωμένης ποιότητας. Η υπόθεση όμως αυτή απορρίπτεται καθώς ένα από τα μεγάλα πλεονεκτήματα χρήσης GnRHα είναι ότι τα ψάρια δεν παθαίνουν ανοσία και έτσι δεν χρειάζεται να αυξάνεται η δόση της ορμόνης (Mañanós *et al.*, 2008) και εφόσον λειτούργησε σωστά το πρώτο εμφύτευμα, δεν ισχύει η υπόθεση λανθασμένης δόσης. Ακόμη, το πρότυπο των ωοτοκιών έπεται από τη χορήγηση του δεύτερου και τρίτου εμφυτεύματος δεν μπορεί να αποδοθεί στο μη σωστό μέγεθος των ωοκυττάρων καθώς πριν τη χορήγηση των ορμονών, γινόταν βιοψία των ωοθηκών.

Ως προς την ποσότητα και ποιότητα των αυγών, η μέση σχετική γονιμότητα και το ποσοστό γονιμοποίησης ανά δέκα ημέρες, με τη θεραπεία των εμφυτευμάτων ήταν μικρότερα σε σχέση με τη θεραπεία των ενέσεων (Εικόνες 16 και 17). Σε προηγούμενη μελέτη που αφορούσε την αναπαραγωγή του κρυνίου, η θεραπεία των εμφυτευμάτων έδωσε μεγαλύτερο αριθμό βιώσιμων αυγών, χωρίς ωστόσο να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών (Duncan *et al.*, 2012). Επίσης, στην ίδια μελέτη φάνηκε πως το ποσοστό γονιμοποίησης με τη θεραπεία των εμφυτευμάτων GnRHα ήταν μεγαλύτερο (Duncan *et al.*, 2012). Ακόμα, στην παρούσα μελέτη φάνηκε πως τις πρώτες ημέρες μετά τη χορήγηση του πρώτου εμφυτεύματος η ημερήσια σχετική γονιμότητα ήταν αυξημένη (Εικόνα 12). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω του ότι η απελευθέρωση της GnRHα από το εμφύτευμα που έχει διάρκεια δράσης αρκετές εβδομάδες, μειώνεται με τον χρόνο (Mylonas and Zohar, 2001; Guzmán *et al.*, 2009).

Ως προς την ποιότητα των αυγών, αυτή δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο θεραπειών. Πιο συγκεκριμένα, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ως προς το ποσοστό

επιβίωσης των εμβρύων στις 24h, της εκκόλαψης και της επιβίωσης των νυμφών την 5^η ημέρα, το οποίο υποστηρίζεται και από τους Duncan *et al.* (2013). Όμως, σε προηγούμενη μελέτη (Duncan *et al.*, 2012) φάνηκε πως οι κρανιοί με χορήγηση ενέσιμης θεραπείας GnRHα παρουσίασαν ποσοστό εκκόλαψης των εμβρύων μικρότερο από το αντίστοιχο του εμφυτεύματος, γεγονός που αποδόθηκε στην ατομικότητα του κάθε ψαριού και στην ανάγκη για βελτίωση των ενέσιμων πρωτόκολλων. Επιπρόσθετα, στη γλώσσα, στο ευρωπαϊκό λαβράκι και το black sea bass (*Centropristis striata*) δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο θεραπειών όσον αφορά τη διάμετρο των ωοκυττάρων και το ποσοστό εκκόλαψης (Forniés *et al.*, 2001; Berlinsky *et al.*, 2005; Rasines *et al.*, 2012). Επομένως, στην παρούσα μελέτη η χρήση τόσο της θεραπείας των εμφυτευμάτων όσο και αυτής των ενέσεων δεν προκάλεσε μείωση της ποιότητας των αυγών.

