



Αλιευτικά Νέα

Βασ. Γεωργίου Β' 5, 185 34 Πειραιάς, Τηλ: 210 41 24 504

FISHING NEWS

Μηνιαία Επιθεώρηση Αλιευτικού & Ιχθυοτροφικού Πλούτου

ΤΕΥΧΟΣ 471 - ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2021



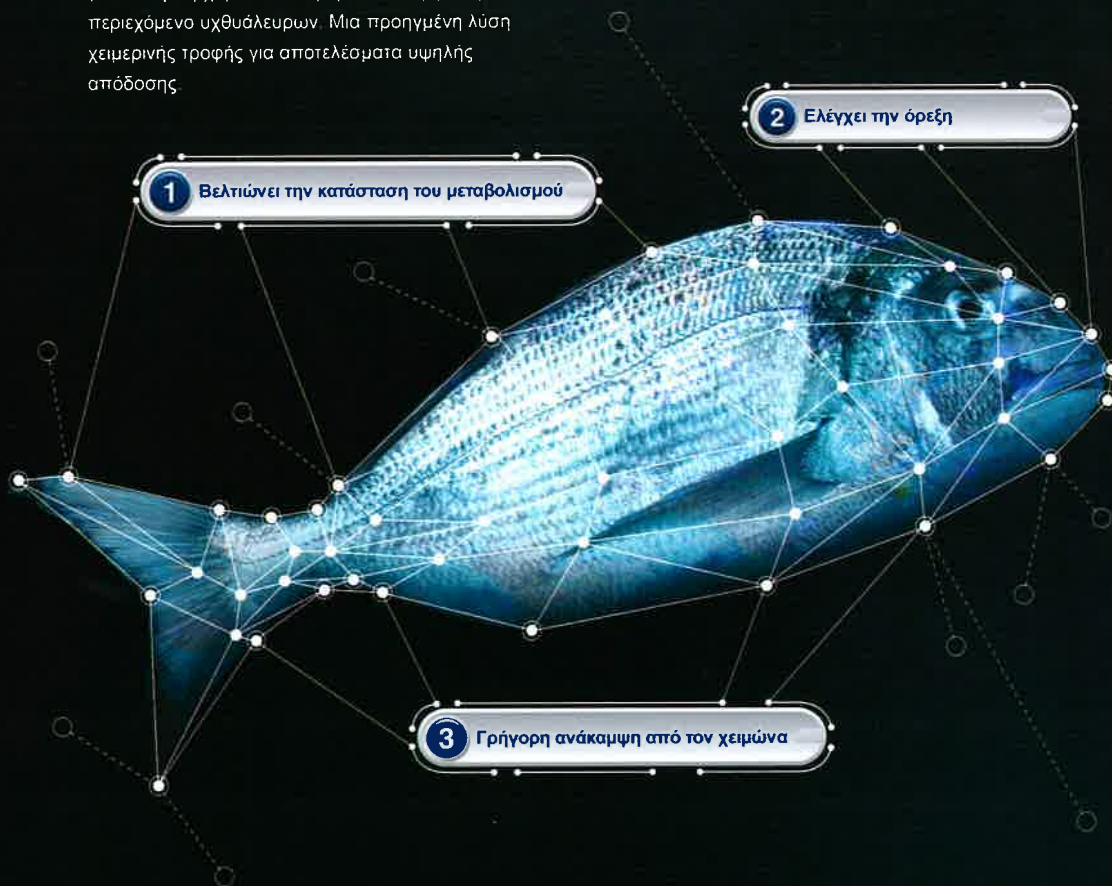
Dorin™

Η ΕΞΥΠΝΗ ΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΡΟΦΗ ΨΑΡΙΩΝ

AQUASOJA

Εξυπνη λύση τροφής για τον χειμώνα για εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιέργειας

Με βάση συμπληρώματα διατροφής με ηπατοπροστατευτικά πρόσθετα, λιγότερα λιπαρά (100% προερχόμενα από ψάρια) και υψηλότερο περιεχόμενο υχθυάλευρων. Μια προηγμένη λύση χειμερινής τροφής για αποτελέσματα υψηλής απόδοσης



SORGAL

SOJA DE PORTUGAL

Η Sorgal είναι μέλος του ομίλου Soja de Portugal, με παρουσία πάνω από 70 χρόνια στον κλάδο της διατροφής, στην Ελλάδα από το 2005.

www.aquasoja.pt
aquasoja@sojadesportugal.pt

Τηλέφωνο Ελλάδας: 0030 6940 572 000
Τηλέφωνο Πορτογαλίας: 00351 356 581 100



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΑΝΕΚ

ΕΠΑΝΕΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ: Ένα πρόγραμμα για την βελτίωση των πρακτικών διαχείρισης γεννητόρων και παραγωγής γόνου στο μαγιάτικο (*Seriola dumerili*).

