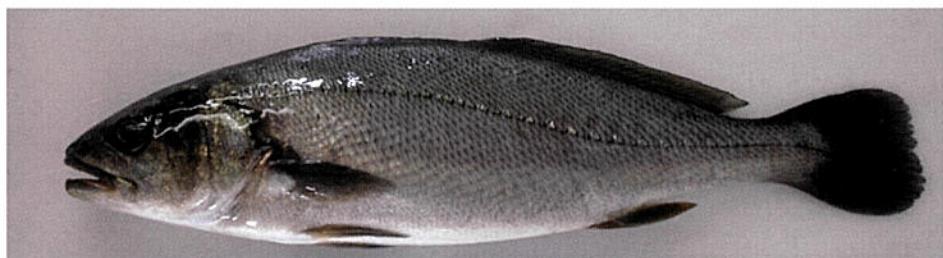


Ανάπτυξη μεθόδων αναπαραγωγής και εκτροφής του κρανιού (*Argyrosomus regius*) σαν μέτρο ενίσχυσης της ανταγωνιστικότητας της ιχθυοκαλλιέργειας με την εισαγωγή νέων ειδών (ακρονύμιο **KΡΑΝΙΟΣ**)



ΕΘΝΙΚΟ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΟ ΣΧΕΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΕΣΠΑ) 2007-2013, ΔΡΑΣΗ ΕΘΝΙΚΗΣ ΕΜΒΕΛΕΙΑΣ
"ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ", ΠΡΑΞΗ Ι: Συνεργατικά έργα μικρής και μεσαίας κλίμακας



Συντονιστής: Δρ. Κωνσταντίνος Μυλωνάς, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας
Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργιών

Διάρκεια: Φεβρουάριος 2011 – Φεβρουάριος 2014

Προϋπολογισμός: 512,100 ευρώ

Εταίροι: ΦΟΡΚΥΣ Α.Ε., Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας και ΙΡΙΔΑ Α.Ε.



Παρουσίαση αρχικών αποτελεσμάτων από την Ενότητα Εργασίας I. Αναπαραγωγή και Παραγωγή Αυγών

Συντονιστής Ενότητας Εργασίας: Δρ. Κωνσταντίνος Μυλωνάς, Διευθυντής Ερευνών, Ελληνικό Κέντρο
Θαλασσίων Ερευνών.

Παρά την αυξανόμενη εκτροφή κρανιού (*Argyrosomus regius*) σχεδόν σε όλες της Ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου, η αναπαραγωγή του σε συνθή-

κες αιχμαλωσίας επιτυγχάνεται αποκλειστικά με τεχνητά μέσα, δηλαδή με θεραπεία με αναπαραγωγικές ορμόνες (Duncan et al., 2008; Duncan et al., 2012).

Στην Αίγυπτο δε, που γίνεται σημαντική εκτροφή του είδους, αυτή επιτυγχάνεται με συλλογή άγριου γόνου από την φύση (Sadek et al., 2009). Έτσι, ένας από τους στόχους στο πρόγραμμα ΚΡΑΝΙΟΣ ήταν η μελέτη της αναπαραγωγικής λειτουργίας του κρανιού και η ανάπτυξη πρωτόκολλου πρόκλησης της ωτοκίας.

Πολλά είδη ψαριών αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της αναπαραγωγής λόγω δυσλειτουργιών που οφείλονται σε ορμονικές διαταραχές (Mylonas and Zohar, 2001; Mylonas et al., 2010). Ενώ ολοκληρώνουν την ωργένεση και την παραγωγή λεκιθοφόρων ωοκυτάρων, τα θηλυκά άτομα δεν ολοκληρώνουν την ωρίμανση των ωοκυτάρων με αποτέλεσμα αυτά να μπαίνουν σε φάση απόπτωσης (Zohar, 1988; 1989; Babin et al., 2007) και να μήν απελευθερώνονται καθόλου αυγά. Για το λόγο αυτό πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για τον έλεγχο της αναπαραγωγής με χρήση ορμονών (Zohar and Mylonas, 2001). Σήμερα, ως περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η χρήση συνθετικών αγωνιστών της γοναδοεκλυτίνης (gonadotropin releasing hormone, GnRHa). Η πρόκληση της σύνθεσης των ενδογενών γοναδοτροπινών ωχρινοποιητικής ορμόνης (luteinizing hormone, LH) και ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle stimulating hormone, FSH) από την υπόφυση, η υψηλή δραστικότητα της GnRHa καθώς και η ευρεία χρήση της σε μεγάλο αριθμό ειδών είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα της GnRHa (Crim and Bettles, 1997; Mylonas et al., 2010). Η χρήση της GnRHa μπορεί να γίνει είτε με χορήγηση της ορμόνης σε ενέσιμες μορφές είτε με χρήση εμφυτευμάτων (Crim and Bettles, 1997; Zohar and Mylonas, 2001). Σε πολλά είδη, λόγω της στρατηγικής αναπαραγωγής που ακολουθούν δεν είναι αρκετή η χορήγηση μίας δόσης ορμόνης σε ενέσιμη μορφή. Η στιγμιαία αύξηση της LH που επιτυγχάνει μιά ένεση GnRHa δεν είναι ικανή να επιφέρει την ωρίμανση των ωοκυτάρων (Nagahama et al., 1994). Αντίθετα, η σταδιακή απελευθέρωση της GnRHa, η αύξηση έκκρισης LH (Mylonas et al., 1998), καθώς και η μείωση του αριθμού των χειρισμών είναι μερικά από τα προτερήματα της χρήσης εμφυτευμάτων GnRHa που οδηγούν στην επιτυχημένη ωρίμανση και ωτοκία (Mylonas et al., 2010).

