

Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068



Παραδοτέο

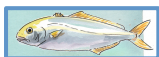
Αριθμός Παραδοτέου:	Π1.4.1	Μήνας Παράδοσης ΤΠΕ:	24
Τίτλος Παραδοτέου	Επίδραση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) στη γαμετογένεση του μαγιατικού σε δεξαμενές και παραγωγή αυγών		
Ενότητα Εργασίας (ΕΕ):	1	Συντονιστής ΕΕ:	ΙΘΑΒΒΥΚ
Τίτλος ΕΕ:	Διαχείριση γεννητόρων και αναπαραγωγή		
Αριθμός Εργασίας:	1.4	Υπεύθυνος Παραδοτέου:	ΙΘΑΒΒΥΚ
Τίτλος εργασίας:	Χρήση ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης για την προαγωγή της γαμετογένεσης σε μαγιατικά που διατηρούνται σε δεξαμενές		
Εταίροι:	ΙΘΑΒΒΥΚ		
Κατάσταση:	Ολοκληρωμένο	Μήνας παράδοσης:	20
.....			

Υπεύθυνοι ερευνητές για το παραδοτέο: Φακριάδης, Ι. (ΙΘΑΒΒΥΚ), Μυλωνάς, Κ. (ΙΘΑΒΒΥΚ)

Σύντομη περιγραφή (ΤΠΕ):

Η έκθεση θα περιλαμβάνει την συγκριτική αξιολόγηση βιοψιών ωοθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιατικού, παραγωγής σπέρματος, όπως επίσης και δεδομένα ποσότητας και ποιότητας αυγών που θα παραχθούν.





Εισαγωγή

Η αναπαραγωγική λειτουργία στα σπονδυλωτά ελέγχεται ενδοκρινολογικά μέσω του άξονα εγκεφάλου – υπόφυσης – γονάδας (Munoz-Cueto et al., 2020; Trudeau and Somoza, 2020; Zohar et al., 2010). Ο εγκέφαλος επεξεργάζεται ενδογενή σήματα, όπως το αναπτυξιακό στάδιο, το μέγεθος, η ποσότητα των διαθέσιμων θρεπτικών και τα ενεργειακά αποθέματα του οργανισμού, αλλά και εξωγενή – περιβαλλοντικά σήματα, όπως η θερμοκρασία, η φωτοπερίοδος και η παρουσία ατόμων του άλλου φύλου και ρυθμίζει την έκκριση ή όχι της γοναδοεκλυτίνης (gonadotropin releasing hormone – GnRH), ενός νευροπεπτιδίου μήκους 10 αμινοξέων (Karine et al., 2020; Munoz-Cueto et al., 2020; Parker and Cheung, 2020). Στη συνέχεια, η GnRH δεσμεύεται στους αντίστοιχους υποδοχείς των γοναδοτρόπων κυττάρων, που βρίσκονται στην υπόφυση, και διεγείρει τη σύνθεση και την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών (gonadotropins – GtHs), δηλαδή της ωοθυλακιοτρόπου (follicle stimulating hormone – FSH) και ωχρινοποιητικής (luteinizing hormone – LH) ορμόνης, οι οποίοι είναι οι βασικοί ρυθμιστές της ωρίμανσης των γονάδων (Levani-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010). Οι FSH και LH είναι ετεροδιμερείς ενώσεις, με μια κοινή α υπομονάδα και διαφέρουν στις β υπομονάδες τους (Levani-Sivan et al., 2010; Rosenfeld et al., 2007). Στα σολομοειδή, τα οποία κατατάσσονται στα σύγχρονα ψάρια όσον αφορά την ωοτοκία τους, η FSH έχει κυρίαρχο ρόλο στην πρώιμη ωογένεση / σπερματογένεση, ενώ η LH εμπλέκεται κυρίως στα τελικά στάδια της ωρίμανσης. Ωστόσο, σε ασύγχρονα ψάρια η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη και οι διαθέσιμες μελέτες είναι πολύ λιγότερες, χωρίς κανένα προφανές προκαθορισμένο πρότυπο λειτουργίας των παραπάνω ορμονών (Rosenfeld et al., 2007) (Rosenfeld, et al., 2007). Με τη σειρά τους οι GtHs επιδρούν στο επίπεδο της γονάδας, όπου και ρυθμίζουν την έκκριση των στεροειδών ορμονών. Η οιστραδιόλη (17β-estradiol – E₂) θεωρείται υπεύθυνη για την ανάπτυξη των ωαρίων κατά το στάδιο της λεκιθογένεσης, (Levani-Sivan et al., 2010) ενώ στα αρσενικά η τεστοστερόνη (testosterone – T) και κυρίως η 11-κετοτεστοστερόνη (11-ketotestosterone - 11-KT) είναι υπεύθυνες για τη σπερματογένεση και σπερμιογένεση, με την 11-KT να παρουσιάζει υψηλές τιμές πριν από την έναρξη της περιόδου σπερμίας (Schulz et al., 2010). Οι προγεστίνες, με κύρια προγεστερόνη 17α,20β-διυδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνη (17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one - 17,20β-P) προκαλούν ωρίμανση των γαμετών και ρυθμίζουν την απελευθέρωσή τους (Levani-Sivan et al., 2010; Vizziano et al., 2008).