- Βελτίωση της σπερμίας με τη χρήση αναπαραγωγικών ορμονών.
Γιάννης Φακριάδης, Μαρία Παπαδάκη και Κωνσταντίνος Μυλωνάς

Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό
Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ηράκλειο Κρήτης

Το ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ (<https://magiatiko.weebly.com/>) είναι ένα ερευνητικό πρόγραμμα που ξεκίνησε τον Ιούνιο του 2019 και θα ολοκληρωθεί τον Μάιο του 2022. Συντονίζεται από το Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (ΙΘΑΒΒΥΚ) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ), με εταίρους τους ερευνητικούς φορείς Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το Τμήμα Βιολογίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Συμμετέχουν επίσης οι εταιρείες ΙΡΙΔΑ Α.Ε., Ιχθυοκαλλιέργειες Αργοσαρωνικού Α.Ε. και Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε. Σκοπός του προγράμματος είναι να βελτιώσει τις μεθόδους διαχείρισης γεννητόρων και παραγωγής γόνου μαγιάτικου (Εικόνα 1), ώστε να γίνει εφικτή η συστηματική παραγωγή του είδους από την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια.

Στα πλαίσια της Ενότητας Εργασίας 1, υλοποιήθηκε πείραμα για την διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών αναπαραγωγικών ορμονών στην ποιότητα του σπέρματος και στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών στο αίμα, με στόχο τη βελτιστοποίηση της παραγωγής

σπέρματος και την παραγωγή γονιμοποιημένων αυγών. Η συγκεκριμένη εργασία παρουσιάστηκε προφορικά στο πρόσφατο συνέδριο της European Aquaculture Society, το οποίο διεξήχθη στις 4-7 Οκτωβρίου στη Μαδέιρα της Πορτογαλίας.



Εικόνα 1: Μαγιάτικο στα Aqualabs, ΙΘΑΒΒΥΚ.

Εισαγωγή

Οι γοναδοτροπίνες ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (follicle stimulating hormone - FSH) και ωχρινοποιητική ορμόνη (luteinizing hormone - LH) ρυθμίζουν την λειτουργία του όρχι μέσω της δράσης τους στην παραγωγή των στεροειδών (Schulz et al., 2010). Η σύνθεση και απελευθέρωση των γοναδοτροπινών ελέγχεται κυρίως από τη γοναδοεκλυτίνη (gonadotropin releasing hormone - GnRH). Στη συνέχεια, οι δύο γοναδοτροπίνες ρυθμίζουν την παραγωγή των οιστρογόνων, ανδρογόνων και προγεστογόνων (Miura & Miura, 2001; Schulz, et al., 2010) από τις γονάδες. Στον όρχι, τα επίπεδα τεστοστερόνης (testosterone - T) και 11-κετοτεστοστερόνης (11-ketotestosterone - 11-KT) αυξάνονται βαθμιαία κατά τη σπερματογένεση, φθάνοντας τις υψηλότερες τιμές κατά τη σπερμιογένεση ή ακριβώς πριν από την αρχή της σπερμιάσης (Vizziano et al., 2008).

Στη συνέχεια, τα ανώριμα σπερματοζώαρια ωριμάζουν υπό την επίδραση της 17 α ,20 β -διυδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνης (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one-17,20 β -P) (Miura & Miura, 2003; Schulz, et al., 2010).

Το ερευνητικό ενδιαφέρον των τελευταίων χρόνων έχει επικεντρωθεί στα θηλυκά μαγιάτικα, όπως συμβαίνει και σε άλλα είδη, λόγω της αποτυχίας τους να ολοκληρώσουν την ωρίμανση των ωοκυττάρων τους, την ωορρηξία και την ωοτοκία σε συνθήκες καλλιέργειας (Fakriadis et al., 2019; Fakriadis et al., 2020a; Fakriadis, et al., 2020c; Jerez et al., 2018; Sarih et al., 2018; Sarih et al., 2019; Sarih et al., 2020). Δυσλειτουργίες, όμως, έχουν επισημανθεί και στα αρσενικά άτομα (Fakriadis & Mylonas, 2021; Zupa et al., 2017b). Επίσης, μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων, διάρκεια κινητικότητας, ταχύτητα και περιεκτικότητα σε ATP έχει παρατηρηθεί σε δείγματα σπέρματος γεννητόρων που διατηρούνταν σε χειρσαίες εγκαταστάσεις σε σχέση με αλιευμένα ψάρια (Zupa et al., 2017a). Ενδεχομένως τα παραπάνω προβλήματα των αρσενικών να συντελούν στα μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης που παρατηρούνται σε ωοτοκίες εκτρεφόμενων μαγιάτικων (Fakriadis, et al., 2019; Fakriadis, et al., 2020a; Fakriadis, et al., 2020c; Jerez, et al., 2018), και θα έπρεπε να αντιμετωπιστούν, ώστε, με τη βελτίωση της ποσότητας και της ποιότητας του παρα-

γόμενου σπέρματος να οδηγηθούμε στη σταθερή παραγωγή καλής ποιότητας αυγών.