Εξετάζοντας τις συγκεντρώσεις της E₂ στο πλάσμα των θηλυκών ατόμων, φάνηκε πως δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις της ως προς τις δύο θεραπείες. Τα επίπεδα της E₂ ήταν αυξημένα πριν τη χορήγηση του δεύτερου εμφυτεύματος, αποτέλεσμα που πιθανώς οφείλεται στα εναπομείναντα λεκιθικά ωοκύτταρα (Prat *et al.*, 1990; Carragher and Pankhurst, 1993). Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις της E₂ μειώθηκαν και στις δύο θεραπείες σύμφωνα με τις φωτογραφίες βιοψίας αλλά και την ιστολογία, πιθανώς λόγω διέγερσης της ωρίμανσης των ωοκυττάρων (Abou Shabana *et al.*, 2012).

Οι συγκεντρώσεις της T στο πλάσμα των θηλυκών, παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θεραπειών με τη θεραπεία των ενέσεων να παρουσιάζει υψηλότερες τιμές (Πίνακας 1). Τα επίπεδα της T μειώθηκαν μετά το πρώτο εμφύτευμα, και αυξήθηκαν μετά το δεύτερο. Αυτή η αύξηση πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη εναπομεινάντων ωαρίων στην ωοθήκη (Pankhurst *et al.*, 1999). Αυτό συνέβη επειδή ο κρανιός ανήκει στα ασύγχρονα είδη, στα οποία υπάρχει μία παρατεταμένη περίοδος ωοτοκίας με πολλαπλούς κύκλους ωρίμανσης γαμετών και ωοτοκίας (Abou Shabana *et al.*, 2012). Όσον αφορά τη θεραπεία των ενέσεων, τα επίπεδα της T παρέμειναν αυξημένα καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας. Προηγούμενη μελέτη στον κρανιό που πραγματοποίησε αυθόρμητη ωοτοκία υπό συνθήκες εκτροφής (Mylonas *et al.*, 2013a), αναφέρει πως τα επίπεδα της T στο πλάσμα των θηλυκών ήταν χαμηλότερα από εκείνα της E₂ και πως οι τιμές της T και E₂ στο πλάσμα ήταν γενικά χαμηλές, όπως συμβαίνει και στην παρούσα μελέτη. Οι Mylonas *et al.* (2013a)

προτείνουν πως η φάση της λεκιθογένεσης στον κρανίο μπορεί να πραγματοποιηθεί και με χαμηλές τιμές στεροειδών ορμονών.

Εξετάζοντας τις συγκεντρώσεις των στεροειδών ορμονών στο πλάσμα των αρσενικών ατόμων, φάνηκε πως δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της T και της 11-KT στο πλάσμα για καμία θεραπεία. Οι υψηλότερες τιμές των ανδρογόνων στο πλάσμα ήταν 0.2 ng ml^{-1} τον Ιούνιο για την T και 0.35 ng ml^{-1} τον Απρίλιο για την 11-KT. Οι τιμές αυτές είναι πολύ χαμηλές σε σχέση με τις τιμές $4-5 \text{ ng ml}^{-1}$ των Scianone *et al.*, (2012) κατά τη διάρκεια της δεύτερης αναπαραγωγικής περιόδου, αλλά είναι κοντά με τις τιμές για τις αντίστοιχες ορμόνες στον κρανίο (υψηλότερη τιμή είναι 0.9 ng ml^{-1} το Μάρτιο για την 11-KT και 0.35 ng ml^{-1} τον Μάιο για την T) από τους Mylonas *et al.*, (2013b), που παρόλο τις χαμηλές τιμές, οι αρσενικοί κρανιοί βρίσκονταν σε πλήρη σπερμιάση καθόλη τη διάρκεια Απριλίου-Ιουνίου. Στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις της 11-KT στο πλάσμα ήταν υψηλότερες από εκείνες της T, γεγονός που συμφωνεί με τους Mylonas *et al.*, (2013b) και επαληθεύεται πως η 11-KT είναι η κύρια ορμόνη στην αναπαραγωγή των αρσενικών που ρυθμίζει τη διαδικασία της σπερματογένεσης (Schulz *et al.*, 2010).