Ωστόσο, πολλά είδη παρουσιάζουν αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες κατά την προσπάθεια εκτροφής τους, και παρατηρούνται περισσότερο συχνά στα θηλυκά. Η πιο συνηθισμένη δυσλειτουργία είναι η απουσία ή η αναξιόπιστη ωρίμανση των ωοκυττάρων, ωορρηξία και ωοτοκία, και οφείλεται στην έλλειψη σύνθεσης ή/και απελευθέρωσης της LH στο τέλος της λεκιθογένεσης (Zohar and Mylonas, 2001). Για να ξεπεραστούν τέτοιες δυσλειτουργίες έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ορμονικά σκευάσματα τα προηγούμενα χρόνια, με τη χρήση GnRHα να έχει αρκετά συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων (Mylonas et al., 2010). Ωστόσο, και η GnRHα δεν είναι ικανή να ρυθμίσει την αναπαραγωγική διαδικασία ψαριών που δεν έχουν ολοκληρώσει τη διαδικασία της λεκιθογένεσης. Πρόσφατα, η παραγωγή ανασυνδυασμένης FSH και LH επέτρεψε τη χρήση τους και σε ψάρια που δεν εμπίπτουν στην παραπάνω κατηγορία, και υπάρχουν αναφορές για πολύ θετικά αποτελέσματα, αν και η αξιοπιστία τους και αποδοτικότητά τους είναι ακόμη υπό κρίση (Kobayashi et al., 2010; Levani-Sivan et al., 2010; Mylonas et al., 2017).

Έχει παρατηρηθεί ότι οι γεννήτορες μαγιάτικου που διατηρούνται σε χερσαίες εγκαταστάσεις δεν ολοκληρώνουν την διαδικασία της γαμετογένεσης, αλλά συχνά σταματούν σε αρχικά στάδια λεκιθογένεσης (θηλυκά) ή δεν παράγουν σπέρμα (αρσενικά) (Fakriadis et al., 2020b; Micale et al., 1998; Micale et al., 1997). Δεδομένου ότι τέτοιας έντασης δυσλειτουργία δεν παρατηρείται να συμβαίνει σε ιχθυοκλωβούς όπου διατηρούνται γεννήτορες αντίστοιχου μεγέθους (Fakriadis et al., 2019; Fakriadis et al., 2020a; Fakriadis and Mylonas, 2021; Zupa et al., 2017a; Zupa et al., 2017b), ενδέχεται να σχετίζεται με την ύπαρξη νερού γεώτρησης που χρησιμοποιείται κατά κόρον στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς (για λόγους βιοασφάλειας) ή του μικρού μεγέθους των δεξαμενών σε σχέση με τους ιχθυοκλωβούς (Fakriadis et al., 2020b). Αυτή η δυσλειτουργία παρατηρείται και στον κέφαλο (*Mugil cephalus*) και έχει αντιμετωπιστεί επιτυχώς με την χρήση ανασυνδυασμένων ορμονικών θεραπειών (Aizen et al., 2005; Ramos-Júdez et al., 2021a). Πρόσφατα η συγκεκριμένη τεχνολογία δοκιμάστηκε και σε ένα συγγενικό είδος του μαγιάτικου, το μαγιάτικο της Αυστραλίας (*Seriola lalandi*), σε ανώριμα θηλυκά και αρσενικά άτομα, στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της E₂ και ανάπτυξη ωοκυττάρων στα θηλυκά, και ανάπτυξη της σπερματογένεσης στα αρσενικά (Sanchis-Benlloch et al., 2017), αποτελέσματα που κρίνονται πολύ ενθαρρυντικά για τη βελτίωση