Ένας τρόπος για να αντιμετωπιστούν τέτοιου είδους δυσλειτουργίες είναι η χορήγηση γοναδοτροπινών, όπως η LH, η ανθρώπινη χοριοϊκή γοναδοτροπίνη (human chorionic gonadotropin - hCG) και το εκχύλισμα υπόφυσης κυπρίνου (carp pituitary extract, - CPE), τα οποία επιδρούν στο επίπεδο της γονάδας, ή με την χορήγηση συνθετικών ανάλογων γοναδοεκλυτίνης (GnRHα) τα οποία επιδρούν στο επίπεδο της υπόφυσης (Mylonas et al., 2017). Από τις παραπάνω ομάδες ορμονών, η GnRHα εμφανίζει πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παρασκευάσματα γοναδοτροπινών, εν μέρει λόγω χρήσης της GnRHα σε εμφυτεύματα ελεγχόμενης έκλυσης, τα οποία καταλήγουν σε υψηλότερη απόδοση (Mylonas & Zohar, 2001; Mylonas et al., 2010). Έχει αναφερθεί σε πολλά είδη ψαριών ότι η GnRHα αυξάνει την παραγωγή σπέρματος (Clearwater & Crim, 1998; Mylonas et al., 1997a; Mylonas et al., 1997b; Sorbera et al., 1996; Vermeirssen et al., 2000), ακόμη και σε είδη όπως ο κυανόπτερος τόνος *Thunnus thynnus* (Corriero et al., 2009), ο οποίος εμφανίζει παρόμοιου τύπου αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες σε αιχμαλωσία. Τα εμφυτεύματα GnRHα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν και την σπερματογένεση σε είδη που χρησιμοποιούνται στην ιχθυοκαλλιέργεια, όπως το λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (Rainis et al., 2003) και ο κρανιός *Argyrosomus regius* (Fakriadis et al., 2020b), αν και η επίδραση των παραπάνω θεραπειών στην ποιότητα του σπέρματος ποικίλει (Mylonas, et al., 2017). Από την άλλη, η χορήγηση ενέσιμης hCG έχει δείχθει να αυξάνει τον ορό του σπέρματος σε άλλα ψάρια (Zadmajid, 2016), επομένως η

χρήση της στο μαγιάτικο θα μπορούσε να αυξήσει την παραγωγή σπέρματος μέσω της αυξημένης ενυδάτωσης.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να ελεγχθεί α) η αποτελεσματικότητα των εμφυτευμάτων GnRHα σε σχέση με ενέσεις hCG στην αύξηση της παραγωγής και της ποιότητας του σπέρματος στο μαγιάτικο και β) η επίδραση των παραπάνω θεραπειών στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών στο αίμα.

Υλικά και Μέθοδοι

Διαχείριση γεννητόρων και ορμονικές θεραπείες

Οι γεννήτορες διατηρούνταν σε ιχθυοκλωβό στις εγκαταστάσεις της εταιρείας Ιχθυοκαλλιέργειες Αργοσαρωνικού Α.Ε. και μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις των Aqualabs του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (ΙΘΑΒΒΥΚ). Τοποθετήθηκαν σε μία δεξαμενή και τρέφονταν με ξηρή τροφή (Vitalis CAL, 22 mm, Skretting, Norway).

Οι γεννήτορες διατηρούνταν σε τεχνητά προσομοιωμένη φυσική φωτοπερίοδο και θερμοπερίοδο και το νερό που τους παρέχόταν ήταν θαλασσινό νερό από γεώτρηση. Κατά τις δειγματοληψίες, μετά από νηστεία δύο ημερών γινόταν χρήση χαμηλής συγκέντρωσης αναισθησίας (γαρυφαλέλαιο 0.01 ml l⁻¹) στη δεξαμενή (Mylonas et al., 2005). Στη συνέχεια, τα ψάρια μεταφέρονταν σε δεξαμενή 1 m³ που περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση αναισθητικού (γαρυφαλέλαιο 0.03 ml l⁻¹) με σκοπό την πλήρη αναισθητοποίησή τους, και γινόταν λήψη βιοψίας ωοθηκών από τα θηλυκά με τη χρήση πλαστικού καθετήρα (Pipelle de Cornier, Laboratoire CCD, Γαλλία). Ένα τμήμα των βιοψιών των ωοθηκών παρατηρήθηκε αμέσως σε οπτικό μικροσκόπιο (40 and

100×) για την αξιολόγηση του σταδίου της ωογένεσης και τη μέτρηση της μέσης διαμέτρου των μεγαλύτερων ωοκυττάρων, με παράλληλη λήψη φωτογραφιών. Ένα άλλο τμήμα της βιοψίας μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο που περιείχε συντηρητικό διάλυμα φορμόλης-γλουταραλδεύδης (4:1) για περαιτέρω ιστολογική επεξεργασία.



