

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΥ ΧΕΛΟΝΙΟΥ (*Chelon labrosus*, Risso 1827)
ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΙΧΜΑΛΩΣΙΑΣ**

**Κοκοκύρης Α. *, Μίνος Γ., Συμεωνίδης Χ, Αλεξάνδρου Μ., Τοσσούνης Γ.
& Καρύδας Θ.**

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (Α.Τ.Ε.Ι.Θ.), Τμήμα
Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιέργειών, Τ.Θ. 157, 63200, Ν. Μουδανιά

Abstract

The aim of this study was to monitor the ovarian development and the sperm quality of the thick lipped grey mullet, *Chelon labrosus*, in captivity. Females and males (n=24, sex ratio 1:1, mean weight 1,1Kg) were sampled for ovarian biopsies and milt on 18th February 2009 (Day 0) and monitored every one week afterwards during a period of 7 weeks. Vitellogenic oocytes increased from 730μm (Day 0) to 925μm (48th day) but they became atretic afterwards. No ovulating female was identified and no spawning was recorded. On Day 0, more than 80% of males were spermiating. Sperm density (mean value: 20,8 x 10⁹ spermatozoa ml⁻¹ sperm) exhibited a decreasing trend during the monitoring period. Sperm motility percentage (mean value: 35±22%) and duration of forward motility (mean value: 1,46±0,2min) did not show any statistically significant difference. Such reproductive dysfunctions are common in fish kept under captive conditions. The development of an appropriate hormonal treatment is necessary to induce spawning and to enhance sperm production and quality.

Λέξεις κλειδιά: χελόνι, ωοτοκία, ποιότητα σπέρματος, εκτροφή κεφαλοειδών

*Κοκοκύρης Λάμπρος (lamprosk@aqu.a.teithe.gr)

1. Εισαγωγή

Το χελόνι (*Chelon labrosus*, μαυράκι, Mugilidae) έχει υψηλή εμπορική αξία, σάρκα εξαιρετικής ποιότητας, υψηλή προσαρμοστικότητα στις συνθήκες εκτροφής και υψηλή δεκτικότητα στη τεχνητή τροφή (Cataudella, et al., 1988, Boglione et al., 1992). Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν το χελόνι υποψήφιο «νέο» είδος της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας. Ο σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνήσει τη δυνατότητα φυσικής ωοτοκίας και να περιγράψει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος του χελονιού, στην προοπτική της ανάπτυξης μια μεθόδου μαζικής παραγωγής αυγών σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Δημιουργήθηκαν δυο πληθυσμοί (Α, Β, n=12 ανά πληθυσμό) με θηλυκά και αρσενικά άτομα ηλικίας 4 ετών, μέσου βάρους 1Kg, σε αναλογία 1:1. Η εγκατάσταση έγινε σε δεξαμενές 3,5m³ υπό συνθήκες φυσικής φωτοπερίόδου, με παροχή επιφανειακού και υπόγειου θαλασσινού νερού θερμοκρασίας από 13 έως 16°C, συγκέντρωσης οξυγόνου 6 ppm και αλατότητας 38psu. Όλοι οι γεννήτορες σημάνθηκαν ατομικά με μαγνητικές μάρκες (PIT tag, AVID,UK). Τα ψάρια ταΐζονταν με το χέρι,

μία φορά ανά ημέρα μέχρι κορεσμού, με μίγμα αλεσμένης βιομηχανικής τροφής (Biomar) και κατεψυγμένων κεφαλόποδων και καρκινοειδών. Στις δεξαμενές τοποθετήθηκαν συλλέκτες αβγών, οι οποίοι ελέγχονταν καθημερινά για την παρουσία αυγών.