Από τις φωτογραφίες των βιοψιών και της ιστολογίας φάνηκε πως η παρουσία των ατρητικών κυττάρων στις ωοθήκες ήταν περιορισμένη κατά την αναπαραγωγική περίοδο, υποδεικνύοντας πως ο κρανιός μπορεί να διατηρήσει τα μετα-λεκιθικά του ωοκύτταρα για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα (Mylonas *et al.*, 2013b). Επίσης, από την κινητική της ωοτοκίας και την εξέταση της ωοθήκης μέσω βιοψίας και ιστολογίας, όπου βρέθηκαν ωοκύτταρα όλων των σταδίων ανάπτυξης, επαληθεύτηκε για ακόμη μία φορά ότι ο κρανιός ανήκει στα ασύγχρονα είδη και είναι πολυεναποθέτης (Abou Shabana *et al.*, 2012; Schiavone *et al.*, 2012). Οι πολλαπλές ωοτοκίες είναι χαρακτηριστικό όλων των ειδών της οικογένειας Sciaenidae, όπως το red drum (Thomas *et al.*, 1994), το spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) και orangemouth weakfish (*Cynoscion xanthulus*) (Brown-Peterson *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1994), το μυλοκόπι (Barbaro *et al.*, 2002; Mylonas *et al.*, 2004) και ο συκιός (Grau *et al.*, 2009).

5.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΩΝ ΩΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε το Μάιο όπου τα ωοκύτταρα του κρανιού βρίσκονταν σε πλήρη λεκιθογένεση πριν τη χορήγηση της θεραπείας, γεγονός που έχει επαληθευτεί και από άλλες πρόσφατες μελέτες (Duncan *et al.*, 2013; Mylonas *et al.*, 2013b). Σύγκριση με άλλα μέλη της οικογένειας Sciaenidae, η μέγιστη διάμετρος των λεκιθικών ωοκυττάρων τους ήταν 515 ± 52 μm στο mulloway (*Argyrosomus japonicas*) (Battaglione and Talbot, 1994) και πάνω από 600 μm στο σκυό (Grau *et al.*, 2009). Έπειτα από εξωτερική χορήγηση της GnRH α και με συχνές βιοψίες των ωοθηκών, παρατηρήθηκε επιτυχής ωρίμανση των ωοκυττάρων, επαληθεύοντας προηγούμενη μελέτη στον κρανιό όπου η ωρίμανση πραγματοποιήθηκε έπειτα από θεραπεία με εμφύτευμα ή ένεση (Duncan *et al.*, 2012).

Πριν από τη θεραπεία, τα ωοκύτταρα βρίσκονταν σε προχωρημένο στάδιο λεκιθογένεσης με μέση διάμετρο (\pm SEM) 607 ± 23 μm , και συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη όπου το Μάιο τα λεκιθικά ωοκύτταρα του κρανιού πριν τη χορήγηση εξωγενούς ορμονικής θεραπείας είχαν μέση διάμετρο (\pm SEM) 580 ± 40 μm (Duncan *et al.*, 2012). Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την ορμονική θεραπεία, η διάμετρος των ωοκυττάρων ήταν 775 ± 20 μm , τα οποία βρίσκονταν σε πρόιμη ωρίμανση. Τριανταπέντε ώρες έπειτα από τη θεραπεία, τα ωοκύτταρα βρίσκονταν μία με δύο ώρες πριν την ωορρηξία με διάμετρο $1,050 \pm 75$ μm και πενήντα ώρες μετά τη θεραπεία, τα ωοκύτταρα βρίσκονταν στη φάση της ωορρηξίας, γεγονός που συμφωνεί με τους Duncan *et al.*, (2013), όπου η πρώτη ωοτοκία μετά τη θεραπεία σε λεκιθικά ωοκύτταρα με διάμετρο μεγαλύτερη των 580 μm , επετεύχθη σε 30-72 ώρες. Επίσης, το γεγονός πως μετά από πενήντα ώρες τα ωοκύτταρα βρίσκονταν στη φάση της ωορρηξίας, δικαιολογεί το χρονικό διάστημα (2 ημέρες) που έπαιρνε μέρος η ωοτοκία μετά τη χορήγηση οποιαδήποτε θεραπείας στην πρώτη μελέτη της παρούσας εργασίας (Εικόνα 12).