Εικόνα 2: Αξιολόγηση αναπαραγωγικής κατάστασης και χορήγηση ορμονών

Η κατάσταση σπερμίας των αρσενικών αξιολογήθηκε σύμφωνα με μια υποκειμενική κλίμακα, όπου S0: όταν τα ψάρια δεν απελευθερώνουν σπέρμα μετά από ελαφρά κοιλιακή πίεση, S1: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν λίγες σταγόνες σπέρματος μετά από επαναλαμβανόμενες προσπάθειες, S2: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν κάποια ποσότητα σπέρματος μετά από την πρώτη εφαρμογή κοιλιακής πίεσης και S3: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν σπέρμα σχεδόν χωρίς πίεση (Fakriadis, et al., 2020b). Τα δείγματα σπέρματος λήφθηκαν με τη χρήση καθετήρα (Pipelle μετά από καθαρισμό και στέγνωμα του γεννητικού πόρου, για την αποφυγή επιμόλυνσης (Εικόνα 2).

Με τη χρήση καθετήρα εξασφαλίστηκε η λήψη δείγματος σπέρματος από όλα τα άτομα, ακόμα και όταν αυτά δεν απελευθέρωναν το σπέρμα μετά από κοιλιακή πίεση (ψάρια σε κατάσταση σπερμίας S0). Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι τη μεταφορά τους σε ψυγείο στους 4°C και αξιολογήθηκαν 2-3 ώρες μετά από την συλλογή. Οι γεννήτορες, μετά τη διαχείρισή τους μεταφέρονταν σε δεξαμενή με καθαρό θαλασσινό νερό.



Εικόνα 3: Λήψη σπέρματος από μαγιάτικο με τη χρήση καθετήρα

Αξιολόγηση αναπαραγωγικής κατάστασης και θεραπείες

Οι γεννήτορες αξιολογήθηκαν αναπαραγωγικά κατά την εκτιμώμενη αναπαραγωγική περίοδο (ημέρα 0). Στα αρσενικά άτομα, μετά τη λήψη δείγματος σπέρματος και αίματος έγινε χορήγηση είτε εμφυτευμάτων ελεγχόμενης έκλυσης GnRHα (n=3) σε δόση $59 \pm 2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ή ενέσεων hCG (n=4) σε δόση $617 \pm 46 \text{ IU kg}^{-1}$. Από τα θηλυκά, μόνο ένα βρέθηκε σε κατάλληλη αναπαραγωγική κατάσταση (Fakriadis, et al., 2019) και

του χορηγήθηκε εμφύτευμα GnRHa δόσης 97 $\mu\text{g kg}^{-1}$ GnRHa. Τα αρσενικά ψάρια ελέγχθηκαν ξανά στις ημέρες 3, 7 και 14 μετά τη θεραπεία και δείγματα σπέρματος και αίματος λαμβάνονταν σε κάθε δειγματοληψία, ενώ τις ίδιες ημέρες λαμβάνονταν και βιοψίες ωοθηκών από τα θηλυκά ψάρια.

Αξιολόγηση της ποιότητας σπέρματος

Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν: α) το ποσοστό κινούμενων σπερματοζωαρίων (%) με τη χρήση αυτοματοποιημένης ανάλυσης σπέρματος (computer assisted sperm analysis - CASA), β) η διάρκεια κίνησης μέχρι ποσοστού 5% των σπερματοζωαρίων (σε λεπτά), γ) η πυκνότητα σπέρματος (σε σπερματοζωάρια ml^{-1}) και δ) η επιβίωση σπέρματος στους 4°C (σε ημέρες). Για τις μετρήσεις του ποσοστού κινητικότητας και της διάρκειας κίνησης, τα σπερματοζωάρια ενεργοποιήθηκαν με τη χρήση θαλασσινού νερού το οποίο περιείχε BSA 2% και αραιώθηκαν ώστε να φαίνονται περίπου 200-300 κύτταρα στην οθόνη. Η κίνηση των σπερματοζωαρίων καταγράφηκε σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες βάθους 10 μm (Leja, IMV technologies) σε οπτικό μικροσκόπιο.

Εκτίμηση επιπέδων στεροειδών ορμονών στο πλάσμα

Το πλάσμα του αίματος διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση και διατηρήθηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυση. Για τον προσδιορισμό των στεροειδών (T, 11-KT, 17,20 β -P και E2) χρησιμοποιήθηκαν ELISA kits (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των στεροειδών ορμονών δύο φορές από 200 μl πλάσματος με 2 ml διαιθυλεθέρα. Η εκχύλιση έγινε με έντονη περιδίνηση των δειγμάτων για 3 λεπτά (Vibramax 110; Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach,

Germany). Στη συνέχεια, τα δείγματα καταψύχθηκαν για 10 λεπτά στους -80°C και η υπερκείμενη οργανική φάση μεταφέρθηκε σε νέα φιαλίδια και εξατμίστηκε υπό αέριο άζωτο (Pierce Reacti-Vap III, Thermo Scientific, Rockford, ΗΠΑ). Τα δείγματα ανασυστάθηκαν σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος για την ανάλυσή τους με τη χρήση ELISA.