του ελέγχου της αναπαραγωγής στο συγκεκριμένο είδος. Στο μαγιάτικο αν και έχει παρασκευαστεί η re-FSH τόσο από συνεργάτες του προγράμματος DIVERSIFY (Meiri-Ashkenazi et al., 2021) όσο και από Ιάπωνες συναδέλφους (Nyuji et al., 2016) για τη μελέτη της φυσιολογίας της αναπαραγωγής του συγκεκριμένου είδους, η re-FSH δεν έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση αυτών των αναπαραγωγικών δυσλειτουργιών.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να ελεγχθεί αν η χορήγηση re-FSH σε μαγιάτικα που διατηρούνται σε δεξαμενές στις οποίες παρέχεται θαλασσινό νερό γεώτρησης θα μπορούσε να οδηγήσει στην ολοκλήρωση της λεκθογένεσης από τα θηλυκά και της σπερματογένεσης από τα αρσενικά. Στη συνέχεια, στόχος ήταν η επαγωγή της τελικής ωρίμανσης των γαμετών να ρυθμιστεί με τη χρήση GnRHα εμφυτευμάτων, ενός πρωτοκόλλου που έχει εφαρμοστεί επιτυχώς τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά μαγιάτικα, όταν τα ψάρια έχουν ολοκληρώσει τη φάση της λεκθογένεσης και σπερματογένεσης (Fakriadis et al., 2019; Fakriadis et al., 2020a; Fakriadis and Mylonas, 2021; Fakriadis et al., 2020b).

Υλικά και Μέθοδοι

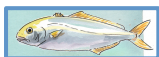
Διαχείριση γεννητόρων, θεραπείες και εκτίμηση αναπαραγωγικής κατάστασης

Οι γεννήτορες διατηρούνταν σε δύο δεξαμενές στις εγκαταστάσεις των Aqualabs στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (ΙΘΑΒΒΥΚ) (Πίνακας 1). Τα ψάρια αλιεύθηκαν το 2011 με γρι γρι στην περιοχή του Αστακού Αιτωλοακαρνανίας και μεταφέρθηκαν στις χερσαίες εγκαταστάσεις το 2014, όταν το βάρος τους ήταν 5-7 kg. Τα ψάρια τρέφονταν με ξηρή τροφή (Vitalis CAL, 22 mm, Skretting, Norway).

Πίνακας 1: Περιγραφή των διαφορετικών ομάδων γεννητόρων που διατηρούνταν σε δεξαμενές στα Aqualabs.

Γεννήτορες	Μέθοδος εκτροφής	Όγκος (m ³)	Αριθμός ατόμων (Αρσ./Θηλ.)	Βάρος (kg)	Τροφή
S1-reFSH	δεξαμενές	40	6/3	13.6-22.7	ξηρή τροφή
S2-control	δεξαμενές	40	5/5	13.5-21.5	ξηρή τροφή

Οι γεννήτορες διατηρούνταν σε τεχνητά προσομοιωμένη φυσική φωτοπερίοδο και θερμοπερίοδο και το νερό που τους παρέχόταν ήταν θαλασσινό νερό από γεώτρηση. Σε εβδομαδιαία βάση γίνονταν μετρήσεις θερμοκρασίας, διαλυμένου οξυγόνου, pH, NH₃-N και NO₂-N. Οι διαχειρίσεις των γεννητόρων έγιναν με τη χρήση αναισθησίας. Πιο συγκεκριμένα, μετά από νηστεία δύο ημερών έγινε χρήση χαμηλής συγκέντρωσης αναισθησίας (γαρυφαλέλαιο 0.01ml l⁻¹) στη δεξαμενή που βρίσκονταν οι γεννήτορες (Mylonas et al., 2005). Στη συνέχεια, τα ψάρια μεταφέρονταν χωριστά σε δεξαμενή 1 m³ που περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση αναισθητικού (γαρυφαλέλαιο 0.03ml l⁻¹) με σκοπό την πλήρη αναισθητοποίησή τους, και έγινε λήψη βιοψίας ωοθηκών από τα θηλυκά και δείγματος σπέρματος από τα αρσενικά, 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 για περαιτέρω ιστολογική επεξεργασία. Στα αρσενικά, εφαρμόστηκε κοιλιακή πίεση για την εκτίμηση της κατάστασης σπερμίας. Επειδή δεν ήταν εφικτή η απελευθέρωση σπέρματος με αυτόν τον τρόπο, πιθανώς λόγω της μικρής παραγόμενης ποσότητας σπέρματος αλλά και των ισχυρών κοιλιακών μυϊκών τοιχωμάτων



στο μαγιάτικο, έγινε χρήση καθετήρα. όπως περιγράφηκε παραπάνω και για τα θηλυκά. Οι γεννήτορες, μετά τη διαχείρισή τους μεταφέρονταν σε δεξαμενή με καθαρό θαλασσινό νερό.