Επιπλέον, από τις φωτογραφίες βιοψίας και ιστολογίας φάνηκε πως στις ωοθήκες των κρανιών υπήρχαν ωοκύτταρα όλων των σταδίων της ωογένεσης (Εικόνες 27 έως 31). Έτσι, επιβεβαιώθηκε για ακόμη μία φορά ότι ο κρανιός ανήκει στα ασύγχρονα είδη με πολλαπλούς αναπαραγωγικούς κύκλους (Abou Shabana *et al.*, 2012; Schiavone *et al.*, 2012; Duncan *et al.*, 2013).

Τέλος, μετά τη χορήγηση της θεραπείας GnRH α , τη συλλογή των ωοκυττάρων που βρίσκονταν στη φάση της ωορρηξίας μέσω της τεχνικής stripping, και τη χρήση της τεχνητής γονιμοποίησης επετεύχθη μηδενικό ποσοστό

γονιμοποίησης διότι η ωορρηξία είχε πραγματοποιηθεί αρκετές ώρες νωρίτερα. Η μέθοδος αυτή αποτελεί κοινή εφαρμογή στα πρωτόκολλα τεχνητής γονιμοποίησης και χρησιμοποιείται σε πολλά είδη ψαριών (Mañanós *et al.*, 2009). Ο χρόνος μεταξύ της ωορρηξίας και της συλλογής των αυγών είναι πολύ σημαντικός παράγοντας καθώς σύμφωνα με τους Flajshans *et al.* (2007), η καθυστερημένη συλλογή των αυγών μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης. Ο χρόνος μεταξύ χορήγησης της ορμόνης και ωορρηξίας των αυγών εξαρτάται από το είδος του ψαριού, το στάδιο ωρίμανσης των θηλυκών (Takushima *et al.*, 2003), τον τύπο της ορμόνης (Drori *et al.*, 1994), τη δόση, τη θερμοκρασία (Arabaci *et al.*, 2001; Phelps *et al.*, 2007) και την ώρα της ημέρας που χορηγείται η θεραπεία (Ohta *et al.*, 1997). Στον κρανίο δεν είναι γνωστός ο χρόνος που μπορούν να παραμείνουν τα ωοκύτταρα στην ωοθήκη χωρίς να μπου σε φάση απόπτωσης, ούτε ποιοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην υπερωρίμανση των ωοκυττάρων γεγονός που μπορεί να αποτελέσει μελλοντικό αντικείμενο μελέτης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abou Shabana, N.M., Abd El Rahman, S.H., Al Absawy, M.A., Assem, S.S., 2012. Reproductive biology of *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) inhabiting the south eastern Mediterranean sea, Egypt. The Egyptian Journal of Aquatic Research 38, 147-156.
- Arabaci, M., Çağırkan, H., Sari, M., 2001. Induction of spawning in common carp (*Cyprinus carpio*) using LHRHa ([D-Ser(tBu)₆, Pro⁹-Net]-LHRH) combined with haloperidol: effects of different treatment time and determination of latency period dependence on temperature The Turkish Journal of Fisheries Aquatic Science 1, 1-5.
- Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E., 2007. The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications. Springer, The Netherlands, 508.
- Barbaro, A., Francescon, A., Bertotto, D., Bozzato, G., Di Maria, I., Patarnello, P., Furlan, F., Colombo, L., 2002. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonist in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. Journal of Applied Ichthyology 18, 192-199.
- Battaglione, S.C., Talbot, R.B., 1994. Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Sciaenidae). Aquaculture 126, 73-81.
- Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture 218, 491-499.
- Berlinsky, D.L., King, V.W., Smith, T.I.J., 2005. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass (*Centropristis striata*). Aquaculture 250, 813-822.
- Bernard, J., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reproduction Nutrition Development 45, 261-279.
- Bromage, N.R., Roberts, R.J., 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell science, Oxford, 432.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 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, C.R., 1988. Reproductive biology of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, in south Texas. Fisheries Bulletin 86, 373-388.
- Cabral, H., Ohmert, B., 2001. Diet of juvenile meagre, *Argyrosomus regius*, within the Tagus estuary Cahiers-de-Ecologie Marine 24, 289-293.
- Cardia, F., Lovatelli, A., 2007. A review of cage aquaculture: Mediterranean sea. In: Halwart, M., Soto, D., Arthur, J.R. (Eds.), Cage Aquaculture: Regional Reviews and Global Overview Halwart FAO Fisheries Technical Paper Rome, Italy, 159-187.
- Carragher, J.F., Pankhurst, N.W., 1993. Plasma levels of sex steroids during sexual maturation of snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae), caught from the wild. Aquaculture 109, 375-388.