Στον πληθυσμό A, πραγματοποιήθηκαν 7 δειγματοληψίες με διαφορά μιας εβδομάδος (H_0 : 18-2-2009, 7, 14, 22, 28, 43, 48, 55 ημέρες μετά την H_0). Ο πληθυσμός B, αφέθηκε ανενόχλητος, ώστε να διαπιστωθούν οι ενδεχόμενες επιδράσεις των επαναλαμβανόμενων δειγματοληψιών στις εξεταζόμενες παραμέτρους. Οι γεννήτορες νήστευαν δύο ημέρες πριν τη δειγματοληψία ενώ πριν από κάθε χειρισμό ναρκώνονταν σταδιακά [(προ-νάρκωση: 0,08 ml 2-phenoxyethanol l^{-1} θαλασσινού νερού και μετά νάρκωση (0,3 ml 2-phenoxyethanol l^{-1})].

Από τα θηλυκά, σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν βιοψία των ωοθηκών με τη βοήθεια ενός αυτοσχέδιου καθετήρα διαμέτρου 1,2 mm, ο οποίος διείσδυε μέσω της γεννητικής οπής. Το δείγμα μεταφέρονταν σε διάλυμα φορμόλης 1% (απιονισμένο νερό) και αποθηκεύονταν στους 4°C μέχρι την εξέταση και τη μέτρηση του μεγέθους των ωοκυττάρων, μετά από 20-24 ώρες. Το μέγεθος των ωοκυττάρων μετρήθηκε σε στερεοσκόπιο, συνδεδεμένο με σύστημα ανάλυσης εικόνας. Σε κάθε ωοκύτταρο, μετρήθηκε η μέγιστη και η ελάχιστη διάμετρος και ακολούθως υπολογίστηκε η μέση διάμετρος (μm). Το μέσο μέγεθος των ωοκυττάρων υπολογίστηκε από τις μετρήσεις της διαμέτρου των 20-30 μεγαλύτερων ωοκυττάρων κάθε θηλυκού.

Η ποιότητα του σπέρματος περιγράφηκε από την κατάσταση σπερμίας, την πυκνότητα του σπέρματος, την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και τη διάρκεια κινητικότητας (min). Μετά από την πλήρη νάρκωση τους, τα αρσενικά ξεπλένονταν στην κοιλιακή περιοχή με θαλασσινό νερό. Ακολούθως, ο γεννητικός πόρος σκουπίζονταν με απορροφητικό χαρτί και στη συνέχεια ασκούσαν ελαφρά πίεση κατά μήκος των όρχεων ώστε να εξωθηθεί το σπέρμα. Οι μαλάξεις γίνονταν αργά και προσεκτικά ώστε να μην αναμιχθεί το σπέρμα με υπολείμματα τροφών, αίμα και ούρα. Αρχικά εκτιμιόταν η κατάσταση σπερμίας και στη συνέχεια λαμβάνονταν δείγμα σπέρματος 50-100 μl με σύριγγα 1ml. Σε όλες τις δειγματοληψίες, η ποιότητα του σπέρματος εκτιμήθηκε από τον ίδιο παρατηρητή. Η κατάσταση σπερμίας εκτιμήθηκε με βαθμολογική κλίμακα, σύμφωνα με την οποία, τα αρσενικά που δεν έδιναν σπέρμα έπαιρναν την τιμή 0, αυτά που έδιναν μόνο μια σταγόνα μετά από αρκετές μαλάξεις την τιμή 1, αυτά που έδιναν εύκολα σπέρμα μετά την πρώτη μάλαξη τη τιμή 2 και τέλος αυτά που έδιναν άφθονη ποσότητα μετά από ελαφρά πίεση, την τιμή 3. Η πυκνότητα του σπέρματος υπολογίστηκε μετά από αραιώση του σπέρματος 2500x (σε πλαστικό σωλήνα 2 ml, ανάδευση, αραιώση όγκου 200 μL σε κωνική φιάλη των 25ml) σε απιονισμένο νερό, καταμετρώντας τον αριθμό των σπερματοζωαρίων σε αιμοκυτόμετρο τύπου *Newbauer* (2 επαναλήψεις). Η κινητικότητα του σπέρματος (% ποσοστό των σπερματοζωαρίων με