Οι γεννήτορες της δεξαμενής S1 (**Πίνακας 1**), ένα περίπου μήνα πριν την εκτιμώμενη αναπαραγωγική περίοδο (11 Μαΐου) κατά την εκτιμώμενη αρχική φάση λεκιθογένεσης σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (Zura et al., 2017b), αξιολογήθηκαν αναπαραγωγικά και έγινε χορήγηση re-FSH με δόση $4.9 \pm 0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ re-FSH. Η επαναξιολόγηση των γεννητόρων έγινε περίπου ένα μήνα αργότερα, στις 14 Ιουνίου, ακολουθώντας τις ίδιες διαδικασίες που περιεγράφηκαν παραπάνω. Οι γεννήτορες της S2 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας του πειράματος και αξιολογήθηκαν αναπαραγωγικά κατά την εκτιμώμενη αναπαραγωγική τους περίοδο στις 12 Ιουνίου.

Αξιολόγηση της ποιότητας σπέρματος

Τα δείγματα σπέρματος λήφθηκαν μετά από καθαρισμό και στέγνωμα του γεννητικού πόρου, για την αποφυγή επιμόλυνσης. Το κάθε δείγμα σπέρματος αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια 1.5 ml και διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι τη μεταφορά τους σε ψυγείο στους 4°C , και αξιολογήθηκαν 2-3 ώρες μετά από την συλλογή. Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν: α) το ποσοστό κινούμενων σπερματοζωαρίων (%), β) η διάρκεια κίνησης μέχρι ποσοστού 5% των σπερματοζωαρίων (λεπτά), γ) πυκνότητα σπέρματος (σπερματοζωάρια ml^{-1}) και δ) επιβίωση σπέρματος σε συντήρηση στους 4°C .

Ιστολογική επεξεργασία

Οι βιοψίες των ωοθηκών αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (70-96%) και στη συνέχεια εγκιβωτίστηκαν σε ρητίνη (Technovit 7100[®], Heraeus Kulzer, Γερμανία). Ελήφθησαν τομές πάχους 3 μm με μικροτόμο (Leica RM 2245, Γερμανία). Έγινε χρώση των τομών με Methylene Blue (Sigma, Γερμανία)/Azure II (Sigma, Γερμανία)/Basic Fuchsin (Polysciences, ΗΠΑ) σύμφωνα με τους Bennett et al. (Bennett et al., 1976). Οι τομές ελέγχθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon, Eclipse 50i) και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα (Jenoptik progress C12 plus).

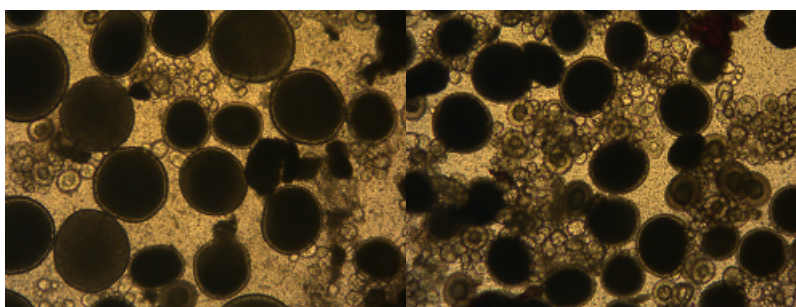
Στατιστική ανάλυση

Στις παραμέτρους ποιότητας σπέρματος χρησιμοποιήθηκε t test για τις συγκρίσεις των παραμέτρων μεταξύ των διαφορετικών δειγματοληψιών (Μάιος – Ιούνιος) στην θεραπεία με re-FSH και μεταξύ της θεραπείας re-FSH και του μάρτυρα. Το επίπεδο σημαντικότητας της στατιστικής ανάλυσης ορίστηκε σε $P < 0.05$.

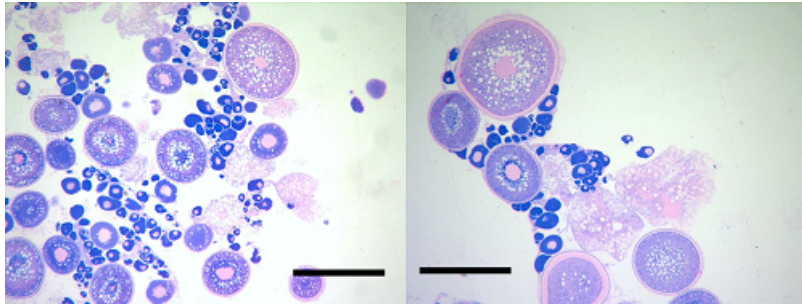
Αποτελέσματα

Θηλυκά

Τον Μάιο τα θηλυκά ήταν σε φάση λεκιθογένεσης, έχοντας αρκετά πρωτογενή και σε αρχική φάση λεκιθογένεσης ωοκύτταρα (**Εικόνα 1** και **2**). Σε ένα από τα ψάρια που έγινε βιοψία ωοθήκης βρέθηκαν τα μεγαλύτερα λεκιθογενή ωοκύτταρα με διάμετρο 620 μm .