Ιστολογική επεξεργασία

Οι βιοψίες των ωοθηκών αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (70-96%) και στη συνέχεια έγινε έγκλιση τους σε ρητίνη (Technovit 7100®, Heraeus Kulzer, Γερμανία). Τομές πάχους 3-5 μm κόπηκαν σε ημιαυτόματη μικροτόμο (Leica RM 2245, Γερμανία) και έγινε χρώση τους με Methylene Blue (Sigma, Γερμανία)/Azure II (Sigma, Γερμανία)/Basic Fuchsin (Polysciences, ΗΠΑ) σύμφωνα με τους Bennett et al. (Bennett et al., 1976), παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon, Eclipse 50i) και φωτογράφησή τους με ψηφιακή κάμερα (Jenoptik progress C12 plus).

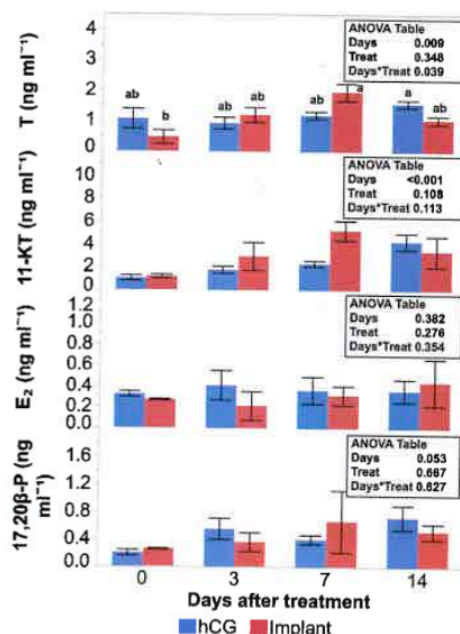
Στατιστική ανάλυση

Τα επίπεδα στεροειδών ορμονών στο αίμα και οι παράμετροι ποιότητας σπέρματος αναλύθηκαν με τη χρήση 2 way ANOVA, χρησιμοποιώντας ως ανεξάρτητες μεταβλητές τις «ημέρες μετά τη θεραπεία» (0, 3, 7, 14) και τη «θεραπεία» (hCG και GnRHa implants). Τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν όταν δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Το επίπεδο σημαντικότητας της στατιστικής ανάλυσης ορίστηκε σε $P < 0.05$. Όταν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε Tukey HSD test.

Αποτελέσματα

Τα αρσενικά δεν απελευθέρωναν σπέρμα μετά από κοιλιακή πίεση την ημέρα 0 (κατάσταση σπερμίας S0). Τα μισά ψάρια (n=2) μετά τη θεραπεία με hCG ήταν σε κατάσταση σπερμίας S2 την ημέρα 3 και S3 την ημέρα 14 μετά από τη θεραπεία, ενώ ένα ψάρι βρέθηκε σε κατάσταση σπερμίας S2 3 ημέρες μετά τη θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα. Τα υπόλοιπα ψάρια δεν παρήγαγαν σπέρμα μετά από κοιλιακή πίεση.

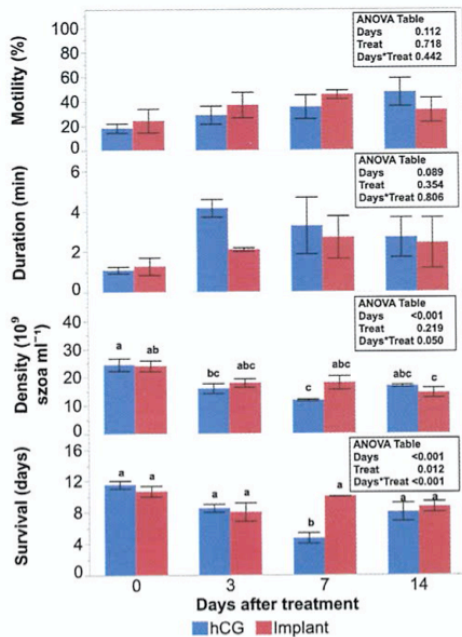
Η συγκέντρωση της T στον ορό του αίματος αυξήθηκε σημαντικά 7 ημέρες μετά τη θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα ενώ δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά μετά από τη θεραπεία με hCG (Εικόνα 3). Σημαντικά αυξήθηκε και η 11-KT, χωρίς ωστόσο να υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών θεραπειών. Τόσο η E2, όσο και η 17,20β-P δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά από τις θεραπείες.



Εικόνα 4: Μέση τιμή (\pm τυπικό σφάλμα) συγκέντρωσης τεστοστερόνης (T), 11-κετοτεστοστερόνης (11-KT), 17β -οιστραδιόλης (E2) και 17α,20β-διωδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνης (17,20β-P) στο πλάσμα αίματος αρσενικών γεννητόρων μαγιάτικου μετά από θεραπεία με ενέσεις hCG (n=4) ή εμφυτεύματα GnRHα (n=3). Η θεραπεία έγινε την ημέρα 0. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση 2-way ANOVA, $P < 0.05$.