εμπρόσθια κινητικότητα) υπολογίστηκε με παρατήρηση σπέρματος όγκου 1μl σε οπτικό μικροσκόπιο (OM, 400x μεγέθυνση) μετά την ενεργοποίηση του με μια σταγόνα φιλτραρισμένου θαλασσινού νερού. Η *διάρκεια της κινητικότητας* (χρόνος που μεσολαβεί για τη μείωση της κινητικότητας στο 10% των παρατηρούμενων σπερματοζωαρίων, min) υπολογίστηκε με παρατήρηση σπέρματος 1μl σε OM (400x μεγέθυνση) μετά από ενεργοποίηση του με μια σταγόνα φιλτραρισμένου θαλασσινού νερού.

3. Αποτελέσματα

3.1. Θηλυκά άτομα

Σε κανένα από τα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε ωορρηξία και σε κανέναν από τους συλλέκτες αυγών δεν παρατηρήθηκαν αυγά. Όπως εκτιμήθηκε από τις βιοψίες των ωοθηκών, η ωρίμανση των ωοκυττάρων προχώρησε κανονικά. Κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0: H₀), τα ωοκύτταρα ήταν στο μέγεθος των 730μm (στάδιο προχωρημένης λεκιθογένεσης) και προοδευτικά αυξήθηκαν μέχρι τα 920μm την 48^η ημέρα (H₄₈). Η εξέταση των ωοκυττάρων έδειξε ότι η αύξηση του μεγέθους τους ήταν το αποτέλεσμα της εναπόθεσης λευκού, αδιαφανούς υλικού. Από την H₅₅ και μετά, το μέγεθος των ωοκυττάρων σταμάτησε να αυξάνεται και η εξέταση των βιοψιών έδειξε ότι η πλειονότητα των ωοκυττάρων μετέπεσαν σε ατρησία. Ειδικότερα, το σχήμα τους έγινε ακανόνιστο, τα κύτταρα του ωοθυλακίου διογκώθηκαν ενώ η τονικότητα των ωοκυττάρων χάθηκε. Τα διαγράμματα κατανομής του μεγέθους των ωοκυττάρων από δύο θηλυκά που εξετάζονταν σε κάθε δειγματοληψία, έδειξαν ότι το μέγεθος των ωοκυττάρων κατανέμονταν από 680-840 μm την 1^η εβδομάδα (H₇, κύρια κατανομή: 740-780μm) και μετατοπίστηκε από τα 720-900μm την 2^η εβδομάδα (H₁₄, κύρια κατανομή: 740-840μm). Την προτελευταία και την τελευταία εβδομάδα, τα περισσότερα ωοκύτταρα κυμαίνονταν από 840 έως 1040 μm (κύρια κατανομή: 860-900μm).

3.2. Αρσενικά άτομα

Κατά την έναρξη του πειράματος (H₀), τα περισσότερα αρσενικά ήταν σε κατάσταση πλήρους σπερμίας (80%, στάδιο σπερμίας 3: άφθονο σπέρμα) όπου και παρέμειναν μέχρι το τέλος του πειράματος (H₅₅). Η γραμμική παλινδρόμηση έδειξε μια ισχυρή σχέση εξάρτησης ανάμεσα στην πυκνότητα του σπέρματος και στο χρόνο ($R^2=0,469$, $p=0.001$) ενώ το διάγραμμα έδειξε ότι η πυκνότητα του σπέρματος μειώθηκε κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης. Η μέση ολική πυκνότητα ήταν $20,8 \times 10^9$ σπερματοζωάρια (spz) ανά ml σπέρματος. Η μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε την H₀ ($31,6 \times 10^9$ spz ml⁻¹) ενώ η ελάχιστη την H₄₈ ($9,1 \times 10^9$ spz ml⁻¹). Η κινητικότητα του σπέρματος ήταν γενικά χαμηλή. Η μέση ολική κινητικότητα ήταν μόλις $36,3 \pm 22\%$ και δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των δειγματοληψιών ($p>0,05$). Η μέγιστη κινητικότητα παρατηρήθηκε την H₇ (42%) ενώ η ελάχιστη την H₂₈ (18%). Η διάρκεια της κινητικότητας δεν μεταβλήθηκε

σημαντικά μεταξύ των δειγματοληψιών. Η μέση ολική τιμή ήταν 1,46min και κυμάνθηκε μεταξύ 1,81min (D₇) και 1,27min (D₂₁).