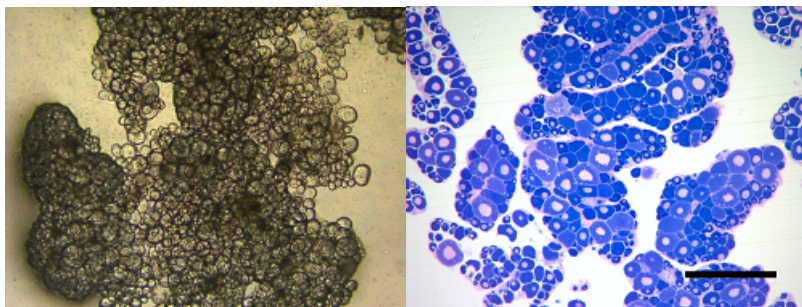


Εικόνα 1: Άποψη βιοψίας ωοθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιάτικου στις 11 Μαΐου πριν τη χορήγηση της θεραπείας re-FSH, αμέσως μετά τη συλλογή τους.



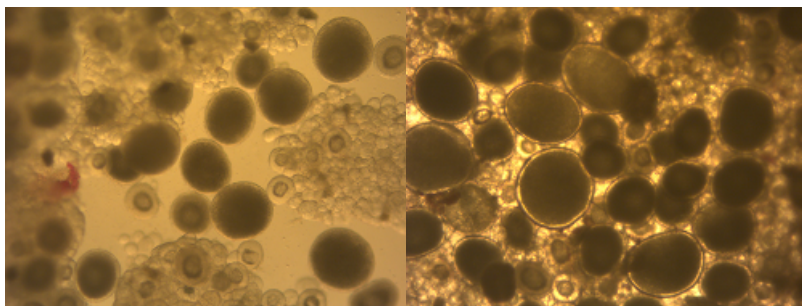
Εικόνα 2: Αποψη βιοψίας ωθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιάτικου στις 11 Μαΐου πριν τη χορήγηση της θεραπείας re-FSH μετά από ιστολογική επεξεργασία. (Κάτω τμήμα). Μήκος μπάρας = 500 μm.

Ένα μήνα μετά από τη χορήγηση της θεραπείας re-FSH τα θηλυκά έφεραν μόνο πρωτογενή ωοκύτταρα (**Εικόνα 3** και **4**).

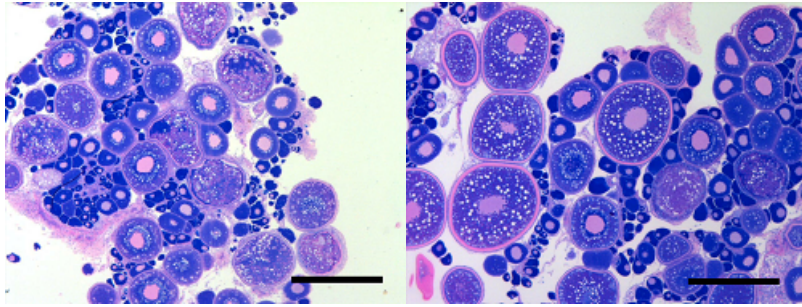


Εικόνα 3: Αποψη βιοψίας ωθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιάτικου στις 12 Ιουνίου μετά τη χορήγηση της θεραπείας re-FSH, αμέσως μετά τη συλλογή τους (Αριστερά), και μετά από ιστολογική επεξεργασία. (Δεξιά). Μήκος μπάρας = 500 μm.

Στη δεξαμενή S2 του μάρτυρα τα θηλυκά ήταν σε αντίστοιχη φάση με την κατάσταση που βρίσκονταν τα θηλυκά της S1 στη δειγματοληψία του Μαΐου, δηλαδή έφεραν αρκετά πρωτογενή ωοκύτταρα, ενώ κάποια θηλυκά βρέθηκαν σε φάση λεκιθογένεσης. Σε ένα από τα ψάρια που έγινε βιοψία ωθήκης βρέθηκαν τα μεγαλύτερα λεκιθογενή ωοκύτταρα με διάμετρο 600 μm.