Στον κρανιό, μέχρι τώρα έχουν πραγματοποιηθεί μερικές προσπάθειες ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα, σε άγρια ενήλικα άτομα κρανιού που αιχμαλωτίστηκαν έγινε χορήγηση ορμόνης GnRHa με ενέσιμη μορφή καθώς και με εμφυτεύματα (Duncan et al., 2008; Duncan et al., 2012). Τα ψάρια αντέδρασαν θετικά απελευθερώνοντας γαμέτες καλής ποιότητας. Παρόλα αυτά, δεν έχει αναφερθεί μελέτη ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής σε εκτρεφόμενους κρανιούς που διαβιούσαν σε αιχμαλωσία.

Στα πλαίσια του προγράμματος ΚΡΑΝΙΟΣ, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της χρήσης εμφυτευμάτων GnRHa στην επαγωγή της ωτοκίας του κρανιού, με σκοπό την ανάπτυξη ενός πρωτόκολλου για χρήση από ιχθυογεννητικούς σταθμούς που ενδιαφέρονται να συμπεριλάβουν το είδος αυτό στην παραγωγή τους. Σήμερα παρουσιάζουμε τα πρώτα αποτελέσματα του προγράμματος από τα πειράματα ορμονικής πρόκλησης ωτοκίας που έγιναν μέχρι τώρα.

Μεθοδολογία

Διαχείριση γεννητόρων

Χρησιμοποιήθηκαν ψάρια 6 ετών που προέρχονταν από εκτροφή της Γαλλίας και 4 ετών που προέρχονταν από εκτροφή του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών στην Κρήτη (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.), τα οποία διατηρούνταν στις εγκαταστάσεις AQUALABS του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στην Κρήτη. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις δεξαμενές 9000 l με ανοιχτό κύκλωμα παροχής νερού. Ακολουθήθηκε φυσική φωτοπερίοδος ενώ η θερμοκρασία του νερού ήταν ελεγχόμενη, ώστε να μήν ανέβει $>21^{\circ}\text{C}$ κατά τους μήνες της περιόδου ωτοκίας (Απρίλιος-Ιούνιος). Η διατροφή των ψαριών καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων περιλάμβανε καθημερινό τάσιμα με βιομηχανική τροφή (ΙΠΙΔΑ Α.Ε.), ενώ τρεις φορές την εβδομάδα διανέμονταν αποψυγμένο καλαμάρι.

Πειράματα ορμονικής πρόκλησης αναπαραγωγής

Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου τρία πειράματα ομαδικής πρόκλησης γαμετοτοκίας.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 11 θηλυκά και 12 αρσενικά (μέσος σωματικό βάρος 6.9 ± 1.95 Kg). Τα τρία πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις 5 Μαΐου (3 θηλυκά, 3 αρσενικά), στις 18 Μαΐου (4 θηλυκά, 5 αρσενικά) και στις 9 Ιουνίου (4 θηλυκά, 4 αρσενικά). Ήπια την διαδικασία της δειγματοληψίας, το νερό ρυθμιζόταν σε ύψος 40 cm (**Εικόνα 1**) και τα ψάρια υποβάλλονταν σε μερική αναισθησία με γαρυφαλέλαιο (0,015 ml l-1) (Wagner et al., 2002). Στη συνέχεια, αφού μεταφέρονταν σε δεξαμενή όγκου 400 l γινόταν πλήρης αναισθητοποίηση τους με 0,03 ml l-1 γαρυφαλέλαιο (**Εικόνα 2**). Πραγματοποιούνταν λήψη βιοψίας από τις ωθήκες των ψαριών (**Εικόνα 3**) με τη χρήση γυάλινου καθετήρα (Nelson tube, 3 mm εξωτερική διάμετρος) που ήταν συνδεδεμένος σε λάστιχο ιδίας διατομής. Το δείγμα εξεταζόταν νωπό σε οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να εκτιμηθεί το στάδιο ωρίμανσης και να μετρηθεί η διάμετρος των ωοκυπάρων (**Εικόνα 4**). Στα αρσενικά άτομα γινόταν έλεγχος για την παρουσία σπέρματος με απαλή μάλαξη της κοιλιακής χώρας και

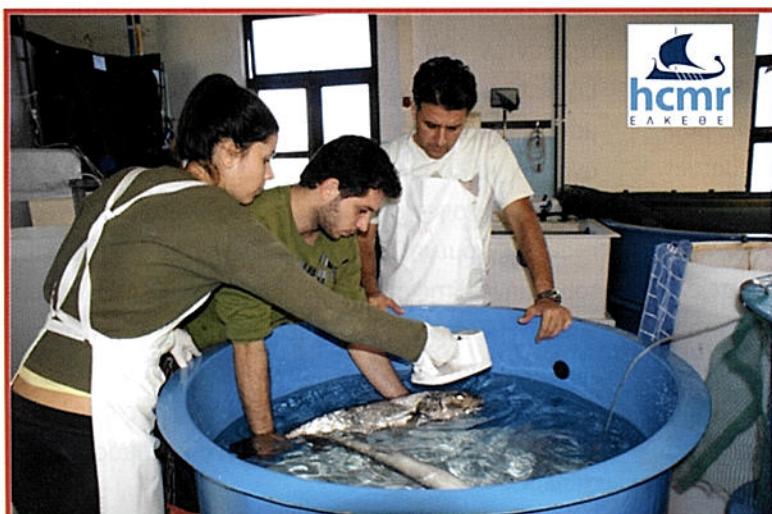


Εικόνα 1. Ομάδα γεννητόρων κρανιού κατά την αξιολόγηση της αναπαραγωγικής τους ωριμότητας.

© Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

μετά από καθαρισμό του γενετικού πόρου, το σπέρμα συλλέγονταν και φυλάσσονταν σε πάγο.

Μετά από αξιολόγηση του βαθμού αναπαραγωγικής ωρίμανσης δόθηκε ορμονική θεραπεία σε θηλυκά που βρίσκονταν σε προχωρημένη λεκιθογένεση και σε αρσενικά σε φάση σπερμίασης, χρησιμοποιόντας εμφύτευμα GnRHα σε δοσολογία 50 και 30 µg Kg-1 σωματικού βάρους, αντίστοιχα. Μετά από την εμφύτευση τα ψάρια επανατοποθετούνταν στην δεξαμενή όπου αναμενόταν η ωοτοκία. Η συλλογή των αυγών πραγματοποιούνταν σε εξωτερικό συλλέκτη συνδεδεμένο με την επιφανειακή αποχέτευση του νερού και τα αυγά μαζεύονταν από τον συλλέκτη με απόχη και συγκεντρώνονταν σε δοχείο 10 l. Στη συνέχεια γινόταν εκτίμηση της γονιμότητα (αριθμός αυγών) καθώς και του ποσοστού γονιμοποίησης, σε δείγμα 10 ml.

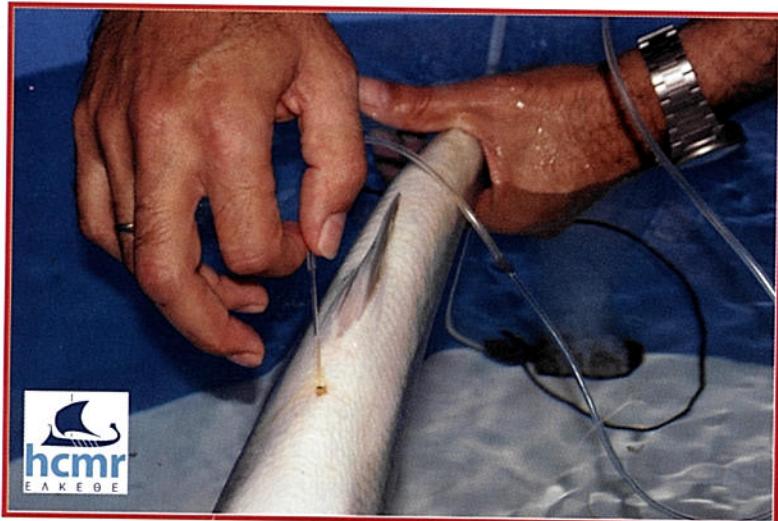


Εικόνα 2. Αναισθητοποίηση γεννητόρων κρανιού για την αξιολόγηση της αναπαραγωγικής τους ωριμότητας.

© Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Αποτελέσματα

Για την πρόκληση ωοτοκίας, επιλέχθηκαν θηλυκά που είχαν λεκιθοφόρα ωοκύπταρα διαμέτρου 600 ± 50



Εικόνα 3. Συλλογή νωπής βιοψίας από ωθήκες κρανιού με την χρήση γυάλινου καθετήρα.

© Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

μη, και τα οποία καταλάμβαναν το μεγαλύτερο μέρος της ωθήκης (**Εικόνα 5**). Τα ωοκύπαρα είχαν σφαιρικό ομοιογενές σχήμα και χρώμα σκούρο, ένδειξη της ύπαρξης της λεκίθου. Η ιστολογική εξέταση επιβεβαίωσε την συνύπαρξη πρωτογενών, λεκιθογενών αλλά και αποπτωτικών ωοκυπτάρων στις γονάδες. Τα αρσενικά άτομα που επιλέχθηκαν για την αναπαραγωγή, παρήγαγαν σπέρμα πυκνότητας $14 \pm 5.3 \times 10^9$ szoa ml⁻¹. Το ποσοστό κινητικότητάς του υπολογίστηκε στο $78 \pm 6.8\%$ και η διάρκεια της κινητικότητάς των σπερματοζωαρίων στα 1.8 ± 0.1 min. Σε θερμοκρασία 4°C το σπέρμα παρέμεινε ζωντανό κατά μέσο όρο για 6 ± 3 μέρες.

Η πρώτη προσπάθεια πρόκλησης στις 5 Μαΐου πέτυχε ωοτοκία με σχετική γονιμότητα 267.000 αυγά kg⁻¹ και ποσοστό γονιμοποίησης $87 \pm 6\%$ σε 21 ημέρες (**Εικόνα 6**). Η πρώτη ωοτοκία πραγματοποιήθηκε την τρίτη ημέρα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος. Στη συνέχεια καταγράφηκαν 4 συνεχόμενες ωοτοκίες και έπειτα από παύση ορισμένων ημερών οι ωοτοκίες συνεχίστηκαν. Το ποσοστό γονιμοποίησης παρέμεινε υψηλό σε όλη

τη διάρκεια των ωοτοκιών σε αντίθεση με τη γονιμότητα που παρουσίασε μέγιστο στη δεύτερη ωοτοκία (88.000 αυγά kg⁻¹) και στη συνέχεια συνεχιζόμενη πτώση μέχρι τις 29 Μαΐου.

Η δεύτερη θεραπεία στις 18 Μαΐου έδωσε σχετική γονιμότητα 480.000 αυγά kg⁻¹ και το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν $85 \pm 9\%$ σε 21 ημέρες (**Εικόνα 7**). Η πρώτη ωοτοκία πραγματοποιήθηκε 2 ημέρες μετά την χορήγηση του εμφυτεύματος και στη συνέχεια καταγράφηκαν 4 συνεχόμενες ωοτοκίες. Η μέγιστη σχετική γονιμότητα μετρήθηκε στα 133.000 αυγά kg⁻¹ στη δεύτερη ωοτοκία. Το ποσοστό γονιμοποίησης παρέμεινε υψηλότερο από 64% σε όλη τη διάρκεια των ωοτοκιών.

Στην τρίτη προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης στις 9 Ιουνίου, σε 18 ημέρες η σχετική γονιμότητα ήταν 348.485 αυγά kg⁻¹ και το ποσοστό γονιμοποίησης $83 \pm 17\%$ (**Εικόνα 8**). Οι ωοτοκίες ξεκίνησαν πάλι 2 ημέρες μετά την χορήγηση του εμφυτεύματος και συνεχίστηκαν για 6 ημέρες. Το μέγιστο της γονιμότητας καταγράφηκε στην τρίτη ωοτοκία (126.000 αυγά kg⁻¹) και το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν $> 53\%$.



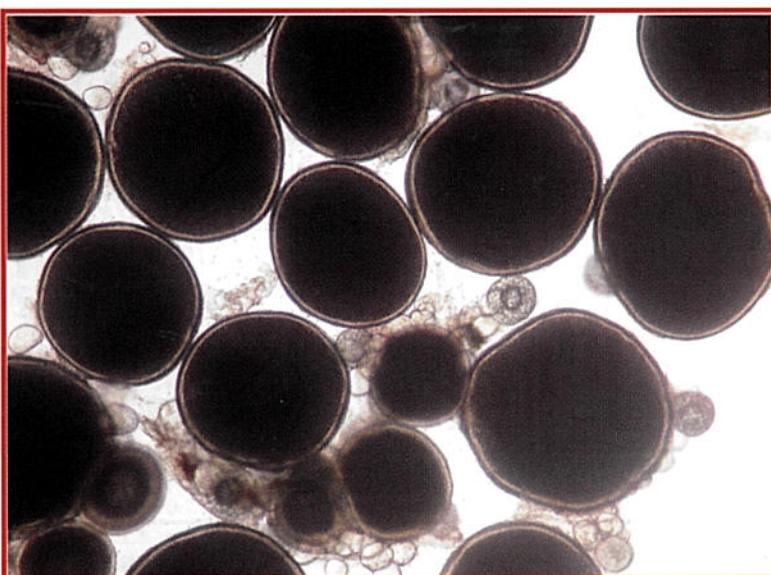
Εικόνα 4. Αξιολόγηση νωπής βιοψίας από ωθήκες κρανιού με την χρήση μικροσκοπίου. © Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Κατά την στατιστική ανάλυση δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές ως προς τη γονιμότητα ανά ωοτοκία και την γονιμοποίηση μεταξύ των τριών προσπαθειών ορμονικής πρόκλησης της ωοτοκίας (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Από τις τρεις ορμονικές θεραπείες, συλλέχτηκαν συνολικά 29.900.000 αυγά, με μέση επίσησα σχετική γονιμότητα 365.000 ± 107.000 eggs kg⁻¹ και με ποσοστό γονιμοποίησης $85 \pm 2\%$ (Πίνακας 1).

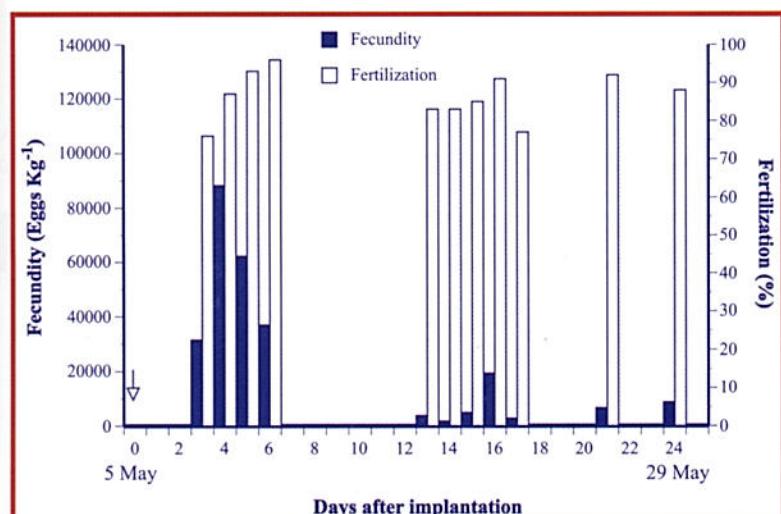
Συζήτηση

Η αποτυχία της αναπαραγωγής είναι συχνό φαινόμενο στα ψάρια (Mylonas et al., 2010) και οφείλεται στην αποτυχία απελευθέρωσης της LH από την υπόφουση (Mylonas et al., 1998). Παρόλο που δεν έχουν γίνει μελέτες για την εκτίμηση της δυσλειτουργίας στον κρανιό φαίνεται να οφείλεται και σε αυτή την περίπτωση στην μη απελευθέρωση της LH καθώς η χρήση εμφυτευμάτων στην παρούσα μελέτη, αλλά και σε άλλες

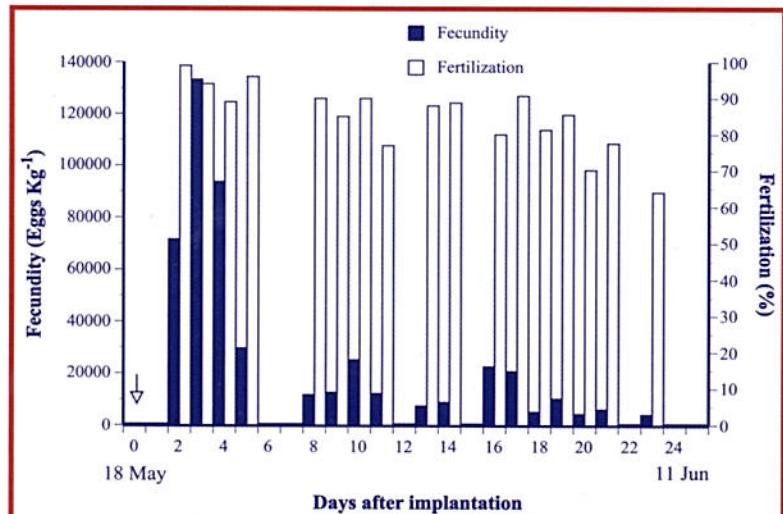


Εικόνα 5. Νωπή βιοψία από ωοθήκες κρανιού κατά την διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας (Απρίλιος-Ιούνιος). Φαίνονται ωοκύπταρα σε διαφορετικά στάδια ωογένεσης, με κύριο στάδιο αυτό της προχωρημένης λεκιθογένεσης. Το σκούρο και ομοιογενές κυτταρόπλασμα, και η πλατιά και διαφανής ακτινωτή ζώνη που περιβάλλει το ωοκύπταρο, είναι σημάδια καλή κατάστασης των ωοκυπτάρων.

(Duncan et al., 2008; Duncan et al., 2012), οδήγησε τελικά στην ωοτοκία. Κατά τον έλεγχο των βιοψιών στα θηλυκά άτομα παρατηρήθηκαν προχωρημένα λεκιθικά ωοκύπταρα που επιβεβαίωσαν την πραγματοποίηση της ωογένεσης, αλλά αποτυχία της ωρίμανσης, ωορρηγίας και ωοτοκίας. Παράλληλα παρατηρήθηκε συνύπαρξη τόσο πρωτογενών αλλά και ωοκυπτάρων σε φάση φλοιϊκών κυστιδίων, γεγονός που συνάδει με την ένδειξη ότι ο κρανιός είναι πολύ-εναποθέτης και ωοτοκεί περισσότερες από μία φορές σε κάθε αναπαραγωγική περίοδο, όπως και το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) (Micale et al., 1999; Mylonas et al., 2004b), ο ροφός (*Epinephelus marginatus*) (Marino et al., 2003) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Barbaro et al., 1997). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν επίσης και τα συγγενι-



Εικόνα 6. Ημερήσια γονιμότητα (fecundity) ανά σωματικό βάρος θηλυκού κρανιού και ποσοστό γονιμοποίησης (fertilization) μετά από χορήγηση εμφυτεύματος GnRHα σε ομάδες γεννητόρων κρανιού την 5η Μαΐου. Το βέλος αναφέρεται στην ημέρα χορήγησης του εμφυτεύματος.



Εικόνα 7. Ημερήσια γονιμότητα (fecundity) ανά σωματικό βάρος θηλυκού κρανιού και ποσοστό γονιμοποίησης (fertilization) μετά από χορήγηση εμφυτεύματος GnRHa σε ομάδες γεννητόρων κρανιού την 18η Μαΐου. Το βέλος αναφέρεται στην ημέρα χορήγησης του εμφυτεύματος.

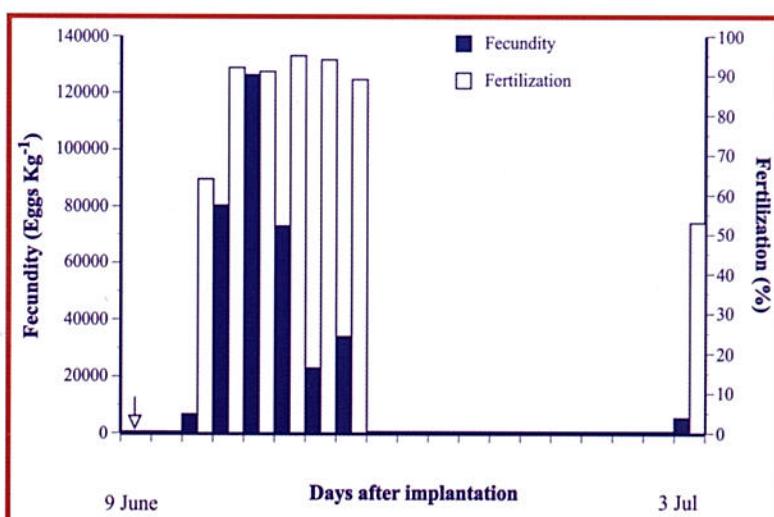
κά με τον κρανιό είδη, όπως το spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) (Brown-Peterson et al., 1988) αλλά και το orangemouth corvina (*Cynoscion xanthulus*) (Thomas et al., 1994).

Την πρώτη χρονιά του προγράμματος ΚΡΑΝΙΟΣ πραγματοποιήθηκαν ομαδικά πειράματα, προκειμένου να γίνει γνωστή η απόκριση του κρανιού σε εμφυτεύματα GnRHa σε σύγκριση με άλλα είδη (Mylonas et al., 2004a; Mylonas et al., 2004b; Mylonas and Zohar, 2007). Ο κρανιός έδειξε να ανταποκρίνεται θετικά στην προσπάθεια ορμονικής πρόκλησης της αναπαραγωγής. Έπειτα από τη χορήγηση των εμφυτευμάτων πέρασαν δύο ημέρες για την πραγματοποίηση της πρώτης ωτοκίας εκτός από μία περίπτωση που τα ψάρια ωτόκησαν για πρώτη φορά 3 ημέρες μετά. Το μυλοκόπι (*Umbrina cirrosa*), επίσης συγγενικό με τον κρανιό, ωτόκησε πρώτη φορά έπειτα από 2 ημέρες (Mylonas et al., 2004a), ενώ το λαβράκι χρειάστηκε περισσότερο χρόνο για την πρώτη ωτοκία καθώς αυτή πραγματοποιή-

θηκε 3-4 ημέρες μετά (Mylonas et al., 2003). Η διαφορά αυτή μάλλον οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες στις οποίες ωτοκεί το κάθε είδος, επιδρώντας στο ρυθμό μεταβολισμού των ψαριών (Crim et al., 1988; Zohar et al., 1995). Χαρακτηριστικά, το λαβράκι ωτοκεί τους μήνες με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες (Ιανουάριο – Φεβρουάριο) (Mayer et al., 1990) ενώ ο κρανιός στη φύση φαίνεται να αναπαράγεται από τον Ιούνιο έως τα μέσα Ιουλίου όπου οι θερμοκρασίες είναι σαφώς αυξημένες.

Ο κρανιός έπειτα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος GnRHa απελευθέρωσε αυγά καλής ποιότητας με καλά επίπεδα γονιμότητας ($365,000 \pm 107,000$ αυγά kg⁻¹) και με

ποσοστό γονιμοποίησης $85 \pm 2\%$. Συγκεκριμένα απελευθέρωσαν αυγά υψηλότερης γονιμότητας από το μαγάτικο (Mylonas et al., 2004b) και το γραμμωτό λαβράκι (Mylonas et al., 1996), αλλά το συγγενικό μυλοκόπι (Mylonas et al., 2004a) και το λαβράκι (Mylonas et al., 2003) παρουσίασαν υψηλότερη γονι-



Εικόνα 8. Ημερήσια γονιμότητα (fecundity) ανά σωματικό βάρος θηλυκού κρανιού και ποσοστό γονιμοποίησης (fertilization) μετά από χορήγηση εμφυτεύματος GnRHa σε ομάδες γεννητόρων κρανιού την 9η Ιουνίου. Το βέλος αναφέρεται στην ημέρα χορήγησης του εμφυτεύματος.

Πίνακας 1. Συνοπτικά αποτελέσματα παραγωγής αυγών από τα ομαδικά πειράματα πρόκλησης ωτοκίας στον Κρανιό. Οι μέσες τιμές περιλαμβάνουν και την τυπική απόκλιση (mean ± standard deviation).

Πείραμα	Ημερομηνία Εμφύτευσης	Αριθμός ψαριών	Αριθμός ωτοκιών	Αυγά Kg ⁻¹ ωτοκία ⁻¹	Αυγά Kg ⁻¹ πείραμα ⁻¹ γονιμοποίησης	Ποσοστό
1	5 Μαΐου	3	11	24.260±28.400	266.860	87±6
2	18 Μαΐου	4	17	28.214±36.565	479.636	85±9
3	9 Ιουνίου	4	7	49.784±44.943	348.485	85±17

μότητα από τον κρανιό. Σε πολύ υψηλά επίπεδα κυμάνθηκε και το ποσοστό γονιμοποίησης, καθώς ο μέσος όρος εκτιμήθηκε στο 85±2%. Έτσι, ο κρανιός φαίνεται να παράγει αυγά υψηλότερου ποσοστού γονιμοποίησης από το μαγάτικο (Mylonas et al., 2004b) και το μυλοκόπι (Mylonas et al., 2004a), και σε παρόμοια επίπεδα με το λαβράκι (Mylonas et al., 2003) και το γραμμωτό λαβράκι. Έπειτα από τη χορήγηση του εμφυτεύματος GnRHa, το 78±8 % του συνόλου των αυγών απελευθερώθηκε κατά τις πρώτες τέσσερεις ωτοκίες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερεις διαδοχικές ημέρες. Έπειτα από παύση ορισμένων ημερών οι ωτοκίες συνεχίστηκαν με μειωμένη όμως γονιμότητα. Δύο υποθέσεις θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν το φαινόμενο αυτό. Το πρώτο ενδεχόμενο είναι το μεγαλύτερο ποσοστό της γονιμότητας να παρατηρείται στην πρώτη ή πρώτες ωτοκίες ενώ οι υπόλοιπες να έχουν συγκριτικά χαμηλότερη γονιμότητα. Αυτό έχει παρατηρηθεί στο λαβράκι που η πρώτη ωτοκία (από σύνολο 3-4) περιλαμβάνει το 50% της ετήσιας γονιμότητας (Mylonas et al., 2003). Εναλλακτικά, μπορεί τα πιο πολλά θηλυκά να γέννησαν μόνο κατά τις τέσσερεις πρώτες ημέρες μετά την επέμβαση με GnRHa, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος της γονιμότητας να εμφανίζεται στις τέσσερις πρώτες ωτοκίες κάθε θεραπείας. Τις επόμενες ημέρες μόνο κάποια από τα θηλυκά γέννησαν, με αποτέλεσμα χαμηλότερη γονιμότητα. Στην τοπούρα, είδος με ασύγχρονη ωογένεση και ημερήσια ωτοκία για

περίοδο 3-4 μηνών, ο αριθμός των θηλυκών που γεννούν για περισσότερες από 2-4 ημέρες μετά από ορμονική χορήγηση (ένεση ή εμφύτευμα GnRHa) μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετικός, με αποτέλεσμα η γονιμότητα να είναι πιο μεγάλη τις πρώτες ημέρες μετά την ορμονική επέμβαση (Zohar et al., 1995).

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

ποσοστό κινητικότητας αρκετά υψηλό.

Φάνηκε λοιπόν ότι ο κρανιός ανταποκρίνεται θετικά στη χρήση εμφυτευμάτων GnRHa και η ορμονική δυσλειτουργία που ευθύνεται για την αποτυχία της ωοτοκίας προφανώς βρίσκεται στο επίπεδο της σύνθεσης η/και απελευθέρωσης LH από την υπόφυση, μετά το τέλος της λεκιθογένεσης. Τόσο τα αυγά, όσο και το σπέρμα που απελευθερώθηκαν από τον κρανιό στην παρούσα μελέτη ήταν καλής ποιότητας και ικανοί να όπηρίζουν μία βιώσιμη παραγωγή. Οι θηλυκοί κρανιοί ωοτοκούσαν για περίπου 20 ημέρες και οι ωοτοκίες ξεκίνησαν σε όλες τις περιπτώσεις 2 ημέρες μετά από τη χορήγηση του εμφυτεύματος (Duncan et al., 2008). Επίσης, ο αριθμός των ωοτοκιών αλλά και το ποσοστό γονιμοποίησης κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα, σε αντίθεση με την γονιμότητα που εμφανίστηκε σαφώς αυξημένη στην παρούσα μελέτη.

Ιδιαίτερη σημασία αξίζει να δοθεί στην διακύμαν-

ση της γονιμότητας αλλά την σταθερότητα του ποσοστού γονιμοποίησης κατά την διάρκεια της ωοτοκίας. Το ποσοστό γονιμοποίησης παρέμεινε σταθερά υψηλό, πάνω από 57% κατά την διάρκεια όλων των ωοτοκιών. Αντίθετα, η γονιμότητα παρουσίασε διακυμάνσεις, με το μέγιστο να μην εμφανίζεται στην πρώτη ωοτοκία όπως θα συνέβαινε πιθανόν με χρήση ενέσιμης μορφής (Fornies et al., 2001). Η πρώτη ωοτοκία φαίνεται μειωμένη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες, ενώ στη συνέχεια η γονιμότητα αυξήθηκε και έφτασε στο μέγιστο στην τρίτη ή τέταρτη ωοτοκία. Όσο συνεχίζονταν οι ωοτοκίες η γονιμότητα μειώνονταν μέχρι την τελική τους παύση. Παρόμοια εικόνα έδειξαν και άλλα είδη όπως το λαβράκι (Fornies et al., 2001), στο οποίο έχουν πραγματοποιηθεί ατομικά πειράματα πρόκλησης της αναπαραγωγής. Διαφορετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ομαδικές προκλήσεις αναπαραγωγής, όπως στο μαγιάτικο (Mylonas et al., 2004b) και τη γλώσσα της Σενεγάλης (*Solea senegalensis*) (Agulleiro et al., 2006) όπου παρουσιάζεται διακύμανση και στο ποσοστό γονιμοποίησης.

Συμπεράσματα

Ο κρανιός είναι ένα είδος που φαίνεται να μήν αναπαράγεται αυθόρμητα σε συνθήκες αιχμαλωσίας, αλλά παρόλα αυτά ολοκληρώνει με επιτυχία τη διαδικασία της ωογένεση (δηλαδή της λεκιθογένεσης). Κατά την ανάλυση των βιοψιών αλλά και έπειτα από την ιστολογική εξέταση παρατηρήθηκαν πρωτογενή ωοκύπταρα, ωοκύπταρα σε φάση φλοιϊκών κυστίδων αλλά και λεκιθοφόρα ωοκύπταρα γεγονός που επιβεβαίωσε ότι ο κρανιός είναι πολύ-εναποθέτης, όπως και τα άλλα συγγενικά του είδη καθώς ωοτοκεί περισσότερες από μία φορές σε κάθε αναπαραγωγική περίοδο. Τα ψάρια φαίνεται ότι είχαν ολοκληρώσει τη λεκιθογένεση και διατηρούσαν τα λεκιθοφόρα ωοκύπταρα από τον Μάιο έως τον Ιούνιο σε θερμοκρασία 17-22°C. Τα αρσενικά άτομα ήταν σπερμιάζοντα από τον Μάρτιο έως τον Ιούνιο. Άρα, πιθανότατα ο κρανιός τους μήνες Μάιο και Ιούνιο είναι ικανός για αναπαραγωγή, αλλά δεν ωοτοκεί σε συνθήκες εκτροφής. Τα ωοκύπταρα των θηλυκών ατόμων ήταν καλής ποιότητας (μέγεθος, σχήμα) και το σπέρμα που συλλέχτηκε από τα αρσενικά κρίθηκε επίσης ποιοτικά ικανοποιητικό. Κρατώντας την θερμοκρασία στους 17-22°C υπήρχαν λεκιθοφόρα ωοκύπταρα με διáμετρο > 560 μμ για δύο μήνες (Μάιος – Ιούνιος). Σε αυτό το χρονικό σημείο υπάρχει η δυνατότητα χορήγησης εμφυτευμάτων GnRHa. Και τους δύο μήνες η γονιμότητα αλλά και η ποιότητα των γαμετών ήταν εξίσου καλή. Αναμένονται περίπου 42500 ± 13000 αυγά kg⁻¹ ωοτοκία-1 με ποσοστό γονιμοποίησης $91 \pm 4\%$, και κατά τη διάρκεια ολόκληρης της αναπαραγωγικής περιόδου παράχθηκαν περισσότερα από 435000 ± 199000 αυγά kg⁻¹. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι περίπου το 78% των αυγών απελευθερώθηκε στις 4 πρώτες ωοτοκίες.

Βιβλιογραφία

- Agulleiro, M.J., Anguis, V., Canavate, J.P., Martinez-Rodriguez, G., Mylonas, C.C., Cerdá, J., 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257: 511-524.
- Babin, P.J., Carnevali, O., Lubzens, E., Schneider, W.J., 2007. Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, Vol. Springer, The Netherlands, pp. 39-76.
- Barbaro, A., Francescon, A., Bozzato, G., Merlin, A., Belvedere, P., Colombo, L., 1997. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture* 154: 349-359.
- Brown-Peterson, N., Thomas, P., Arnold, C.R., 1988. Reproductive biology of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, in South Texas. *Fish. Bull.* 86: 373-388.
- Clearwater, S.J., Crim, L.W., 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 349-357.
- 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*, Vol. I: Endocrinology and Reproduction, Vol. Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 369-382.
- Crim, L.W., Nestor, J.J., Jr., Wilson, C.E., 1988. Studies of the biological activity of LHRH analogs in the rainbow trout, landlocked salmon, and the winter flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 372-382.
- Duncan, N., Estevez, A., Padros, F., Aguilera, C., Montero, F.E., Norambuena, F., Carazo, I., Carbo, R., Mylonas, C.C., 2008. Acclimation to captivity and GnRHa-induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). *Cybium* 32(2) Suppl.: 332-333.
- Duncan, N.J., Estevez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Valles, R., Mylonas, C.C., 2012. Reproductive development, GnRHa-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimated to captivity. *Fish Physiol. Biochem.* 38: 1273-1286.
- Fornies, M.A., Ma_anos, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau, S., Mylonas, C.C., Zohar, Y., Zanuy, S., 2001. Spawning induction of individualised European seabass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 202: 221-234.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219: 841-858.
- Mayer, I., Shackley, S.E., Witthames, P.R., 1990. Aspects of the reproductive biology of the bass *Dicentrarchus labrax* L. II. Fecundity and pattern of oocyte development. *J. Fish Biol.* 36: 141-148.
- Micale, V., Maricchiolo, G., Genovese, L., 1999. The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerilii* (Risso 1810). I. Oocyte development in captivity. *Aqua. Res.* 30: 349-355.
- Mylonas, C.C., Magnus, Y., Gassis, A., Klebanov, Y., Zohar, Y., 1996. Application of controlled-release, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass x striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. *Aquaculture* 140: 265-280.
- Mylonas, C.C., Gassis, A., Magnus, Y., Zohar, Y., 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa-delivery system. *Aquaculture* 153: 301-313.
- Mylonas, C.C., Woods, L.C., III, Thomas, P., Zohar, Y., 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during post-vitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110: 276-289.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Endocrine

- regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 202: 205-220.
- Mylonas, C.C., Sigelaki, I., Divanach, P., Ma_anos, E., Carillo, M., Afonso-Polyviou, A., 2003. Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRHa. *Aquaculture* 221: 605-620.
- Mylonas, C.C., Kyriakou, G., Sigelaki, I., Georgiou, G., Stephanou, D., Divanach, P., 2004a. Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRHa. *Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh* 56: 75-92.
- Mylonas, C.C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Papadaki, M., Divanach, P., 2004b. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture* 237: 141-154.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerda, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, Vol. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 433-470.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 516-534.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tanaka, M., 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. In: Sherwood, N.M., Hew, C.L. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. vol. XIII: *Molecular Endocrinology of Fish*. Academic Press, San Diego, California, pp. 393-439.
- Rainis, S., Mylonas, C.C., Kyriakou, Y., Divanach, P., 2003. Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture* 219: 873-890.
- Sadek, S.S., Sabry, M.A., Asfoor, M.S., 2009. Meagre: a new candidate in Egyptian aquaculture. *Aquacult. Eur.* 34: 13-17.
- Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carillo, M., Zohar, Y., 1996. Sustained administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. *J. Exp. Zool.* 276: 361-368.
- Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Dorange, G., Chauvaud, L., Mugnier, C., Fauvel, C., 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquat. Living Resour.* 7: 283-294.
- Thomas, P., Copeland, P.A., Prentice, J.A., 1994. Preliminary observations on the reproductive physiology of female orangemouth corvina in captivity. *J. World Aquac. Soc.* 25: 214-224.
- Vermeirssen, E.L.M., Shields, R.J., Mazorra de Quero, C., Scott, A.P., 2000. Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol. Biochem.* 22: 77-87.
- Wagner, E., Arndt, R., Hilton, B., 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* 211: 353-366.
- Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations. In: Zohar, Y., Breton, B. (Eds.), *Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*, Vol. INRA Press, Paris, pp. 47-62.
- 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*, Vol. CRC Press, Boca Raton, pp. 65-119.
- Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N.M., Powell, J.F.F., Rivier, J.E., Zmora, N., 1995. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 289-299.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.