4. Συζήτηση

Τα θηλυκά δεν ωοτοκούν αυθόρμητα παρόλο που ωριμάζουν φυσιολογικά σε συνθήκες αιχμαλωσίας, επειδή τα λεκιθικά ωοκύτταρα δεν εισέρχονται (για άγνωστους λόγους) στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης. Μέχρι σήμερα, η χορήγηση προγεστερόνης και ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης (HCG) είχαν μόνο μερική επιτυχία στην πρόκληση της ωοτοκίας του χελονιού (μικρός αριθμός αποκρινόμενων θηλυκών, μικρή παραγωγή αυγών, απρόβλεπτο ποσοστό επιτυχίας, Boglione et al. 1992). Αντίθετα, οι εκλυτικοί παράγοντες των γοναδοτροπινών (GnRHs) έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί στην πρόκληση της ωοτοκίας πολλών ειδών ψαριών (δες ανασκόπηση Mylonas et al. 2009). Ειδικότερα, η χορήγηση GnRHα σε συνδυασμό με την ντομπεριδόνη (αναστολέας της ντοπαμίνης) προκάλεσε αποτελεσματικά την μαζική παραγωγή αυγών, στην περίπτωση του κοινού κέφαλου (Aizen et al. 2005). Η πυκνότητα του σπέρματος ακολουθεί πτωτική πορεία κατά τη διάρκεια της περιόδου σπερμίας. Όμως δεν γνωρίζουμε εάν αυτό οφείλεται στην αυξανόμενη παραγωγή σπερματικού υγρού, το οποίο αραιώνει περισσότερο τα σπερματοζώαρια ή στην μείωση της παραγωγής σπερματοζωαρίων καθώς ολοκληρώνεται η περίοδος σπερμίας. Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ήταν της τάξης του $35 \pm 22\%$ ενώ η διάρκεια της ήταν της τάξης του $1,49 \pm 0,29$ min. Σε αντίθεση με την πυκνότητα, η κινητικότητα του σπέρματος και η διάρκεια της παραμένουν σταθερές κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων όπως υπολογίστηκε είναι αρκετά χαμηλή και αυτό γιατί επιλέξαμε μικρή αραιώση του σπέρματος (ενός σταδίου), αντί μιας μεγάλης αραιώσης δύο σταδίων, η οποία έχει αποδειχθεί πιο κατάλληλη σε είδη με σπέρμα μεγάλου ιξώδους. Θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί η δυνατότητα βελτίωσης της κινητικότητας του σπέρματος χορηγώντας GnRH, ο οποίος έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός σε αρσενικούς γεννήτορες πολλών ειδών ψαριών.

5. Βιβλιογραφία

- Aizen J., Meiria I., Tzchoria I., Levavi-Sivan B., Rosenfeld H. (2005) Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 212–221
- Boglione C., Bertolini B., Russilelo M., Cataudella S. (1992) Embryonic and larval development of the thick-lipped mullet (*Chelon labrosus*) under controlled reproduction conditions. *Aquaculture*, 101: 346-359
- Cataudella S., Massa F., Rampacci M., Crosetti D. (1988) Artificial reproduction and larval rearing of the thick lipped mullet (*Chelon labrosus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 4: 130-139
- Mylonas C.C., Fostier A., Zanuy S. (2009) Broodstock management and hormonal manipulations of reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534