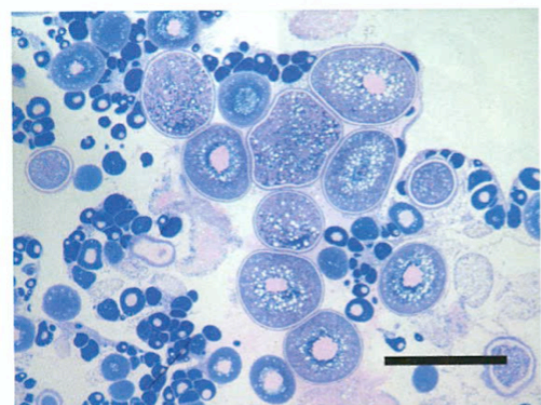
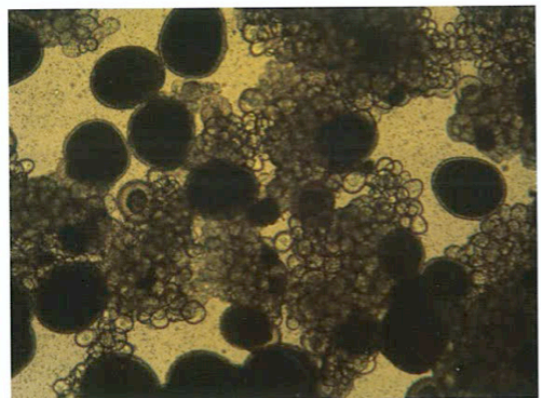
Οι ορμονικές θεραπείες δεν επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό και τη διάρκεια κινητικότητας του σπέρματος, αν και παρατηρήθηκε τάση αύξησης της τελευταίας παραμέτρου μετά τις θεραπείες (Εικόνα 4). Η πυκνότητα του σπέρματος μειώθηκε σημαντικά 3 ημέρες μετά τη θεραπεία με hCG, και παρέμεινε μειωμένη και στις 7 ημέρες, αλλά ανέκαμψε στις αρχικές τιμές 14 ημέρες μετά. Η θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα προκάλεσε

σημαντική μείωση της πυκνότητας του σπέρματος 14 ημέρες μετά τη θεραπεία. Όσον αφορά την επιβίωση του σπέρματος υπό ψύξη, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση 7 ημέρες μετά τη θεραπεία με hCG. Αντίθετα, η θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές στην ίδια παράμετρο.



Εικόνα 5: Μέση τιμή (\pm τυπικό σφάλμα) ποσοστού κινητικότητας, διάρκειας κινητικότητας, πυκνότητας και επιβίωσης υπό ψύξη σπέρματος γεννητόρων μαγιάτικου μετά από θεραπεία με hCG (n=4) ή GnRHα εμφυτεύματα (n=3). Η θεραπεία έγινε στην ημέρα 0. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση 2 way ANOVA, $P < 0.05$.

Όσον αφορά τα θηλυκά, παρατηρήθηκε μόνο ένα άτομο να φέρει λεκιθογενή ωκύτταρα σε προχωρημένη φάση (Εικόνα 6) παράλληλα με αρκετά πρωτογενή ωκύτταρα, ενώ τα υπόλοιπα είχαν είτε πρωτογενή ωκύτταρα είτε ωκύτταρα σε αρχικά στάδια λεκιθογένεσης.



Εικόνα 6: Άποψη βιοψίας ωθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιάτικου την ημέρα 0 του πειράματος, αμέσως μετά τη συλλογή τους (αριστερά), και μετά από ιστολογική επεξεργασία (δεξιά). Μήκος μπάρας = 500 μ m.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι τα θηλυκά ψάρια που διατηρούνται σε χερσαίες δεξαμενές που τροφοδοτούνται με νερό γέωτρησης δεν καταφέρνουν να ολοκληρώσουν τη λεκιθογένεση στη συντριπτική τους πλειοψηφία, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες στο μαγιάτικο (Fakriadis, et al., 2020c). Τα αρσενικά, αν και βρίσκονται σε κατάσταση σπερμίας, δεν παράγουν ικανή ποσότητα που θα μπορούσε να απελευθερωθεί με κοιλιακή πίεση, λόγω

των ισχυρών μυικών στρωμάτων της κοιλιακής χώρας ή και της περιορισμένης παραγόμενης ποσότητας (Fakriadis & Mylonas, 2021). Οι ορμονικές θεραπείες, τόσο με hCG όσο και με εμφυτεύματα GnRHα προκάλεσαν την έκλυση ποσότητας σπέρματος την ημέρα 3 μετά από κοιλιακή πίεση σε κάποια από τα ψάρια. Το μαγιάτικο κατατάσσεται στην κατηγορία των ψαριών με μικρή παραγωγή σπέρματος σε συνθήκες εκτροφής, μια αναπαραγωγική δυσλειτουργία που έχει καταγραφεί για πολλά είδη ψαριών (Mylonas, et al., 2017).