Chakroun, N., Ktari, M.H., 1981. Diet of the Sciaenidae (Fishes Teleosteans) of the Tunis Bay. Bulletin de l'Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche de Salammbô 8, 69-80.

Chao, L.N., 1986. Sciaenidae. In: Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Tortonese, E. (Eds.), Fishes of the Eastern Atlantic and Mediterranean = Poissons de 542 l'Atlantique du Nord-est et de la Méditerranée. Unesco, Paris, 865-874.

Chao, L.N., Trewavas, E., 1990. Sciaenidae. In: Quero, J.C., Hureau, J.C., Karrer, C., Post, A., Saldanha, L. (Eds.), Check-list of the Fishes the Eastern Tropical Atlantic (CLOFETA). Lisbon: JNICT; Paris: SEI; and Paris: UNESCO, 813-826.

Chauvaud, L., Cosson, J., Suquet, M., Billard, R., 1995. Sperm motility in turbot, (*Scophthalmus maximus*) initiation of movement and chances with time of swimming characteristics. Environmental Biology of Fishes 43, 341-349.

Crim, L.W., Bettles, S., 1997. Use of GnRH analogues in fish culture. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.F. (Eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology, Endocrinology and Reproduction. Oxford & IBH Publishing., New Delhi, 369-382.

Donaldson, E.M., 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. Animal Reproduction Science 42, 381-392.

Drori, S., Ofir, M., Levavi-Sivan, B., Yaron, Z., 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. Aquaculture 119, 393-407.

Dubois, E.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Goos, T.H.J., 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. Brain Research Bulletin 57, 413-418.

Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Valles, R., Mylonas, C.C., 2012. Reproductive development, GnRH-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. Fish Physiology and Biochemistry 38, 1273-1286.

Duncan, N.J., Estévez, A., Fernández-Palacios, H., Hernández-Cruz, C.M., Roo, J., Schuchardt, D., 2013. Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market. Advances in aquaculture hatchery technology. Woodhead Publishing Limited, pp. 519-541, Cambridge, UK, 519-541.

El Hehyewi, M.L.E., 1974. Changes in salinity and landings of six fish species in the shelf north to the Delta. Bulletin of the Institute of Oceanography and Fisheries 4, 436-458.

Fauvel, C., Omnès, M.H., Suquet, M., Normant, Y., 1993. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. Aquaculture 117, 107-113.

- Flajšhans, M., Kohlmann, K., Ráb, P., 2007. Autotriploid tench *Tinca tinca* (L.) larvae obtained by fertilization of eggs previously subjected to postovulatory ageing in vitro and in vivo. *Journal of Fish Biology* 71, 868-876.
- Forniés, M.A., Mañanós, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau, S., Mylonas, C.C., Zohar, Y., Zanuy, S., 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 202, 221-234.
- Gil, M.D.M., Grau, A., Basilone, G., Ferreri, R., Palmer, M., 2013. Reproductive strategy and fecundity of meagre *Argyrosomus regius* Asso, 1801 (Pisces: Sciaenidae): implications for restocking programs. *Scientia Marina* 77, 105-118.
- González-Quirós, R., del Árbol, J., García-Pacheco, M., Silva-García, A.J., Naranjo, J.M., Morales-Nin, B., 2011. Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research* 109, 140-149.
- Grau, A., Linde, M., Grau, A.M., 2009. Reproductive biology of the vulnerable species *Sciaena umbra* Linnaeus, 1758 (Pisces: Sciaenidae). *Scientia Marina* 73.
- Griffiths, M.H., Heemstra, P.C., 1995. A contribution to the taxonomy of the marine fish genus *Argyrosomus* (Perciformes: Sciaenidae), with description of two new species 640 from Southern Africa. *Ichthyological Bulletin* 65, 1-40.
- Grigorakis, K., Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Mittakos, I., Nathanailides, C., 2011. Lipid quality and filleting yield of reared meagre (*Argyrosomus regius*). *International Journal of Food Science and Technology* 46, 711-716.
- Guzmán, J.M., Ramos, J., Mylonas, C.C., Mañanós, E.L., 2009. Spawning performance and plasma levels of GnRHa and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 291, 200-209.
- Ibarra-Castro, L., Duncan, N.J., 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 272, 737-746.
- Kjørsvik, E., 1994. Egg quality in wild and broodstock Cod *Gadus morhua* L. *Journal of the World Aquaculture Society* 25, 22-29.
- Kjørsvik, E., Lønning, S., 1983. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Biology* 23, 1-12.
- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. In: Blaxter, J.H.S., Southward, A.J. (Eds.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press, San Diego, California, USA, 71-113
- Lagardère, J.P., Mariani, A., 2006. Spawning sounds in meagre *Argyrosomus regius* recorded in the Gironde estuary, France. *Journal of Fish Biology* 69, 1697-1708.