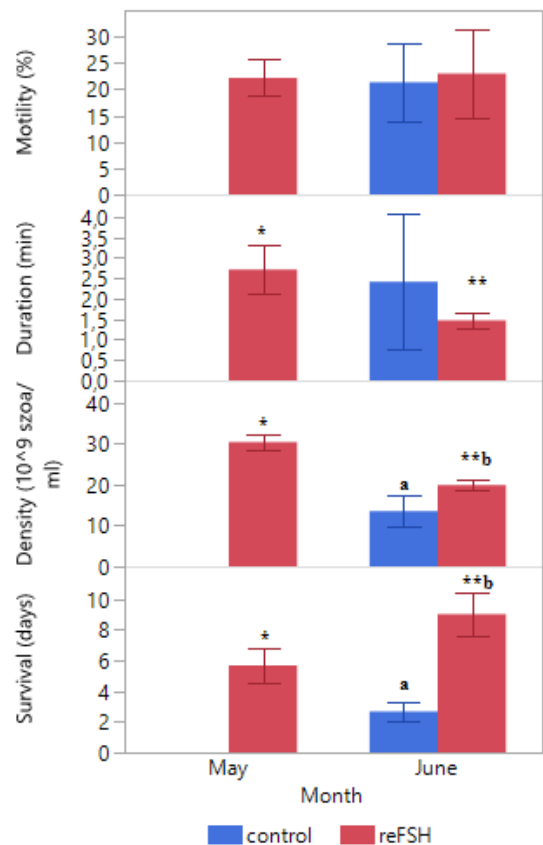
Εικόνα 3: Αποψη βιοψίας ωθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιάτικου στις 12 Ιουνίου από τη δεξαμενή του μάρτυρα, αμέσως μετά τη συλλογή τους.



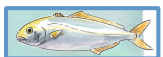
Εικόνα 4: Αποψη βιοψίας ωοθηκών θηλυκών γεννητόρων μαγιάτικου στις 12 Ιουνίου από τη δεξαμενή του μάρτυρα, μετά από ιστολογική επεξεργασία. Μήκος μπάρας = 500 μm .

Αρσενικά

Τα αρσενικά βρέθηκαν σε κατάσταση σπερμίας από τη δειγματοληψία του Μαΐου, και πριν τη θεραπεία με re-FSH. Σπερμιάζοντα ήταν και ένα μήνα μετά, όπως και τα ψάρια του μάρτυρα την ίδια περίοδο. Το ποσοστό κινητικότητας κυμάνθηκε γύρω στο 20-25%, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές (**Εικόνα 4**). Η διάρκεια κινητικότητας μειώθηκε ένα μήνα μετά τη χορήγηση θεραπείας re-FSH, αν και δεν ήταν διαφορετική από τις τιμές που βρέθηκαν στους αρσενικούς γεννήτορες του μάρτυρα (t test, $P < 0.05$). Αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε και στην πυκνότητα του σπέρματος, με τα ψάρια μετά τη θεραπεία με re-FSH να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με τα ψάρια του μάρτυρα (t test, $P < 0.05$). Αντίθετα, η επιβίωση του σπέρματος υπό ψύξη αυξήθηκε μετά τη θεραπεία με re-FSH και ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τις τιμές του μάρτυρα (t test, $P < 0.05$).



Εικόνα 4: Μέση (\pm τυπικό σφάλμα) κινητικότητα σπερματοζωαρίων (%), διάρκεια κινητικότητας σπερματοζωαρίων (min), πυκνότητα σπερματοζωαρίων (10^9 σπερματοζωάρια ml^{-1}) και επιβίωση υπό συντήρηση στους 4°C (days). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών των παραμέτρων ποιότητας σπέρματος των δειγματοληψιών Μαΐου – Ιουνίου στα δείγματα σπέρματος που λήφθηκαν από την ομάδα ψαριών re-FSH, ενώ τα μικρά λατινικά γράμματα διαφορές μεταξύ των ομάδων re-FSH και μάρτυρα (t test, $P < 0.05$).



Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει παλιότερες που έχει φανεί η επίδραση, πιθανότατα, του νερού γεώτρησης να επηρεάζει αρνητικά την ομαλή αναπαραγωγική ανάπτυξη των θηλυκών ψαριών (Fakriadis et al., 2020b). Παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός θηλυκών ψαριών να φέρουν λεκιθογενή ωοκύτταρα σε τελική φάση λεκιθογένεσης, ενώ η διάμετρός τους ήταν παρόμοια με αυτή που έχει μετρηθεί και στο παρελθόν σε πειράματα με τις ίδιες συνθήκες (Fakriadis et al., 2020b). Ωστόσο, η χορήγηση re-FSH δεν φάνηκε να επιδρά θετικά στην αναπαραγωγική ανάπτυξη των θηλυκών, αφού ένα μήνα μετά τα ψάρια βρέθηκαν να έχουν υποχωρήσει σε πρότερες φάσεις αναπαραγωγικής ανάπτυξης. Ενδεχομένως, η χορήγηση της ανασυνδυασμένης FSH θα έπρεπε να γίνει νωρίτερα, σε πιο πρώιμο στάδιο αναπαραγωγικής ανάπτυξης ώστε να ενισχύσει την προσπάθεια των θηλυκών να ολοκληρώσουν τη λεκιθογένεση. Άλλωστε, η FSH θεωρείται η γοναδοτροπίνη που ρυθμίζει κυρίως το στάδιο αυτό, με την LH να έχει ουσιαστικότερο ρόλο στην τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων (Levani-Sivan et al., 2010). Στο μαγιάτικο, σε αλιευμένα ψάρια, έχει βρεθεί η συγκέντρωση της FSH στην υπόφυση να αυξάνεται στα θηλυκά μεταξύ της περιόδου που τα ψάρια είναι σε αρχική λεκιθογένεση και σε περίοδο ωοτοκίας, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στις τιμές της FSH στον ορό του αίματος για τις αντίστοιχες περιόδους (Meiri-Ashkenazi et al., 2021). Επιπλέον, στις περισσότερες περιπτώσεις που εφαρμόστηκε πρωτόκολλο υποβοήθησης της γαμετογένεσης των ψαριών με ανασυνδυασμένες ορμόνες, όπως η περίπτωση του κέφαλου (Ramos-Júdez et al., 2021b), αυτό έγινε με τη χορήγηση πολλαπλών θεραπειών σε διάρκεια πολλών εβδομάδων, ενώ η αναπαραγωγική φάση των ψαριών ήταν πολύ πιο πρώιμη από την αναπαραγωγική φάση που βρίσκονταν τα θηλυκά στην παρούσα μελέτη την περίοδο του Μαΐου.

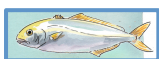
Στα αρσενικά από την άλλη, η επίδραση της θεραπείας re-FSH φάνηκε να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα θηλυκά καθότι βρέθηκαν να είναι σπερμιάζοντα και ένα μήνα μετά τη θεραπεία. Πιθανότατα, η επίδραση της FSH να είναι διαφορετική μεταξύ των δύο φύλων, όπως έχει δείχθει να συμβαίνει σε πολλά ψάρια (Rosenfeld et al., 2007). Πρόσφατα, η συγκέντρωση της FSH στην υπόφυση αλιευμένων αρσενικών γεννητόρων μαγιάτικου βρέθηκε να μην διαφέρει σημαντικά μεταξύ της περιόδου σπερματογένεσης και σπερμίας, όπως φάνηκε να συμβαίνει και με τις τιμές της FSH στον ορό του αίματος (Meiri-Ashkenazi et al., 2021). Ενδέχεται, στα αρσενικά η διακύμανση της FSH να είναι σημαντικότερη σε ακόμη πιο πρώιμα στάδια, αφού φαίνεται μεταξύ αυτών των φάσεων η αύξηση της LH να είναι κατακόρυφη στα αρσενικά (Meiri-Ashkenazi et al., 2021). Οι τιμές κινητικότητας των σπερματοζωαρίων που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν χαμηλότερες σε σχέση με άλλες μελέτες για το ίδιο είδος (Fakriadis and Mylonas, 2021; Fakriadis et al., 2020b; Jerez et al., 2018). Οι υπόλοιπες τιμές των παραμέτρων της ποιότητας του σπέρματος που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, όπως η διάρκεια κινητικότητας, η πυκνότητα και η επιβίωση υπό ψύξη, φάνηκε να ακολουθούν αυτές άλλων μελετών (Fakriadis and Mylonas, 2021; Fakriadis et al., 2020b; Jerez et al., 2018).

Μελλοντικά προτείνεται να γίνει χρήση ανασυνδυασμένων γοναδοτροπινών (rFSH/LH) από την αρχή της αναπαραγωγικής περιόδου, και οι ενέσεις να γίνουν εβδομαδιαία, ώστε να προκαλέσουν την γαμετογένεση στο μαγιάτικο. Παρόμοιες προσπάθειες έγιναν σε άλλα είδη ψαριών με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Chauvigne et al., 2018; Chauvigné et al., 2017).

Διαφοροποιήσεις από ΤΠΕ: Καμία.

Βιβλιογραφία

- Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 212-221.
- 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 Technol.* 51, 71-97.