Όσον αφορά τα στεροειδή, δεν παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση μετά την χορήγηση των θεραπειών, παρά μόνο αύξηση της 11-KT, χωρίς ωστόσο η επίδραση να είναι διαφορετική μεταξύ των θεραπειών, και σημαντική αύξηση της T κατά 4 φορές 7 ημέρες μετά τη θεραπεία με εμφυτεύματα GnRHα. Η αντίστοιχη αύξηση της T μετά από χορήγηση εμφυτευμάτων GnRHα στον κρανιό ήταν περίπου 10-12 φορές, και της 11-KT περίπου 3 φορές, 2 ημέρες μετά τη θεραπεία (Fakriadis, et al., 2020b). Στην ίδια μελέτη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μετά τη θεραπεία στην 17,20β-P, όπως και στην παρούσα μελέτη. Ενδεχομένως, η δόση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη να μην ήταν ικανή να προκαλέσει σημαντική αύξηση των στεροειδών και ενδέχεται να χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την εύρεση της βέλτιστης δόσης. Για παράδειγμα, η χρησιμοποιούμενη δόση hCG στα ψάρια σε πειράματα ενίσχυσης της σπερμίας έχει δειχθεί να είναι περίπου 2 φορές μεγαλύτερη από αυτή της παρούσας μελέτης (Mylonas, et al., 2017), ωστόσο σχετικές μελέτες στο μαγιάτικο δεν έχουν δημοσιευτεί. Η μοναδική μελέτη με χρήση hCG σε μαγιάτικο αναφέ-

ρει δόση 1000 IU kg⁻¹, με αναφορά μάλλον τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά ψάρια, ωστόσο δεν έγιναν συγκριτικές μετρήσεις στεροειδών (Kozul et al., 2001). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι παρήχθησαν γονιμοποιημένα αυγά και τα αρσενικά έφεραν σπέρμα με ποσοστά κινητικότητας 50-90%, τιμές συγκριτικά υψηλότερες από αυτές της παρούσας μελέτης. Στην παρούσα μελέτη η χορήγηση εμφυτευμάτων GnRHα έγινε με την ίδια περίπου δόση που αναφέρεται σε σειρά πρόσφατων μελετών (Fakriadis & Mylonas, 2021; Fakriadis, et al., 2019; Fakriadis, et al., 2020a; Fakriadis, et al., 2020c; Jerez, et al., 2018), κατά τις οποίες έχουν συλλεχθεί κατά περίπτωση καλής ποιότητας γονιμοποιημένα αυγά, δηλαδή τα αρσενικά παρήγαγαν ικανές ποσότητες σπέρματος για την γονιμοποίηση των αυγών. Ωστόσο, παραμένει το ερώτημα αν μια βελτιωμένη παραγωγή σπέρματος από τα αρσενικά θα μπορούσε να βελτιώσει τα σχετικά χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης που παρατηρούνται στο μαγιάτικο, σε σχέση με άλλα είδη όπως ο κρανιός, η τσιπούρα και το λαβράκι (Karamanlidis, 2017; Mylonas et al., 2016; Superio et al., 2021).

Συμπερασματικά, οι θεραπείες με εμφυτεύματα GnRHα και με ενέσεις hCG προκάλεσαν την απελευθέρωση σπέρματος σε κάποια, αλλά όχι σε όλα τα άτομα μαγιάτικου 3 ημέρες μετά τη χορήγησή τους και αύξηση της συγκέντρωσης της T στις 7 ημέρες μετά τη χορήγηση εμφυτευμάτων GnRHα. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες προκειμένου να βρεθεί η καταλληλότερη ορμονική θεραπεία στην κατάλληλη δόση, η οποία θα οδηγήσει στην απελευθέρωση σπέρματος ικανής

ποσότητας και ποιότητας για τη γονιμοποίηση μεγάλου αριθμού αυγών.