- Lahnsteiner, F., Patarnello, P., 2004. Biochemical egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: reproducibility of the method and its application for sharpsnout seabream, *Puntazzo puntazzo*. *Aquaculture* 237, 433-442.
- Lahnsteiner, F., Urbanyi, B., Horvath, A., Weismann, T., 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. *Aquaculture* 195, 331-352.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 375-388.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., Lareyre, J.J., 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology* 165, 412-437.
- 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.D., Sullivan, C.V., Place, A.R., 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.
- Mæland, A., Rønnestad, I., Waagbø, R., 2003. Folate in eggs and developing larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Nutrition* 9, 185-188.
- Mañanós, E., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Asturiano, J.F., Bayarri, M.J., Zohar, Y., Zanuy, S., 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *Journal of Fish Biology* 60, 328-339.
- Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C.C., 2008. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, M.P. (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 3-80.
- Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C.C., 2009. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, M.P. (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture*. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 3-80.
- Mellinger, J., 2002. *Sexualité et reproduction des poissons*. CNRS Editions, Paris, 364.
- Monfort, M.C., 2010. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in mediterranean aquaculture. *Studies and Reviews*, General Fisheries Commission for the Mediterranean FAO, Roma, 46.
- Mylonas, C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010a. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165, 516-534.

- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010b. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165, 516-534.
- Mylonas, C.C., Mitrizakis, N., Castaldo, C.A., Cerviño, C.P., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013b. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. *Aquaculture* 414-415, 309-317.
- Mylonas, C.C., Mitrizakis, N., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013a. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. *Aquaculture* 414-415, 318-327.
- Mylonas, C.C., Papadaki, M., Pavlidis, M., Divanach, P., 2004. Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. *Aquaculture* 232, 637-649.
- Mylonas, C.C., Sigelaki, I., Divanach, P., Mananós, E., Carrillo, M., Afonso-Polyviou, A., 2003. 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.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRH α -delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 463-491.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2009. Controlling reproduction in aquaculture. In: Burnell, G., Allan, G. (Eds.), *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 1-38.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology* 38, 217-229.
- 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, E.B., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carrillo, M., Ramos, J., Bruce, M.I.P., 2001. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. *Aquaculture International* 9, 189-196.
- Pankhurst, N.W., Hilder, P.I., Pankhurst, P.M., 1999. Reproductive condition and behavior in relation to plasma levels of gonadal steroids in the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *General and Comparative Endocrinology* 115, 53-69.
- Pavlidis, M., Greenwood, L., Mourot, B., Kokkari, C., Le Menn, F., Divanach, P., Scott, A.P., 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.

- Pavlov, D.A., Moksness, E., 1994. Production and quality of eggs obtained from wolffish (*Anarhichas lupus* L.) reared in captivity. *Aquaculture* 122, 295-312.
- Peter, R.E., Yu, K.L., 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 173-197.
- Phelps, R.P., Hastey, R., Pendetar, A., Linley, L., Papanikos, N., Dunham, R.A., 2007. Effects of temperature on the induced spawning of channel catfish and the production of channel × blue catfish hybrid fry. *Aquaculture* 273, 80-86.
- Piccolo, G., Bovera, F., De Riu, N., Marono, S., Salati, F., Cappuccinelli, R., Moniello, G., 2008. Effect of two different protein/fat ratios of the diet on meagre (*Argyrosomus regius*) traits. *Italian Journal of Animal Science* 7, 363-371.
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P., Bonelli, A., 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International* 11, 301-311.
- 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.
- Quèmèner, L., 2002. Le maigre commun (*Argyrosomus regius*). *Biologie, pêche, marche et potential aquacole*. Ifremer, Plouzané, France, 31.
- Quéro, J.C., 1985. Le maigre, *Argyrosomus regius* (Asso) (Pisces, Sciaenidae) en Méditerranée occidentale. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 114, 81-89.
- Quéro, J.C., Vayne, J.J., 1987. Le maigre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Pisces, Perciformes, Sciaenidae) du Golfe de Gascogne et des eaux plus septentrionales. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* 49, 35-66.
- Quéro, J.C., Vayne, J.J., 1997. *Les poissons de mer des pêches françaises*. Delachaux et Niestlé SA, Lausanne-Paris, France, 304.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E., Chereguini, O., 2012. Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. *Aquaculture* 326-329, 129-135.
- Rodríguez, C., Acosta, C., Badía, P., Cejas, J.R., Santamaría, F.J., Lorenzo, A., 2004. Assessment of lipid and essential fatty acids requirements of black seabream (*Spondylisoma cantharus*) by comparison of lipid composition in muscle and liver of wild and captive adult fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139, 619-629.
- Rønnestad, I., Fyhn, H.J., 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Rev. Fish. Sci.* 1, 239-259.

Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., 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.

Sadek, S.S., 1997. The effect of some environmental factors on the growth rate and production of the grouper (*Epinephelus guaza*) and meagre (*Argyrosomus regius*) under Egyptian environmental conditions. The Fifth Arabic Union of Fish Producers Conference, Cairo, Egypt, 22.

Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W.J., Robertson, D.A., 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research* 36, 1488-1499.

Schiavone, R., Zilli, L., Storelli, C., Vilella, S., 2012. Changes in hormonal profile, gonads and sperm quality of *Argyrosomus regius* (Pisces, Scianidae) during the first sexual differentiation and maturation. *Theriogenology* 77, 888-898.

Schneider, W., 1990. FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine resources of the Gulf of Guinea. Prepared and published with the support of the FAO Regional Office for Africa FAO, Rome, 268.

Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165, 549-556.

Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 390-411.

Schulz, R.W., Miura, T., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 43-56.

Shields, R.J., Brown, N.P., Bromage, N.R., 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture* 155, 1-12.

Skalli, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Arizcun, M., Cardenete, G., 2004. Effects of the dietary protein/lipid ratio on growth and nutrient utilization in common dentex (*Dentex dentex* L.) at different growth stages. *Aquaculture* 235, 1-11.

Takushima, M., Nozaki, R., Kadomura, K., Yasumoto, S., Soyano, K., 2003. Induced ovulation using LHRHa and artificial fertilization in devil stinger, *Inimicus japonicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 521-522.

Thomas, P., Copeland, P.A., Prentice, J.A., 1994. Preliminary observations on the reproductive physiology of female orangemouth corvina in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society* 25, 214-224.

Tixerant, G., 1974. Contribution à l'étude de la biologie du maigre ou courbine sur la cote Mauritanienne. Université D'Aix-Marseille, Marseille, PhD Thesis.

Tveiten, H., Jobling, M., Andreassen, I., 2004. Influence of egg lipids and fatty acids on egg viability, and their utilization during embryonic development of spotted wolf-fish, *Anarhichas minor* Olafsen. *Aquaculture Research* 35, 152-161.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Kawauchi, H., Swanson, P., 1991. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 84, 291-299.

Vallés, R., Estévez, A., 2013. Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 376-379, 15-19.

Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E., 1986. *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris.

Zohar, Y., 1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. In: Shilo, M., Sarig, S. (Eds.), *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, FL, Boca Raton, Fla., pp. 65-119.

Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.

www.fishbase.gr

www.fao.org