- Chauvigne, F., Gonzalez, W., Ramos, S., Ducat, C., Duncan, N., Gimenez, I., Cerda, J., 2018. Seasonal- and dose-dependent effects of recombinant gonadotropins on sperm production and quality in the flatfish *Solea senegalensis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 225, 59-64.
- Chauvigné, F., Ollé, J., González, W., Duncan, N., Giménez, I., Cerdà, J., 2017. Toward developing recombinant gonadotropin-based hormone therapies for increasing fertility in the flatfish Senegalese sole. *PLOS ONE* 12, e0174387.
- 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 α injections or implants. *Gen. Comp. Endocrinol.* 279, 78-87.
- Fakriadis, I., Miccoli, A., Karapanagiotis, S., Tsele, N., Mylonas, C.C., 2020a. Optimization of a GnRH α treatment for spawning commercially reared greater amberjack *Seriola dumerili*: Dose response and extent of the reproductive season. *Aquaculture* 521, 735011.
- Fakriadis, I., Mylonas, C.C., 2021. Sperm quality of greater amberjack *Seriola dumerili* throughout the reproductive season and in response to GnRH α treatment with controlled release implants. *Fish Physiol. Biochem.*
- Fakriadis, I., Sigelaki, I., Papadaki, M., Papandroulakis, N., Raftopoulos, A., Tsakoniti, K., Mylonas, C.C., 2020b. 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 α delivery systems. *Fishes* 3, 1-22.
- Karine, R., Patrick, P., Sylvie, D., 2020. Special features of neuroendocrine interactions between stress and reproduction in teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Kobayashi, M., Hayakawa, Y., Park, W., Banba, A., Yoshizaki, G., Kumamaru, K., Kagawa, H., Kaki, H., Nagaya, H., Sohn, Y.C., 2010. Production of recombinant Japanese eel gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 379-386.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., Lareyre, J.J., 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 412-437.
- Meiri-Ashkenazi, I., Bracha, C., Fakriadis, I., Papadaki, M., Corriero, A., Mylonas, C.C., Rosenfeld, H., 2021. Gonadotropin expression, and pituitary and plasma levels in the reproductive cycle of wild and captive-reared greater amberjack (*Seriola dumerili*). *Gen. Comp. Endocrinol.* (in preparation).
- Micale, V., Genovese, L., Greco, S., 1998. Gonadal development in cultured amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Animal Biology* 7, 125-130.
- Micale, V., Maricchiolo, G., Genovese, L., 1997. Hormonal stimulation and induced maturation in *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Biologia Marina Mediterranea* 4, 327-329.
- Munoz-Cueto, J.A., Zmora, N., Paullada-Salmeron, J.A., Marvel, M., Mananos, E., Zohar, Y., 2020. The gonadotropin-releasing hormones: Lessons from fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 291, 113422.
- 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., 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., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516-534.
- Nyuji, M., Kazeto, Y., Izumida, D., Tani, K., Suzuki, H., Hamada, K., Mekuchi, M., Gen, K., Soyano, K., Okuzawa, K., 2016. Greater amberjack Fsh, Lh, and their receptors: Plasma and mRNA profiles during ovarian development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 225, 224-234.
- Parker, C.G., Cheung, E., 2020. Metabolic control of teleost reproduction by leptin and its complements: Current insights from mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Ramos-Júdez, S., Chauvigné, F., González-López, W.Á., Rosenfeld, H., Cerdà, J., Giménez, I., Duncan, N., 2021a. Providing recombinant gonadotropin-based therapies that induce oogenesis from previtellogenic oocytes to produce viable larvae in a teleost, the flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). *Aquaculture*.



- Ramos-Júdez, S., Chauvigné, F., González-López, W.Á., Rosenfeld, H., Cerdà, J., Giménez, I., Duncan, N., 2021b. Providing recombinant gonadotropin-based therapies that induce oogenesis from previtellogenic oocytes to produce viable larvae in a teleost, the flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). *Aquaculture* 536, 736418.
- Rosenfeld, H., Meiri, I., Elizur, A., 2007. Gonadotropin regulation of oocyte development, in: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 171-198.
- Sanchis-Benlloch, P.J., Nocillado, J., Ladisa, C., Aizen, J., Miller, A., Shpilman, M., Levavi-Sivan, B., Ventura, T., Elizur, A., 2017. In-vitro and in-vivo biological activity of recombinant yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) follicle stimulating hormone. *Gen Comp Endocrinol* 241, 41-49.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390-411.
- Trudeau, V.L., Somoza, G.M., 2020. Multimodal hypothalamo-hypophysial communication in the vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- 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.
- Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 438-455.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.
- 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). *J. Anim. Sci.* 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.