Βιβλιογραφία

- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technology*. 51, 71-97.
- 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 Physiology and Biochemistry*. 19, 349-357.
- Corriero, A., Medina, A., Mylonas, C.C., Bridges, C.R., Santamaria, N., Deflorio, M., Losurdo, M., Zupa, R., Gordin, H., de la Gándara, F., Belmonte Ríos, A., Pousis, C., De Metrio, G., 2009. Proliferation and apoptosis of male germ cells in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) treated with gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH_a). *Animal Reproduction Science*. 116, 346-357.
- Fakriadis, I., Mylonas, C.C., 2021. Sperm quality of greater amberjack *Seriola dumerili* throughout the reproductive season and in response to GnRH_a treatment with controlled release implants. *Fish Physiology and Biochemistry*.
- Fakriadis, I., Lisi, F., Sigelaki, I., Papadaki, M., Mylonas, C.C., 2019. Spawning kinetics and egg/larval quality of greater amberjack (*Seriola dumerili*) in response to multiple GnRH_a injections or implants. *General and Comparative Endocrinology*. 279, 78-87.
- Fakriadis, I., Miccoli, A., Karapanagiotis, S., Tsele, N., Mylonas, C.C., 2020a. Optimization of a GnRH_a treatment for spawning commercially reared greater amberjack *Seriola dumerili*: Dose response and extent of the reproductive season. *Aquaculture*. 521, 735011.
- Fakriadis, I., Zanatta, E.M., Fleck, R., Sena Mateo, D.L., Papadaki, M., Mylonas, C.C., 2020b. Endocrine regulation of long-term enhancement of spermiation in meagre (*Argyrosomus regius*) with GnRH_a controlled-delivery systems. *Gen Comp Endocrinol*. 297, 113549.
- Fakriadis, I., Sigelaki, I., Papadaki, M., Papandroulakis, N., Raftopoulos, A., Tsakoniti, K., Mylonas, C.C., 2020c. Control of reproduction of greater amberjack *Seriola dumerili* reared in aquaculture facilities. *Aquaculture*. 519, 734880.
- Jerez, S., Fakriadis, I., Papadaki, M., Martín, M., Cejas, J., Mylonas, C.C., 2018. Spawning induction of first-generation (F1) greater amberjack *Seriola dumerili* in the Canary Islands, Spain using GnRH_a delivery systems. *Fishes*. 3, 1-22.
- Karamanlidis, D., 2017. Evolution of sex ratio and egg production in a population of gilthead seabream (*Sparus aurata*) over the course of five reproductive seasons, Biology Department. University of Crete, Crete, Greece, pp. 46.
- Kozul, V., Skaramuca, B., Glamuzina, B., Glavic, N., Tutman, P., 2001. Comparative gonadogenesis and hormonal induction of spawning of cultured and wild mediterranean amberjack (*Seriola dumerili*, Risso 1810). *Scientia Marina*. 65, 215-220.
- Miura, T., Miura, C., 2001. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis. *Zoological Science*. 18, 1055-1063.

- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10, 463-491.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 516-534.
- Mylonas, C.C., Duncan, N.J., Asturiano, J.F., 2017. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*. 472, 21-44.
- Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y., Zohar, Y., 1997a. 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., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L., Zohar, Y., 1997b. Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. *Biology of Reproduction*. 57, 669-675.
- Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*. 246, 467-481.
- Mylonas, C.C., Salone, S., Biglino, T., de Mello, P.H., Fakriadis, I., Sigelaki, I., Duncan, N., 2016. Enhancement of oogenesis/spermatogenesis in meagre *Argyrosomus regius* using a combination of temperature control and GnRHa treatments. *Aquaculture*. 464, 323-330.
- 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.
- Sarih, S., Djellata, A., La Barbera, A., Fernández-Palacios Vallejo, H., Roo, J., Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H., 2018. High-quality spontaneous spawning in greater amberjack (*Seriola dumerili*, Risso 1810) and its comparison with GnRHa implants or injections. *Aquaculture Research*. 49, 3442-3450.
- Sarih, S., Djellata, A., Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H., 2019. Effects of increased protein, histidine and taurine dietary levels on egg quality of greater amberjack (*Seriola dumerili*, Risso, 1810). *Aquaculture*. 499, 72-79.
- Sarih, S., Djellata, A., Fernández-Palacios, H., Ginés, R., Fontanillas, R., Rosenlund, G., Izquierdo, M., Roo, J., 2020. Adequate n-3 LC-PUFA levels in broodstock diets optimize reproductive performance in GnRH injected greater amberjack (*Seriola dumerili*) equaling to spontaneously spawning broodstock. *Aquaculture*. 520, 735007.
- 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.
- Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carrillo, M., Zohar, Y., 1996. Sustained

Miura, T., Miura, C.I., 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28, 181-186.

administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. *Journal of Experimental Zoology*. 276, 361-368.

Superio, J., I., F., Tsigenopoulos, C.S., Lancerotto, S., Rodriguez, A.V., Vervelakis, E., Mylonas, C.C., 2021. Spawning kinetics and parentage contribution of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) broodstocks and influence of GnRHa-induced spawning. *Aquaculture Reports*, (under review).

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 Physiology and Biochemistry*. 22, 77-87.

Vizziano, D., Fostier, A., Loir, M., Le Gac, F., 2008. Testis development, its hormonal regulation and spermiation induction in teleost fish, in: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.), *Fish Spermatology*. Alpha Science Intl, Oxford (UK), pp. 103-139.

Zadmajid, V., 2016. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and Ovaprim™ (sGnRHa+domperidone) on the reproductive characteristics of wild-caught male Longspine scraper, *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). *Aquaculture*. 463, 7-15.

Zupa, P., Fauvel, C., Mylonas, C.C., Pousis, C., Santamaría, C.A., Papadaki, M., Fakriadis, I., V., C., 2017a. Rearing in captivity affects spermatogenesis and sperm quality in greater amberjack, *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Journal of animal science*. 95, 4085-4100.

Zupa, R., Rodríguez, C., Mylonas, C.C., Rosenfeld, H., Fakriadis, I., Papadaki, M., Pérez, J.A., Pousis, C., Basilone, G., Corriero, A., 2017b. Comparative study of reproductive development in wild and captive-reared greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *PLoS One*. 12, e0169645.

Για περισσότερες πληροφορίες μπορείτε να επισκεφθείτε το:

<https://magiatiko.weebly.com/>



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης