



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

## ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Παράρτημα Νέων Μουδανιών

**Διερεύνηση της δυνατότητας αναπαραγωγής του χελονιού,  
*Chelon labrosus* (Risso 1827), σε συνθήκες αιχμαλωσίας**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Λολάκη Δέσποινα**

*Νέα Μουδανιά*

Νοέμβριος 2009

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

Παράρτημα Νέων Μουδανιών

**Διερεύνηση της δυνατότητας αναπαραγωγής του  
χελονιού, *Chelon labrosus* (Risso 1827), σε συνθήκες  
αιχμαλωσίας**

Πτυχιακή εργασία: **Λολάκη Δέσποινα**

Επίβλεψη: **Δρ. Λάμπρος Κοκοκύρης**

Νέα Μουδανιά  
Νοέμβριος  
2009

*Στην οικογένεια μου  
και σε αυτούς που στάθηκαν δίπλα μου*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. Εισαγωγή</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Αναπαραγωγικός κύκλος στα ψάρια</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοκυττάρων (Ωογένεση)</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Ανάπτυξη και ωρίμανση των σπερματοζωαρίων (Σπερματογένεση)</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Στοιχεία βιολογίας του χελονιού</b>	<b>4</b>
<b>1.5. Η επιλογή του μελετούμενου είδους: Χελόνη και εκτροφή</b>	<b>5</b>
<b>1.6. Σκοπός της εργασίας</b>	<b>5</b>
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Αλιεία και εγκατάσταση των πληθυσμών</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Δειγματοληψίες</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Έλεγχος της ωοτοκίας</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Δειγματοληψία ωοθηκών (βιοψία)</b>	
2.4.1. Μέγεθος ωοκυττάρων (διάμετρος, $\mu\text{m}$ )	<b>8</b>
<b>2.5. Ποιότητα του σπέρματος – Χαρακτηριστικά του σπέρματος</b>	<b>8</b>
2.5.1. Δειγματοληψία σπέρματος	<b>9</b>
2.5.2. Κατάσταση σπερμίας	<b>9</b>
2.5.3. Πυκνότητα του σπέρματος	<b>9</b>
2.5.4. Κινητικότητα του σπέρματος	<b>10</b>
2.5.5. Διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος	<b>10</b>
<b>3. Αποτελέσματα</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Θηλυκά άτομα</b>	<b>11</b>
3.1.1. Ωοτοκία	<b>11</b>
3.1.2. Ωρίμανση ωοκυττάρων	<b>11</b>
<b>3.2. Άρσενικά άτομα</b>	<b>14</b>
3.2.1. Κατάσταση σπερμίας	<b>14</b>
3.2.2. Πυκνότητα σπέρματος	<b>14</b>
3.2.3. Κινητικότητα σπερματοζωαρίων	<b>15</b>
3.2.4. Διάρκεια κινητικότητας σπερματοζωαρίων	<b>16</b>

<b>4. Συζήτηση</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Θηλυκά άτομα</b>	<b>18</b>
4.1.1. Ανάπτυξη ωοκυττάρων-τύπος ωοτοκίας	<b>18</b>
4.1.2. Η ανάγκη για τεχνητή πρόκληση της ωοτοκίας με χορήγηση ορμονών	<b>18</b>
4.1.3. Επιλογή της μεθόδου χορήγησης: ένεση ή συστήματα βραδείας Απελευθέρωσης	<b>20</b>
4.1.4. Χορήγηση GnRHα και ανταγωνιστών ντοπαμίνης (DA)	<b>21</b>
<b>4.2. Αρσενικά άτομα</b>	<b>21</b>
4.2.1. Σπερμίαση	<b>21</b>
4.2.2. Πυκνότητα σπέρματος	<b>22</b>
4.2.3. Κινητικότητα σπέρματος	<b>23</b>
4.2.4. Διάρκεια κινητικότητας	<b>25</b>
<b>5. Συμπεράσματα</b>	<b>26</b>
<b>6. Βιβλιογραφία</b>	<b>28</b>
<b>7. Περίληψη</b>	<b>34</b>
<b>8. Abstract</b>	<b>35</b>

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η συγκεκριμένη εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Α.Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη του Δρ. Λάμπρου Κοκοκύρη, Καθηγητή Εφαρμογών του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, Δρ. Λάμπρο Κοκοκύρη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα, για την στήριξη και την καθοδήγηση του στη συγγραφή της πτυχιακής και τέλος για την υπομονή του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υπομονή τους και την βοήθεια που μου προσέφεραν όλον αυτό τον καιρό.

*Στην οικογένεια μου  
και σε αυτούς που στάθηκαν δίπλα μου*

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Αναπαραγωγικός κύκλος στα ψάρια

Η διαδικασία της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των γαμετών καλείται γαμετογένεση και οδηγεί στο σχηματισμό ώριμων θηλυκών (ωογένεση) ή αρσενικών γεννητικών κυττάρων (σπερματογένεση) (Cabrita, et al., 2009). Η γαμετογένεση περιλαμβάνει δύο φάσεις, (1) τη φάση αύξησης και ανάπτυξης και (2) τη φάση ωρίμανσης των γεννητικών προϊόντων (ωάριο, σπερματοζωάριο).

Η γεννητική ωρίμανση κορυφώνεται με την απόθεση των γεννητικών προϊόντων (ωοτοκία, εκσπερμάτιση) και τη γονιμοποίηση των αβγών. Ως προς τον τύπο ωοτοκίας, τα ψάρια χωρίζονται σε πολλαπλούς και ολικούς ή απλούς αποθέτες. Οι πολλαπλοί αποθέτες απελευθερώνουν τμηματικά τα ωοκύτταρά τους και έχουν συνήθως εκτεταμένη αναπαραγωγική περίοδο, ενώ οι ωοθήκες τους περιέχουν ομάδες ωοκυττάρων διαφόρων μεγεθών σε διαδοχικά στάδια ανάπτυξης, με μια συνεχή κατανομή μεγέθους. Οι ολικοί αποθέτες απελευθερώνουν τα ωοκύτταρά τους σύγχρονα, μια φορά και συνήθως παρουσιάζουν στενή και χρονικά οριοθετημένη αναπαραγωγική περίοδο (Τσίκληρας 2004).

Στην εύκρατη ζώνη, ο αναπαραγωγικός κύκλος των ψαριών στο φυσικό περιβάλλον είναι ετήσιος. Η αναπαραγωγική δραστηριότητα παρουσιάζει μια εποχιακότητα ώστε η αναπαραγωγή να παρατηρείται την ίδια χρονική περίοδο και τα επιμέρους στάδια της γαμετογένεσης να εμφανίζουν παρόμοια χρονολογική τοποθέτηση από χρόνο σε χρόνο. Η διαθεσιμότητα της τροφής και η δυνατότητα αποθήκευσης της ενέργειας επηρεάζουν καθοριστικά το χρονισμό της αναπαραγωγικής περιόδου. Η διαθεσιμότητα της τροφής επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των απογόνων και γι' αυτό η αναπαραγωγική περίοδος των ψαριών πραγματοποιείται σε περιόδους υψηλής διαθεσιμότητας τροφής (Cabrita, et al., 2009).

Η αναγνώριση της εποχής και η έναρξη της γεννητικής ωρίμανσης για την αναπαραγωγή ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων. Οι εποχιακές μεταβολές των αβιοτικών παραμέτρων, (π.χ. της θερμοκρασίας, της φωτοπεριόδου) αλλά και εσωτερικοί παράγοντες (π.χ. αλλαγές στο νευροενδοκρινές σύστημα, ανάπτυξη των γονάδων) επηρεάζουν την παραγωγή



των αναπαραγωγικών ορμονών οι οποίες με τη σειρά τους καθορίζουν το πότε θα γίνει η αναπαραγωγή αλλά και όλα τα γεγονότα του αναπαραγωγικού κύκλου που συνδέονται με αυτήν.

Η αναπαραγωγική στρατηγική που ακολουθεί κάθε είδος, περιγράφεται από μια σειρά χαρακτηριστικών όπως η αναλογία φύλου, το μέγεθος και η ηλικία της πρώτης γεννητικής ωρίμανσης, η εποχή αναπαραγωγής, η γονιμότητα, η αναπαραγωγική συμπεριφορά και η απόθεση των γαμετών (Τσικλήρας 2004).

## **1.2. Ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοκυττάρων (Ωογένεση)**

Οι ωοθήκες είναι δυο επιμήκη σακοειδούς μορφής όργανα, τοποθετημένα συνήθως στη ραχιαία επιφάνεια της σπλαχνικής κοιλότητας. Αποτελούνται από συνδετικό ιστό πάνω στον οποίο αναπτύσσονται τα ωοκύτταρα (Μίνος 2004). Η ωογένεση αρχίζει με μιτωτικές διαιρέσεις για τον πολλαπλασιασμό των ωογονίων και ολοκληρώνεται με μειωτικές διαιρέσεις, κατάληξη των οποίων είναι η δημιουργία θηλυκών γαμετών (ώριμα ωοκύτταρα ή ώαρια ή αυγά) με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Κατά την ωογένεση, τα ωοκύτταρα περνούν από μια αρχική φάση αύξησης του μεγέθους (προ-λεκιθογένεση) και ακολούθως από μια δεύτερη φάση αύξησης (λεκιθογένεση) κατά την οποία συντίθεται και ενσωματώνεται το λεκιθικό υλικό του αυγού, το οποίο έχει ως κύριο συστατικό την φωσφολιποπρωτεΐνη, λεκιθογενίνη (Vg). Κατά τη διάρκεια της λεκιθογένεσης, εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα, η φλοιώδης μοίρα (άσπροι κύκλοι), λιπιδιακά κυστίδια (ανοικτό γκρι κύκλοι) και λεκιθικά κοκκία (σκοτεινοί γκριζοί κύκλοι). Επιπλέον, αναπτύσσεται το χόριο (*zona radiata*) και το ωοθυλάκιο γίνεται όλο και περισσότερο παχύ. Στο τέλος της λεκιθογένεσης, το κυτταρόπλασμα καταλαμβάνεται πλήρως από λιπιδιακά και λεκιθικά κυστίδια. Στα πρώτα στάδια της τελικής ωρίμανσης, τα κυστίδια αρχίζουν να συγχωνεύονται σχηματίζοντας μεγαλύτερα κυστίδια ενώ ο πυρήνας μεταναστεύει προς στο ζωικό πόλο (Cabrita et al., 2009). Κατά την τελική ωρίμανση, τα λεκιθικά κυστίδια αδειάζουν το περιεχόμενό τους στο ωόπλασμα, η λέκιθος ομογενοποιείται, η πυρηνική μεβράνη διαλύεται, το ωοκύτταρο ενυδατώνεται, αποκολλάται από το ωοθυλάκιο, πέφτει στην κοιλότητα της ωοθήκης και καταλήγει στους ωαγωγούς, διαμέσου των οποίων απελευθερώνεται στο νερό, με την πράξη της ωοτοκίας (Κοκοκύρης 2003, Cabrita et al., 2009). Η ωοτοκία μπορεί να αφορά ένα μέρος ή και το σύνολο των ώριμων ωοκυττάρων. Ο αριθμός των ωοκυττάρων που θα απελευθερωθούν (γονιμότητα) διαφέρει ανάλογα με το είδος και το μέγεθος των γεννητόρων.

### **1.3. Ανάπτυξη και ωρίμανση των σπερματοζωαρίων (Σπερματογένεση)**

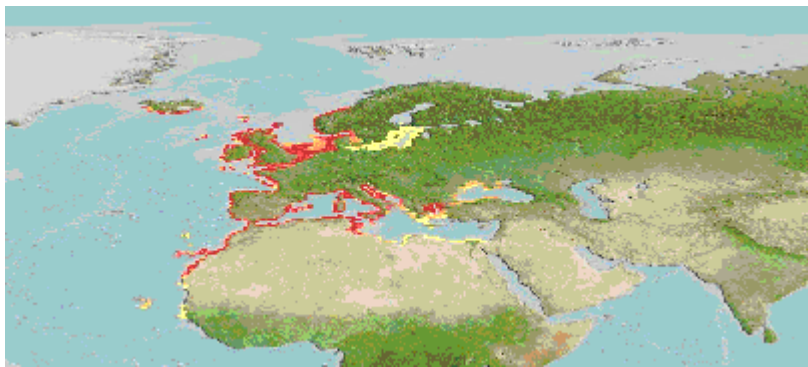
Οι όρχεις είναι ένα ζεύγος λοβοειδών οργάνων τοποθετημένων στη ραχιαία επιφάνεια της σπλαχνικής κοιλότητας (Μίνος 2004). Η σπερματογένεση (ωρίμανση των αρσενικών γεννητικών κυττάρων και δημιουργία σπερματοζωαρίων) αρχίζει με μιτωτική διαίρεση (μίτωση) για τον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων, και συνεχίζεται με μειωτική διαίρεση (μείωση) για τη δημιουργία των σπερματοκυττάρων (Α και Β) και το σχηματισμό ακολούθως των σπερματίδων. Οι σπερματίδες διαφοροποιούνται σε σπερματοζωάρια (σπερμιογένεση) μετά από μια δραστική μείωση του μεγέθους (>80%) τους αλλά και το σχηματισμό μαστίγιου. Τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται από τις σπερματικές κύστες στο σπερματικό αυλό των όρχεων μετά από την αραίωση τους στο σπερματικό υγρό (σπερματοζωάρια + σπερματικό υγρό = σπέρμα) και εφόσον ολοκληρωθεί η ωρίμανση τους (σπερμίαση), μετακινούνται στους σπερματαγωγούς και απελευθερώνονται στο νερό με τη διαδικασία της εκσπερμάτωσης (Cabrita et al., 2009).

Ο όρος «ποιότητα του σπέρματος» περιγράφει κατά κάποιο τρόπο την ικανότητα των σπερματοζωαρίων να γονιμοποιήσουν το ωάριο όταν έρχονται σε επαφή με αυτό, στο κατάλληλο περιβάλλον. Σημαντικές παράμετροι για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας των σπερματοζωαρίων είναι: (1) η δυνατότητα τους να φθάσουν στο αυγό, (2) η ικανότητα τους να διαπεράσουν την μικροπύλη (3) η ικανότητα τους να συγχωνεύσουν την πλασματική μεμβράνη τους με αυτή του ωαρίου, (4) η ικανότητα τους να ενεργοποιήσουν τη μεταβολική οδό στο αυγό και τέλος, (5) η συνεισφορά ενός αβλαβούς γονιδιώματος τους, για τη δημιουργία του μελλοντικού εμβρύου. Η ανάλυση της ποιότητας του σπέρματος επιτρέπει τον προσδιορισμό και την επιλογή των γεννητόρων με την καλύτερη ποιότητα σπέρματος και άρα με την μεγαλύτερη αναπαραγωγική επιτυχία. Συνεπώς, η καλή αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για την εμπορική εκτροφή των ψαριών (Cabrita, et al., 2009)..

#### 1.4. Στοιχεία βιολογίας του χελονιού

Το *Chelon labrosus* (Risso, 1827, βελάνισσα ή χελονάκι ή λαύκινος) ανήκει στην οικογένεια των Κεφαλοειδών (Mugilidae, grey mullets<sup>1</sup>). Το άνω χείλος είναι παχύ και έχει μια χαραγή ακριβώς στη μέση. Τα ενήλικα άτομα έχουν μία ή περισσότερες σειρές θηλών πάνω στα χείλη τους (Μίνος 2004).

Η γεωγραφική εξάπλωση του φαίνεται στην Εικόνα 1. Συναντάται στη Μεσόγειο, στη νοτιοδυτική Μαύρη θάλασσα, στον Ατλαντικό Ωκεανό (από Σκανδιναβία και Ισλανδία μέχρι τη Σενεγάλη και στη Νότια Αφρική).



**Εικόνα 1.** Γεωγραφική εξάπλωση του *Chelon labrosus*.  
<http://www.aquamaps.org/receive.php#>)

Είναι ευρύαλο είδος και απαντά σε μεγάλη αφθονία στις εκβολές των ποταμών και στις λιμνοθάλασσες. Τα θηλυκά ωριμάζουν στα 355mm (μεσογειακός πληθυσμός) ή στα 380mm (δυτικοευρωπαϊκός πληθυσμός, Μεγάλη Βρετανία). Όσον αφορά τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, η αναπαραγωγική περίοδος διαρκεί από τις αρχές Ιανουαρίου έως τα τέλη Απριλίου. Το χελόνι μετακινείται στην ανοιχτή θάλασσα για να αναπαραχθεί. Είναι ωοτόκο και η γονιμοποίηση των αβγών του είναι εξωτερική. Ο γόνος επιστρέφει στα υφάλμυρα νερά, στις εκβολές ποταμών και στις λιμνοθάλασσες, όπου η τροφή είναι άφθονη (Czerniejewski et al., 2008).

Τρέφεται κυρίως με φύκη, οργανικές ουσίες που υπάρχουν στη λάσπη και ζωοπλαγκτό όπως κωπήποδα και αμφίποδα (Czerniejewski et al., 2008). Μένει κοντά στον βυθό σχηματίζοντας κοπάδι. Το μέγιστο αναφερόμενο μήκος του είναι τα 60cm και το βάρος του φθάνει τα 2,5χγρμ (Μίνος 2004).

<sup>1</sup> Στις ακτές της Ελλάδας απαντώνται 8 είδη (Μίνος 2008).

Η περίοδος ωοτοκίας του *Chelon labrosus* έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Από τις έρευνες που έγιναν σε διάφορες περιοχές αλλά και σε διαφορετικές χρονολογίες η περίοδος ωοτοκίας κυμαίνεται από Νοέμβριο έως Ιούνιο. Οι περισσότερες όμως έρευνες δείχνουν ότι η περίοδος ωοτοκίας κυμαίνεται από αρχές Ιανουαρίου έως τέλη Απριλίου. Πιο συγκεκριμένα ο Hickling το 1970 παρατήρησε ότι η αναπαραγωγική περίοδος του *Chelon labrosus* στην Βρετανία είναι από τον Ιανουάριο έως τέλος Απριλίου, οι Brusle & Brusle το 1976 στην Τυνησία παρατήρησαν ότι ξεκινάει από το Δεκέμβριο μέχρι τα μέσα Φεβρουαρίου, ο Brunelli το 1916 στην Ιταλία παρατήρησε ότι ξεκινάει από τον Μάιο έως αρχές Ιουνίου. Η μεταβλητότητα των στοιχείων μπορεί να εξηγηθεί από τις δειγματοληψίες που έγιναν σε διαφορετικές περιοχές και έτη, και με διάφορες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για να καθορίσουν την περίοδο ωοτοκίας (Cataudella, et al., 1988)

#### **1.5. Η επιλογή του μελετούμενου είδους:** Χελόνι και εκτροφή

Το χελόνι είναι ένα εμπορικό κεφαλοειδές, με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον για την ελληνική και την ευρύτερη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Το είδος αυτό (1) είναι αυτόχθονο της Μεσογείου (2) διαθέτει εξαιρετική ποιότητα σάρκας και μεγαλύτερη οικονομική αξία από άλλα κεφαλοειδή (Boglione et al., 1992), (3) χαρακτηρίζεται από υψηλή προσαρμοστικότητα σε συνθήκες εκτροφής και μάλιστα σε μέσες προς υψηλές τιμές αλατότητας (Cataudella, et al., 1988) και τέλος (4) οι νύμφες του επιδεικνύουν υψηλή δεκτικότητα στη τεχνητή τροφή (Nash & Shehadeh 1980). Αυτά τα χαρακτηριστικά προσδίδουν στο χελόνι υψηλή ανταγωνιστικότητα και καθιστούν την εκτροφή του οικονομικά βιώσιμη. Αναμφίβολα το χελόνι θα μπορούσε να εκτραφεί εκτατικά, συμβάλλοντας στην αξιοποίηση των πολλών και εκτεταμένων παράκτιων υδροστασιών της χώρας αλλά και της Μεσογείου γενικότερα. Όμως, η εκτροφή δεν μπορεί να αναπτυχθεί εάν δεν έχει αναπτυχθεί προηγουμένως μια αποτελεσματική μεθοδολογία για τον έλεγχο της αναπαραγωγής του και τη μαζική παραγωγή αυγών και ιχθυδίων σε συνθήκες εκτροφής.

#### **1.6. Σκοπός της εργασίας**

Παρά τα πλεονεκτήματα του χελονιού και παρά τα ενθαρρυντικά ερευνητικά αποτελέσματα της παραγωγής ιχθυδίων χελονιού από συστήματα ημιεντατικής εκτροφής (Cataudella et al., 1988a, b, Ben Khemis et al., 2006, Zouiten et al., 2008), δεν υπάρχει μέχρι σήμερα μαζική παραγωγή αυγών και ιχθυδίων σε

συνθήκες αιχμαλωσίας και αυτό γιατί σ' αυτές τις συνθήκες δεν έχει αναφερθεί φυσική ωοτοκία του είδους και δεν έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα ελέγχου της ωοτοκίας του. Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετήσει την εξέλιξη της ωρίμανσης των θηλυκών γεννητόρων, να διερευνήσει τη δυνατότητα φυσικής ωοτοκίας και να περιγράψει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος του χελονιού σε συνθήκες αιχμαλωσίας

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1. Αλιεία και εγκατάσταση των πληθυσμών

Έγινε αλιεία ενός φυσικού πληθυσμού από τα τεχνητά και τα φυσικά κανάλια θαλασσινού νερού στην περιοχή του Βαρικού (Νομός Πιερίας, Κεντρική Μακεδονία) τον Φεβρουάριο του 2008. Ο πληθυσμός μεταφέρθηκε και εγκαταστάθηκε σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Δημιουργήθηκαν δυο πειραματικοί πληθυσμοί (Α, Β) με θηλυκά και αρσενικά άτομα ηλικίας 4 ετών, μέσου βάρους 1Kg, σε αναλογία 1:1 (n=12 ανά πληθυσμό). Η εγκατάσταση έγινε σε δεξαμενές της μονάδος *Olympus fish farm* (3,5m<sup>3</sup>) υπό συνθήκες φυσικής φωτοπεριόδου. Στις δεξαμενές παρέχονταν ένας συνδυασμός επιφανειακού και υπόγειου θαλασσινού νερού θερμοκρασίας από 13 έως 16°C, μέσης συγκέντρωσης οξυγόνου 6 ppm και αλατότητας 32 έως 38psu. Τα ψάρια ταιΐζονταν καθημερινά με το χέρι μέχρι κορεσμού (μία φορά ανά ημέρα) με ένα μίγμα αλεσμένης βιομηχανικής τροφής (BIOMAR) και αλεσμένων κατεψυγμένων κεφαλόποδων και καρκινοειδών. Όλα τα άτομα σημάνθηκαν ατομικά με μαγνητικές μάρκες (PIT tag, AVID,UK).

### 2.2. Δειγματοληψίες

Στον πληθυσμό της Δεξαμενής Α, πραγματοποιήθηκαν 7 δειγματοληψίες με διαφορά μιας εβδομάδος σύμφωνα με τον Πίνακα 2.1. Τα άτομα της Δεξαμενής Β αφέθηκαν ανενόχλητα, χωρίς την καταπόνηση που ενδεχομένως επέβαλλαν οι συχνές δειγματοληψίες.

**Πίνακας 2.1.** Ημερομηνίες των δειγματοληψιών. Ημέρες από την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0, D<sub>0</sub>).

α/α	Ημερομηνία	Ημέρα
1	18/2/2009	D <sub>0</sub>
2	25/2/2009	D <sub>7</sub>
3	4/3/2009	D <sub>14</sub>
4	12/3/2009	D <sub>22</sub>
5	18/3/2009	D <sub>28</sub>
6	2/4/2009	D <sub>43</sub>
7	7/4/2009	D <sub>48</sub>
8	14/4/2009	D <sub>55</sub>

Τα ψάρια νήστευαν για δύο ημέρες πριν από τις προγραμματισμένες δειγματοληψίες. Σε κάθε δειγματοληψία, ψάρια προ-ναρκώνονταν μέσα στην δεξαμενή (0,08 ml 2-phenoxyethanol l<sup>-1</sup> θαλασσινού νερού) και ναρκώνονταν πλήρως (0,3 ml 2-phenoxyethanol l<sup>-1</sup> θαλασσινού νερού) μετά τη σύλληψη τους με απόχες από άκομπα δίχτυα.

### **2.3. Έλεγχος της ωτοκίας**

Και στις δύο δεξαμενές τοποθετήθηκαν συλλέκτες αβγών, οι οποίοι μάλιστα ελέγχονταν καθημερινά για την παρουσία αυγών.

### **2.4. Δειγματοληψία ωοθηκών (βιοψία)**

Σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν δείγμα από τις ωοθήκες (βιοψία) των θηλυκών, με τη βοήθεια ενός αυτοσχέδιου καθετήρα διαμέτρου 1,2mm, ο οποίος εισέρχονταν στην ωοθήκη διαμέσου της γεννητικής οπής. Το δείγμα μεταφέρονταν σε διάλυμα φορμόλης 1% (απιονισμένο νερό) και αποθηκεύονταν στους 4°C, μέχρι την εξέταση του στο στερεοσκόπιο και τη μέτρηση του μεγέθους των ωοκυττάρων που περιέχει. Η εξέταση του δείγματος γίνονταν σε 20 έως 24 ώρες από τη λήψη του.

#### **2.4.1. Μέγεθος ωοκυττάρων (διάμετρος, μm)**

Το μέγεθος των ωοκυττάρων μετρήθηκε σε στερεοσκόπιο Olympus SZX12, συνδεδεμένο με σύστημα ανάλυσης εικόνας, Image Analysis. Σε κάθε ωοκύτταρο μετρήθηκε η μέγιστη και η ελάχιστη διάμετρος και ακολούθως υπολογίστηκε η μέση διάμετρος (μm) του ωοκυττάρου. Το μέσο μέγεθος των ωοκυττάρων κάθε θηλυκού υπολογίστηκε από τις μετρήσεις των 20 έως 30 μεγαλύτερων ωοκυττάρων κάθε δείγματος.

### **2.5. Ποιότητα του σπέρματος – Χαρακτηριστικά του σπέρματος**

Η ποιότητα του σπέρματος περιγράφηκε από τον υπολογισμό τεσσάρων παραμέτρων, σε όλα τα αρσενικά του πληθυσμού A, σε εβδομαδιαία βάση για μια χρονική περίοδο 55 ημερών. Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν: (1) κατάσταση σπερμίας, (2) πυκνότητα σπέρματος (αριθμός σπερματοζωαρίων ανά

ml σπέρματος), (3) κινητικότητα σπερματοζωαρίων (% ποσοστό κινούμενων σπερματοζωαρίων με εμπρόσθια κινητικότητα) και (4) διάρκεια κινητικότητας. Τα αρσενικά του πληθυσμού Β παρέμειναν ανέπαφα όπως ακριβώς και τα θηλυκά του ίδιου πληθυσμού.

#### 2.5.1. Δειγματοληψία σπέρματος

Μετά από την πλήρη νάρκωση τους, τα αρσενικά ξεπλένονταν στην κοιλιακή περιοχή με θαλασσινό νερό, για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του αναισθητικού και να αποφευχθεί οποιαδήποτε επαφή του αναισθητικού με το σπέρμα. Ακολούθως ο γεννητικός πόρος, σκουπίζονταν με στεγνό απορροφητικό χαρτί και στη συνέχεια ασκούνταν μια ελαφρά πίεση κατά μήκος των όρχεων (μάλαξη) ώστε να εξωθηθεί το σπέρμα. Οι μαλάξεις γίνονταν αργά και προσεκτικά ώστε να μην αναμιχθεί το σπέρμα με υπολείμματα τροφών, το αίμα και τα ούρα που εξέρχονταν της ουροδόχου κύστεως. Αρχικά εκτιμήθηκε η κατάσταση σπερμίας και στη συνέχεια παίρναμε δείγμα σπέρματος όγκου 50 έως 100μl με σύριγγα 1ml.

Σε όλες τις δειγματοληψίες, η ποιότητα του σπέρματος εκτιμήθηκε από τον ίδιο παρατηρητή, ώστε να αποφευχθούν τα αντίστοιχα σφάλματα.

#### 2.5.2. Κατάσταση σπερμίας

Η κατάσταση σπερμίας εκτιμήθηκε με βάση μια βαθμολογική κλίμακα, σύμφωνα με την οποία τα αρσενικά που δεν έδιναν σπέρμα βαθμολογήθηκαν με την τιμή 0, αυτά που έδιναν μόνο μια σταγόνα μετά από αρκετές μαλάξεις με την τιμή 1, αυτά που έδιναν εύκολα σπέρμα μετά την πρώτη μάλαξη με την τιμή 2 και τέλος αυτά που έδιναν άφθονη ποσότητα σπέρματος μετά από μια ελαφρά πίεση με την τιμή 3.

#### 2.5.3. Πυκνότητα του σπέρματος

Η πυκνότητα υπολογίστηκε μετά από αραιώση του σπέρματος 2500x (σε πλαστικό σωλήνα 2 ml, ανάδευση, αραιώση όγκου 200μL σε κωνική φιάλη των 25ml) σε απιονισμένο νερό (Fauvel et al., 1999) και καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων σε αιμοκυτόμετρο. Για τη καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκαν αιμοκυτόμετρα Neubauer (Improved Haemocytometer FEIN – OPTIK, Germany), αφού έγινε ακινητοποίηση με φορμόλη.



#### 2.5.4. Κινητικότητα του σπέρματος

Η κινητικότητα του σπέρματος (ποσοστό των σπερματοζωαρίων με εμπρόσθια κινητικότητα, *forward motility*, %) υπολογίστηκε με παρατήρηση σπέρματος όγκου 1μl σε οπτικό μικροσκόπιο (αντικειμενοφόρο πλάκα, 400x μεγέθυνση) μετά την ενεργοποίηση του με μια σταγόνα φιλτραρισμένου θαλασσινού νερού.

#### 2.5.5. Διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος

Η διάρκεια της κινητικότητας (πόσος χρόνος πρέπει να περάσει ώστε η εμπρόσθια κινητικότητα να μειωθεί στο 10% των παρατηρούμενων σπερματοζωαρίων, *motility duration*, min) υπολογίστηκε με παρατήρηση σπέρματος όγκου 1μl σε οπτικό μικροσκόπιο (αντικειμενοφόρο πλάκα, 400x μεγέθυνση) μετά την ενεργοποίηση του με μια σταγόνα φιλτραρισμένου θαλασσινού νερού.



### **3. Αποτελέσματα**

#### **3.1. Θηλυκά άτομα**

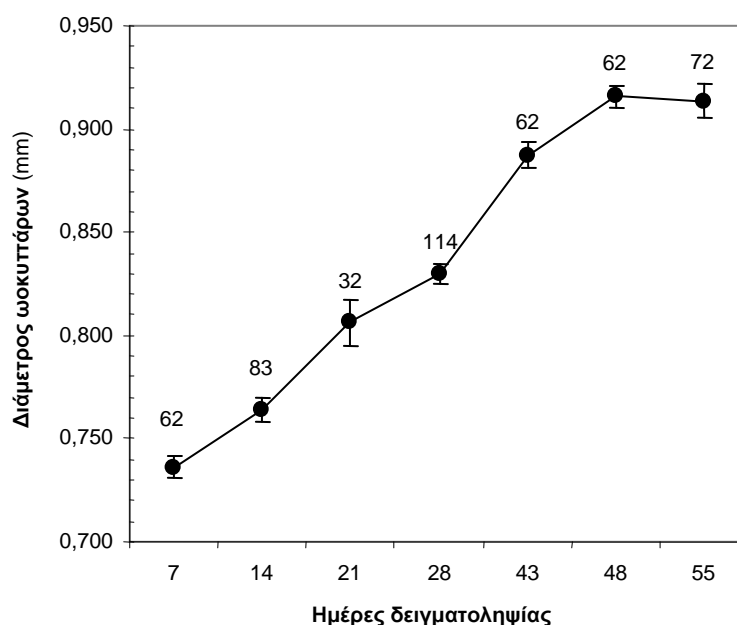
##### **3.1.1. Ωοτοκία**

Σε κανέναν από τους δύο συλλέκτες (Δεξαμενές A & B) δεν παρατηρήθηκαν αβγά. Η διαπίστωση αυτή μας ωθεί στο συμπέρασμα, ότι δεν υπήρξε ωοτοκία των θηλυκών μέχρι και την 55<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη του πειράματος.

##### **3.1.2. Ωρίμανση ωοκυττάρων**

Όπως φάνηκε από τα δείγματα των ωοθηκών (βιοψίες) η ωρίμανση των ωοκυττάρων προχώρησε κανονικά. Σύμφωνα με το διάγραμμα μεταβολής της μέσης διαμέτρου των ωοκυττάρων (Εικόνα 3.1.), κατά την έναρξη του πειράματος (Ημέρα 0), τα ωοκύτταρα ήταν στο μέγεθος των 730μm (στάδιο προχωρημένης λεκιθογένεσης) και προοδευτικά αυξήθηκαν μέχρι το μέγεθος των 920μm την 48<sup>η</sup> ημέρα. Η εξέταση των ωοκυττάρων στο στερεοσκόπιο έδειξε ότι η αύξηση του μεγέθους ήταν το αποτέλεσμα της εναπόθεσης, λευκού, αδιαφανούς υλικού (λεκιθικό υλικό) στο ωόπλασμα. Από την 55<sup>η</sup> ημέρα και μετά το μέγεθος σταμάτησε να αυξάνεται. Η μεταβολή του μεγέθους ήταν σταδιακή και εκδηλώθηκε με διαφορετικούς ρυθμούς μεταξύ των εβδομαδιαίων δειγματοληψιών. Η εξέταση μερικών βιοψιών στο στερεοσκόπιο έδειξε ότι η πλειονότητα των ωοκυττάρων, την 55<sup>η</sup> ημέρα άρχισαν να εμφανίζουν σημάδια ατρησίας. Ειδικότερα το σχήμα τους έγινε ακανόνιστο, τα κύτταρα του ωοθυλακίου διογκώθηκαν και η τονικότητα των ωοκυττάρων χάθηκε.

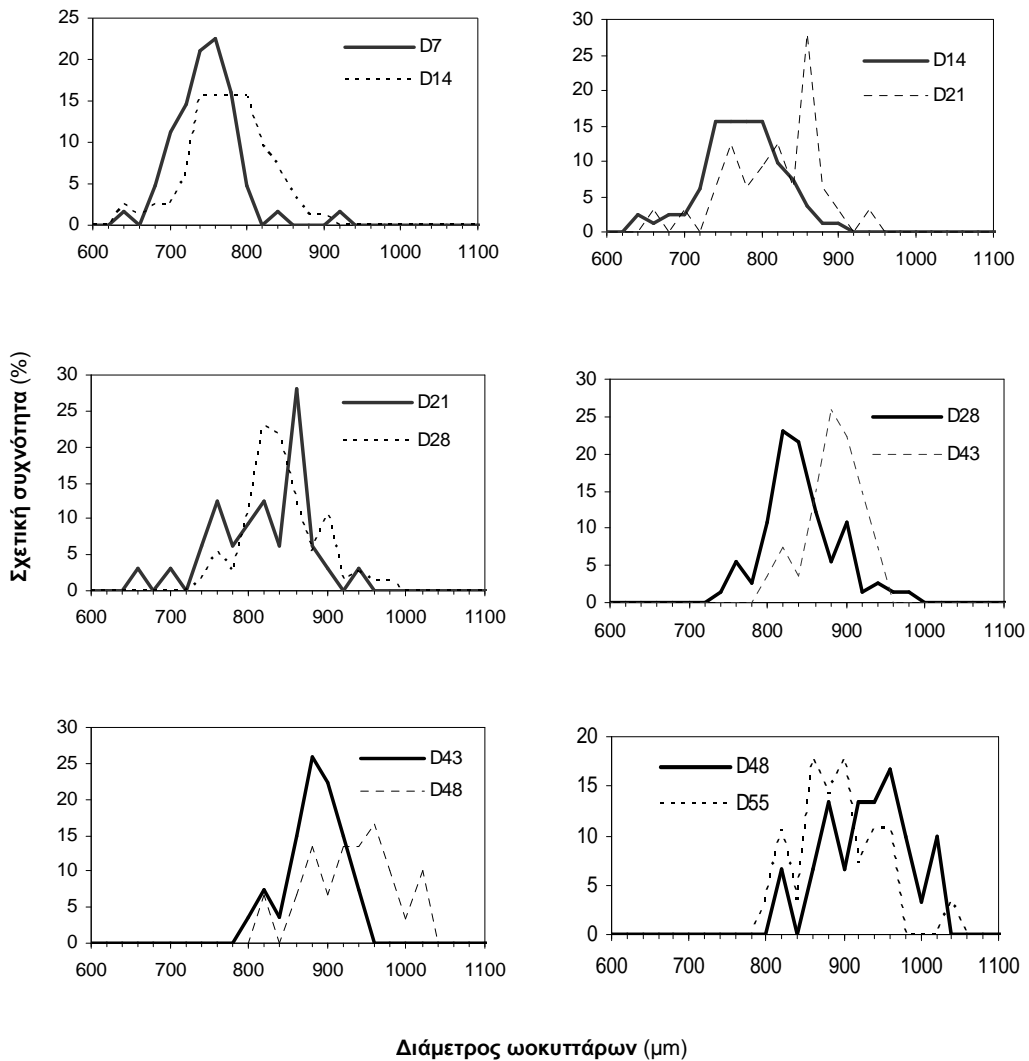
Όπως βλέπουμε στα διαγράμματα κατανομής του μεγέθους των ωοκυττάρων ενός θηλυκού που εξετάζονταν σε κάθε δειγματοληψία (Εικόνα 3.2.), το μέγεθος των ωοκυττάρων κατανέμονταν από τα 680 έως 840 μm (κύρια κατανομή: 740-780μm), την 1<sup>η</sup> εβδομάδα (D<sub>7</sub>) και μετατοπίστηκε από τα 720 έως τα 900μm (κύρια κατανομή: 740-840μm) την 2<sup>η</sup> εβδομάδα (D<sub>14</sub>). Την προτελευταία και την τελευταία εβδομάδα, τα περισσότερα ωοκύτταρα κυμαίνονταν από 840 έως και 1040 μm (κύρια κατανομή: 860-900μm).



**Εικόνα 3.1.** Μέση διάμετρος ( $\pm$ SE) των ωοκυττάρων, σε βιοψίες ωοθηκών, από θηλυκούς γεννήτορες κατά την 7<sup>η</sup> και έως την 55<sup>η</sup> ημέρα παραμονής σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Οι αριθμοί επάνω από τα σημεία αντιστοιχούν στον αριθμό των ωοκυττάρων που μετρήθηκαν.

Παρόμοια στο δεύτερο θηλυκό που χρησιμοποιήσαμε, το μέγεθος των ωοκυττάρων ξεκίνησε από τα 880 έως 920  $\mu\text{m}$  την 4<sup>η</sup> εβδομάδα ( $D_{28}$ - $D_{43}$ ) και έφθασε τα 920 έως 1020  $\mu\text{m}$  την τελευταία εβδομάδα, όταν άρχισαν να παρατηρούνται σημάδια ατρησίας.

Σύμφωνα με όλα αυτά τα στοιχεία, κατά την παραμονή σε συνθήκες αιχμαλωσίας, τα ωοκύτταρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά μέχρι το μέγεθος των 900-1000 $\mu\text{m}$ , συσσωρεύοντας λεκιθικό υλικό στο εσωτερικό τους αλλά δεν ολοκλήρωσαν την ωρίμανση τους (ενυδάτωση, ομογενοποίηση λεκίθου, δραστική αύξηση όγκου), έγιναν ατρητικά και άρχισαν να απορροφούνται.

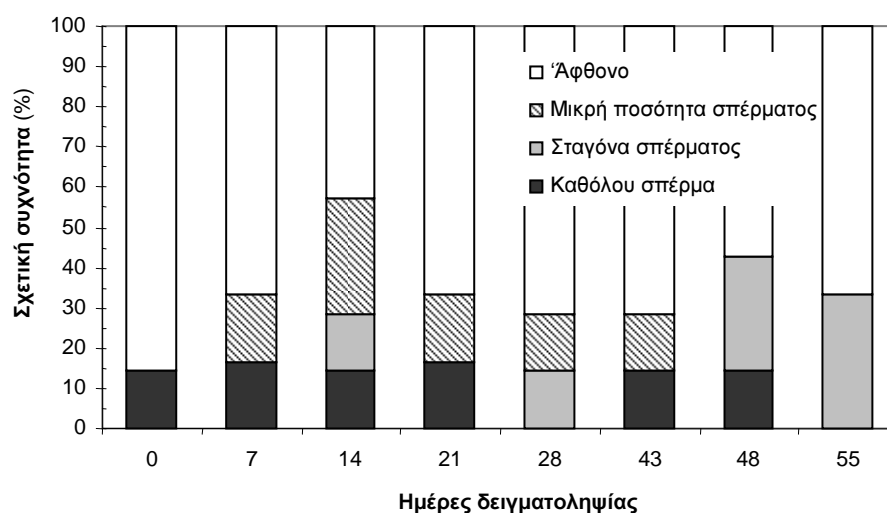


**Εικόνα 3.2.** Κατανομή του μεγέθους των ωκοκυττάρων, σε βιοψία ωσθήκης ενός θηλυκού χελονιού την 7<sup>η</sup> (Day 7, D<sub>7</sub>) και έως την 55<sup>η</sup> ημέρα (Day 55, D<sub>55</sub>) παραμονής σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

## 3.2. Αρσενικά άτομα

### 3.2.1. Κατάσταση σπερμίας

Κατά την έναρξη του πειράματος, τα περισσότερα αρσενικά ήταν σε κατάσταση πλήρους σπερμίας (80%, στάδιο σπερμίας 3: άφθονο σπέρμα) και παρέμειναν σ' αυτή την κατάσταση μέχρι το τέλος του πειράματος (Ημέρα 55). Μόνο ένα μικρό ποσοστό δεν παρήγαγε σπέρμα. Όμως μερικά αρσενικά, μέσα σε επτά ημέρες από την έναρξη του πειράματος, μετέπεσαν από το στάδιο 2 (μικρή ποσότητα σπέρματος) στο στάδιο 1 (σταγόνα σπέρματος), δηλαδή από εκεί που απελευθέρωναν εύκολα μια σημαντική ποσότητα σπέρματος απελευθέρωναν έναν σημαντικά μικρότερο όγκο ( $D_{14}$  αλλά και ημέρα 48 και 55).

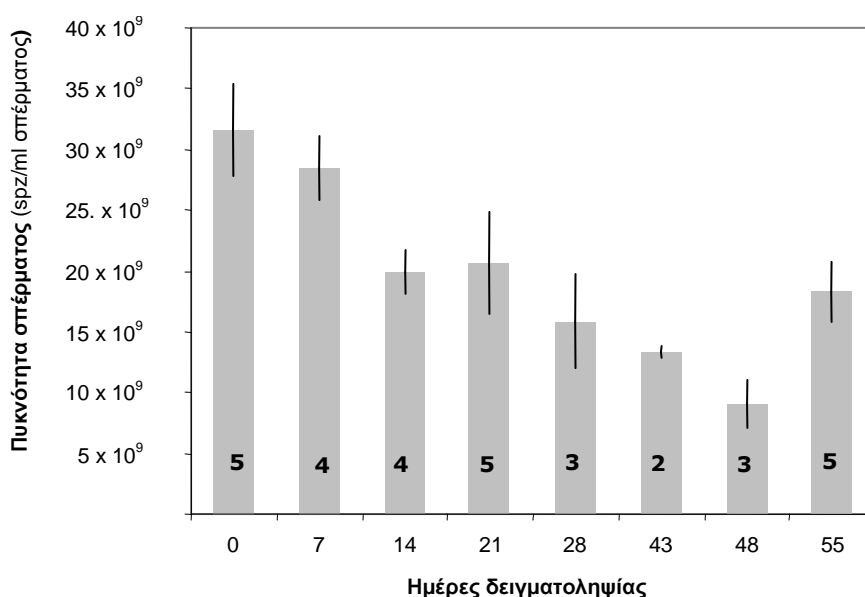


**Εικόνα 3.3.** Συχνότητα εμφάνισης αρσενικών χελονιών, στις τέσσερις κατηγορίες του δείκτη σπερμίας (άφθονο σπέρμα, μικρή ποσότητα σπέρματος, σταγόνα σπέρματος, καθόλου σπέρμα) κατά την 1<sup>η</sup> (Day 0,  $D_0$ ) και έως την 55<sup>η</sup> ημέρα (Day 55,  $D_{55}$ ) παραμονής σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

### 3.2.2. Πυκνότητα σπέρματος

Η μέση ολική πυκνότητα του σπέρματος ήταν  $20,8 \times 10^9$  σπερματοζωάρια ανά ml σπέρματος. Η πυκνότητα ακολούθησε μια πτωτική πορεία, κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών.

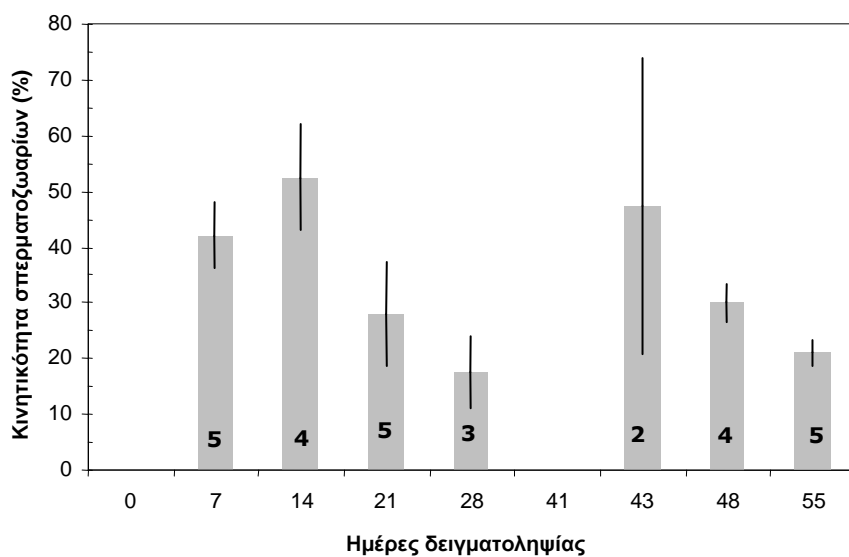
Η μέγιστη πυκνότητα παρατηρήθηκε την 1<sup>η</sup> ημέρα (D<sub>0</sub>) και ήταν  $31,6 \times 10^9$  σπερματοζωάρια ανά ml σπέρματος ενώ η ελάχιστη τιμή ήταν  $9,1 \times 10^9$  σπερματοζωάρια ανά ml σπέρματος και παρατηρήθηκε την 48<sup>η</sup> ημέρα (D<sub>48</sub>, Εικόνα 3.4.).



**Εικόνα 3.4.** Μέση πυκνότητα ( $\pm$ SE) σπέρματος (αριθμός σπερματοζωαρίων ανά ml σπέρματος) την 1<sup>η</sup> (Day 0, D<sub>0</sub>) και έως την 55<sup>η</sup> ημέρα (Day 55, D<sub>55</sub>) παραμονής σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Επάνω στα ιστογράμματα, παρουσιάζεται ο αριθμός των αρσενικών στα οποία έγινε δειγματοληψία σπέρματος για τον προσδιορισμό της πυκνότητας.

### 3.2.3. Κινητικότητα σπερματοζωαρίων

Η κινητικότητα του σπέρματος ήταν γενικά χαμηλή. Η μέση ολική κινητικότητα ήταν μόλις 33% και παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις με πτωτική τάση κατά τη διάρκεια της περιόδου σπερμίας. Ειδικότερα, η μέγιστη κινητικότητα ήταν 42% και παρατηρήθηκε την 7<sup>η</sup> ημέρα (D<sub>7</sub>) ενώ η ελάχιστη ήταν 18% και παρατηρήθηκε την 28<sup>η</sup> ημέρα (D<sub>28</sub>).

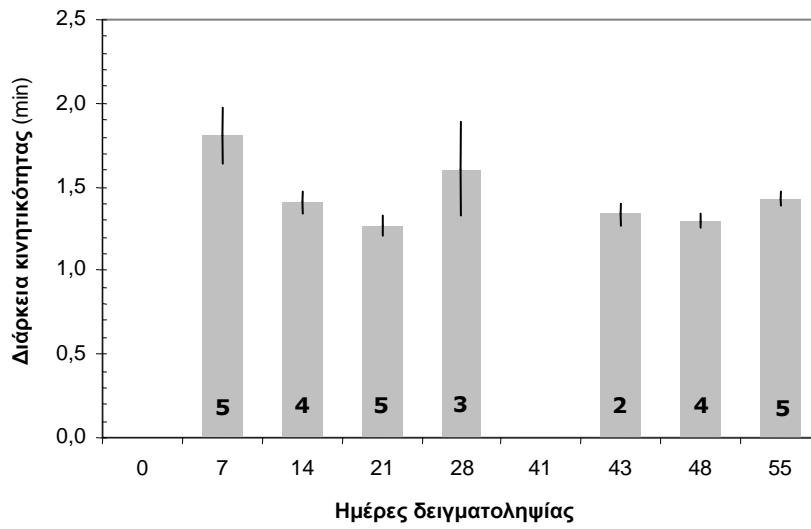


**Εικόνα 3.5.** Ποσοστό κινούμενων σπερματοζωαρίων (% ,  $\pm$ SE) σε δείγματα σπέρματος, από αρσενικά χελόνια την 1<sup>η</sup> (Day 0, D0) και έως την 55<sup>η</sup> ημέρα (Day 55, D<sub>55</sub>) παραμονής σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Επάνω στα ιστογράμματα παρουσιάζεται ο αριθμός των αρσενικών στα οποία έγινε δειγματοληψία σπέρματος για τον προσδιορισμό της κινητικότητας του.

#### 3.2.4. Διάρκεια κινητικότητας σπερματοζωαρίων

Η ολική μέση διάρκεια της εμπρόσθιας κινητικότητας των σπερματοζωαρίων ήταν 1,46min. Η διάρκεια της κινητικότητας δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της περιόδου σπερμίας. Ειδικότερα μεταβλήθηκε μεταξύ των τιμών 1,81 (D<sub>7</sub>) και 1,27min (D<sub>21</sub>).





**Εικόνα 3.6.** Μέση διάρκεια ( $\pm$ SE) της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (min) σε δείγματα σπέρματος, από αρσενικά χελόνια κατά την 1<sup>η</sup> (Day 0, D<sub>0</sub>) και έως την 55<sup>η</sup> ημέρα (Day 55, D<sub>55</sub>) παραμονής σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Επάνω στα ιστογράμματα παρουσιάζεται ο αριθμός των αρσενικών στα οποία έγινε δειγματοληψία σπέρματος για τον προσδιορισμό της διάρκειας κινητικότητας του.

## **4. Συζήτηση**

Αναμφίβολα το χελόνι είναι ένα είδος με σημαντική αξία για την Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια αλλά και την παράκτια αλιεία. Το είδος αυτό συγκεντρώνει πλεονεκτήματα και πληρεί τις προϋποθέσεις για την ένταξη του στη διαδικασία εκτροφής. Μέχρι σήμερα όμως, δεν υπάρχει μαζική παραγωγή αβγών και ιχθυδίων του είδους σε συνθήκες αιχμαλωσίας και εξαιτίας αυτού η εκτροφή δεν μπορεί να αναπτυχθεί. Με εξαίρεση τις εργασίες των Cataudella et al. (1988a, b) και Boglione et al. (1992), ο αναπαραγωγικός κύκλος του είδους δεν έχει μελετηθεί επαρκώς και υπάρχει σημαντική έλλειψη πληροφοριών σε διεθνές επίπεδο. Σε μια προσπάθεια να αποκτήσουμε πληροφορίες για την γεννητική ωρίμανση και την αναπαραγωγή του είδους μεταφέραμε γεννήτορες χελονιού σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

### **4.1. Θηλυκά άτομα**

#### **4.1.1. Ανάπτυξη ωοκυττάρων-τύπος ωοτοκίας**

Η παρουσία μόνο λεκιθικών ωοκυττάρων (εύρους από 700-1000μm περίπου) στις βιοψίες των ωοθηκών και η απουσία ωοκυττάρων άλλων σταδίων ανάπτυξης (όπως για παράδειγμα στο στάδιο πρώιμης λεκιθογένεσης ή και στο στάδιο προλεκιθογένεσης) αποτελεί ισχυρή ένδειξη για το ότι στο χελόνι η ανάπτυξη των ωοκυττάρων είναι σύγχρονη και η ωοτοκία γίνεται κατά ομάδες. Ως εκ τούτου, το χελόνι είναι ένας πολλαπλός αποθέτης, ο οποίος απελευθερώνει τα αυγά του μέσα από διαδοχικές πράξεις ωοτοκίας. Ειδικότερα, τα αυγά σε κάθε πράξη ωοτοκίας, προέρχονται από την σύγχρονη ωρίμανση λεκιθικών ωοκυττάρων κατά ομάδες.

#### **4.1.2. Η ανάγκη για τεχνητή πρόκληση της ωοτοκίας με χορήγηση ορμονών**

Στη συγκεκριμένη εργασία, δεν καταγράφηκε κάποια ωοτοκία κατά την παραμονή των γεννητόρων σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ τα ωοκύτταρα των θηλυκών αναπτύσσονται κανονικά μέχρι το στάδιο της προχωρημένης λεκιθογένεσης, δεν εισέρχονται στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης. Ειδικότερα, η παρακολούθηση των ωοκυττάρων, έδειξε ότι τα ωοκύτταρα του χελονιού, ωριμάζουν μέχρι το μέσο μέγεθος των 930μm και ακολούθως αντί να εισέλθουν στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης, γίνονται ατρητικά και απορροφούνται. Σύμφωνα όμως με τις γνώσεις μας για την ωογένεση στα ψάρια,

στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης, τα ωοκύτταρα θα έπρεπε να ενυδατωθούν, η λέκιθος θα έπρεπε να ομογενοποιηθεί (συγχώνευση και άδειασμα του περιεχομένου των λεκιθικών κυστιδίων), το μέγεθος των ωοκυττάρων θα έπρεπε να αυξηθεί δραστικά και τέλος το ώριμο πλέον ωοκύτταρο, θα έπρεπε να αποδεσμευθεί από το ωοθυλάκιο του και να πέσει στο ωαγωγό. Αντί αυτών, τα ωοκύτταρα απορροφήθηκαν (ατρησία) και καμία ωοτοκία δεν παρατηρήθηκε στις συνθήκες αιχμαλωσίας. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό για τα εκτρεφόμενα είδη ψαριών και έχει περιγραφεί ως μια αναπαραγωγική δυσλειτουργία των θηλυκών σε συνθήκες αιχμαλωσίας (Zohar, 1988, 1989a,b, Peter et al., 1993), αλλά και των κεφαλοειδών ειδικότερα (Nash and Shehadeh, 1980, Kraul, 1983, Aizen et al., 2005). Έτσι λοιπόν είτε εξαιτίας της ακαταλληλότητας των συνθηκών εκτροφής είτε εξαιτίας της καταπόνησης (stress) που επιβάλλουν οι συνθήκες αιχμαλωσίας, τα θηλυκά είτε (1), δεν ωριμάζουν (η περίπτωση του χελιού, Kagawa et al., 2005), είτε (2), δεν μπαίνουν στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης παρόλο που ολοκληρώνουν τη λεκιθογένεση (η πιο συνηθισμένη περίπτωση, Mananos et al., 2008), είτε τέλος (3), δεν απελευθερώνουν τους γαμέτες τους (απουσία ωοτοκίας, η περίπτωση των σολομοειδών, Broimage et al., 1992). Οι αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες των γεννητόρων αντιμετωπίζονται με χορήγηση ορμονών που περιλαμβάνουν είτε τη χορήγηση γοναδοτροπινών εξωγενούς προέλευσης στη μορφή εκχυλισμάτων υπόφυσης (LH preparations), είτε τη χορήγηση καθαρών γοναδοτροπινών εξωγενούς προέλευσης (π.χ. ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη, HCG), είτε τη χορήγηση εκλυτικών παραγόντων των γοναδοτροπινών (GnRH), (Zohar and Mylonas, 2001, Mylonas et al., 2009), οι οποίοι διεγείρουν την έκκριση της ενδογενούς γοναδοτροπίνης LH από την υπόφυση. Η ενδογενής LH με τη σειρά της, επιδρά στο επίπεδο των γονάδων (όρχεις, ωοθήκες) ενεργοποιώντας την παραγωγή των στεροειδών ορμονών και τη διαδικασία της τελικής ωρίμανσης των γαμετών. Από τότε που ανακαλύφθηκαν τα εμπορικά συνθετικά ανάλογα των εκλυτικών παραγόντων των γοναδοτροπινών (GnRH), τα επονομαζόμενα GnRH agonists (GnRH<sub>a</sub>), για ιατρική χρήση, η χρησιμοποίησή τους για την πρόκληση της ωοτοκίας σε ψάρια αναπτύχθηκε ραγδαία, εξαιτίας των σημαντικών πλεονεκτημάτων τους συγκριτικά με τα παρασκευάσματα των γοναδοτροπινών. Μεταξύ άλλων πλεονεκτημάτων, σημαντική είναι η δράση τους στο ανώτερο επίπεδο του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων και η διέγερση της έκκρισης των φυσικών γοναδοτροπινών του ψαριού δέκτη (LH, FSH) αλλά και των άλλων ορμονών της υπόφυσης, που είναι σημαντικές για τις αναπαραγωγικές λειτουργίες (Mylonas et al., 2009).

Η χορήγηση GnRHα σε θηλυκούς γεννήτορες, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την πρόκληση της τελικής ωρίμανσης και της ωοτοκίας σε πολλά είδη ψαριών (Mylonas and Zohar, 2001b). Όμως, η αποτελεσματικότητα της χορήγησης GnRHα επηρεάζεται καθοριστικά (1) από το στάδιο ωρίμανσης των γεννητόρων και (2) από τη μέθοδο της χορήγησης. Η χορήγηση GnRHα είναι αποτελεσματική μόνο όταν γίνεται στο στάδιο της προχωρημένης λεκιθογένεσης και κοντά στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης.

#### **4.1.3. Επιλογή της μεθόδου χορήγησης: ένεση ή συστήματα βραδείας απελευθέρωσης**

Η χορήγηση του GnRH με ένεση είναι μια απλή και σχετικά εύκολη τεχνική που εφαρμόζεται αποτελεσματικά σε πολλά εκτρεφόμενα είδη, διεθνώς. Σε αντίθεση όμως με τα πλεονεκτήματα της απλότητας και της ευκολίας και στις περιπτώσεις όπου η ορμόνη πρέπει να χορηγηθεί σε περισσότερες από μία δόσεις (επαναλαμβανόμενες ενέσεις), οι συχνές συλλήψεις και ναρκώσεις των γεννητόρων, προκαλούν έντονη καταπόνηση από την οποία μπορεί να επηρεάζεται αφενός η αποτελεσματικότητα της μεθόδου και αφετέρου η ποιότητα των αβγών (δες ανασκοπήσεις: Mylonas and Zohar, 2001, Mylonas et al., 2009).

Σε αντίθεση με τις συνέπειες που επιφέρουν οι επαναληπτικές ενέσεις, η χορήγηση με παρασκευάσματα μακροχρόνιας διανομής, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Τα συστήματα αυτά μπορεί να είναι είτε: (1) κύλινδροι διαμέτρου 2mm φτιαγμένοι από χοληστερόλη ή οξικό βινυλεστέρα (Weil and Crim 1983, Mylonas and Zohar 2007) που εμφυτεύονται ενδομυϊκά και αποκαλούνται εμφυτεύματα, είτε (2) βιοδιασπώμενα μικροσφαιρίδια που χορηγούνται με ένεση (Zohar 1988, Breton et al., 1990, Mylonas et al., 1995). Το βασικό χαρακτηριστικό και πλεονέκτημα τους, είναι ότι απελευθερώνουν την ορμόνη σταδιακά, με περίοδο διανομής που μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως και 5 εβδομάδες (μακροχρόνια διανομή) ανάλογα με το παρασκεύασμα (Crim et al., 1988, Zohar 1996, Zohar and Mylonas 2001, Mylonas and Zohar 2001, Mananos et al., 2002). Μ' αυτό τον τρόπο, η GnRHα διατηρείται στην αιματική κυκλοφορία για μεγάλο χρονικό διάστημα, και είναι διαθέσιμος σε επαρκείς ποσότητες (ανάλογα με τη δόση) ώστε να δράσει επιτυχώς όταν τα ωοκύτταρα προσεγγίσουν το στάδιο της τελικής ωρίμανσης. Εξαιτίας της βραδείας απελευθέρωσης του GnRHα από το εμφύτευμα, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυξάνεται σημαντικά, γιατί η τελική ωρίμανση προϋποθέτει μια παρατεταμένη ορμονική θεραπεία για να ολοκληρωθεί.

Εξαιτίας της αυξημένης αποτελεσματικότητας τους, τα συστήματα μακροχρόνιας διανομής έχουν χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές με μεγάλη επιτυχία για την πρόκληση της ωοτοκίας και της σπερμιάσης σε πολλά είδη ψαριών (Mylonas et al., 1995, Kokokiris et al., 2005, Mylonas et al., 2009). Άλλα βασικά γνωρίσματα και πλεονεκτήματα των εμφυτευμάτων είναι ο μεγάλος χρόνος ημισείας ζωής και η μακρόχρονη διατήρηση της αποτελεσματικότητας τους (μέχρι και 3 χρόνια μετά από αποθήκευση στους -20 °C).

#### **4.1.4. Χορήγηση GnRHα και ανταγωνιστών ντοπαμίνης (DA)**

Στον κοινό κέφαλο (*Mugil cephalus*) οι Aizen et al. (2005), ανέφεραν την παρουσία ισχυρής ντοπαμινεργικής δράσης. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα προκάλεσε επιτυχώς την ωοτοκία μετά από χορήγηση GnRHα, σε συνδυασμό με τους ανταγωνιστές της ντοπαμίνης (DA), ντομπεριδόνη και μετακλοπραμίδη. Η DA δρα στο επίπεδο της υπόφυσης όπου αναστέλλει την έκκριση της LH. Η χορήγηση ανταγωνιστών της DA, σε συνδυασμό με τον GnRHα, μετακινεί την αναστολή της DA στην υπόφυση και επιτρέπει την διεγερτική επίδραση του GnRHα στην έκκριση της LH (Mylonas et al., 2009). Κατά παρόμοιο τρόπο με τον κοινό κέφαλο, συνδυασμός GnRHα και ανταγωνιστών της DA, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε μερικά κεφαλοειδή (Glubokov et al., 1994, Arabaci and Sari, 2004).

## **4.2. Αρσενικά άτομα**

### **4.2.1. Σπερμίαση**

Με την έναρξη της πειραματικής περιόδου, τα περισσότερα αρσενικά παρήγαγαν ήδη άφθονη ποσότητα σπέρματος (πλήρης σπερμίαση, 80% των αρσενικών) ενώ συνέχισαν να είναι σε πλήρη σπερμίαση και μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου. Ωστόσο, επειδή δεν μετρήσαμε τον όγκο του σπέρματος δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε εάν ο όγκος του εξερχόμενου σπέρματος ακολούθησε μια πτωτική ή αυξητική πορεία κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Πάντως, η αναγνώριση πολλών αρσενικών με δυνατότητα εκσπερμάτισης (σε κατάσταση πλήρους σπερμιάσης), πολύ πριν την αναμενόμενη ωοτοκία των θηλυκών, καταδεικνύει ότι στο χελόνι, η σπερμίαση πραγματοποιείται πριν την εμφάνιση θηλυκών σε φάση ωοτοκίας (θηλυκά σε ωοτοκία, ovulated females) και διαρκεί

μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την ωοτοκία. Με άλλα λόγια τα αρσενικά ωριμάζουν νωρίτερα από τα θηλυκά άτομα.

#### 4.2.2. Πυκνότητα σπέρματος

Η μέση πυκνότητα του σπέρματος κυμάνθηκε από 9.1 έως  $31.6 \times 10^9$  σπερματοζώαρια (spz) ανά ml σπέρματος, με μέση τιμή τα  $20.8 \times 10^9$  spz x ml<sup>-1</sup>. Παρόμοιες τιμές πυκνότητας με αυτές του χελονιού έχουν επίσης αναφερθεί για το φαγκρί (*Pagrus pagrus*,  $8.6-23.7 \times 10^9$  spz x ml<sup>-1</sup>), το καλκάνι (*Pleuronectes ferrugineus*,  $10-20 \times 10^9$  spz x ml<sup>-1</sup>, Clearwater & Crim, 1998), μερικά σολομοειδή (Scott & Baynes, 1980) αλλά μεγαλύτερες τιμές από αυτές του χελονιού, έχουν αναφερθεί για το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*,  $5-55 \times 10^9$  spz x ml<sup>-1</sup>, Sorbera et al., 1996, Fauvel et al., 1999), το καλκάνι ( $20-55 \times 10^9$  spz x ml<sup>-1</sup>, *Scophthalmus maximus*, Suquet et al., 1992a) και το αμερικάνικο λαβράκι ( $60-100 \times 10^9$  spz x ml<sup>-1</sup>, *Morone saxatilis*, Mylonas et al., 1997b).

Βέβαια, η πυκνότητα του σπέρματος παρουσίασε μια πτωτική τάση κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου των 8 εβδομάδων. Η παραγωγή σπέρματος, ελέγχεται από την έκκριση της γοναδοτροπίνης LH (Clemens and Grant 1965 στους Mylonas et al., 2003). Το σπερματικό υγρό, βοηθάει τα σπερματοζώαρια να βγούν από τους σπερματικούς λοβούς στους σπερματογωγούς (Billard 1986) και επειδή η παραγωγή σπερματικού υγρού αυξάνεται κατά τη διάρκεια της σπερμίας (αναπαραγωγική περίοδος αρσενικών), είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η μείωση της πυκνότητας είναι το φυσιολογικό αποτέλεσμα της αυξανόμενης παραγωγής σπερματικού υγρού. Ωστόσο σε μερικά είδη, παρατηρείται το αντίθετο από αυτό που παρατηρήσαμε στο χελόνι, δηλαδή η πυκνότητα αυξάνεται κατά τη διάρκεια της σπερμίας. Μάλιστα δε, σε μερικά είδη παρατηρείται μια πολύ μεγάλη αύξηση της πυκνότητας του σπέρματος στο τέλος της περιόδου σπερμίας, όταν ο όγκος του παραγόμενου σπέρματος μειώνεται σημαντικά (Methven & Crim, 1991, Mazorra de Quero et al., 2000). Επειδή όμως, στη συγκεκριμένη εργασία, δεν μετρήσαμε τον όγκο του σπέρματος, δεν μπορούμε να αποδώσουμε την μείωση της πυκνότητας, αποκλειστικά και μόνο σε μια ενδεχόμενη αύξηση του σπερματικού υγρού. Σε μερικά είδη όπως για παράδειγμα στο λαβράκι, έχει διαπιστωθεί με τη βοήθεια των ιστολογικών παρατηρήσεων στους όρχεις, ότι η αύξηση της πυκνότητας του σπέρματος είναι το αποτέλεσμα της αύξησης των σπερματογονίων που ωριμάζουν σε σπερματοζώαρια και όχι μόνο της αύξησης του σπερματικού υγρού (Rainis et al., 2003). Κατ' αντίστοιχο τρόπο, μπορούμε βάσιμα να υποθέσουμε, ότι η μείωση της πυκνότητας του σπέρματος στο

χελόνι, σχετίζεται και με μια ενδεχόμενη μείωση του αριθμού των σπερματογονίων που ωριμάζουν σε σπερματοζωάρια. Αυτή πάντως η μείωση είναι μια αναμενόμενη απόκριση των αρσενικών, όσο η αναπαραγωγική περίοδος πλησιάζει προς την ολοκλήρωση της.

#### **4.2.3. Κινητικότητα σπέρματος**

Όπως έχει διαπιστωθεί σε πολλά είδη, η γονιμότητα του σπέρματος συνδέεται άμεσα με την κινητικότητα του (Fauvel et al., 1999, Wirtz et al., 2006). Στους τελεόστεους, η κινητικότητα (ποσοστό σπερματοζωαρίων με εμπρόσθια κίνηση και διάρκεια κίνησης) θεωρείται ο καλύτερος βιο-δείκτης της ποιότητας του σπέρματος (Billard et al., 1995; Lahnsteiner et al., 1996, 1998), αφού τα σπερματοζωάρια πρέπει να «κολυπήσουν» ενεργητικά για να φθάσουν τη μικροπύλη του ώριμου ωοκυττάρου. Κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης, τα πλήρως διαφοροποιημένα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται από τις σπερματικές κύστες, αλλά όσο βρίσκονται μέσα στους όρχεις δεν έχουν ικανότητα εμπρόσθιας κίνησης (Billard, 1986). Η ικανότητα αυτή αποκτάται όταν τα σπερματοζωάρια φθάσουν στους σπερματογωγούς και αφού εκτεθούν στη δράση των προγεσταγόνων που παράγονται εκεί (Miura et al., 1992, Nagahama 1994, Miura et al., 1995). Επειδή όσο προχωρά η περίοδος σπερμίας, αυξάνεται ο χρόνος παραμονής των σπερματοζωαρίων στους σπερματογωγούς, ωριμάζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό και αναπτύσσουν κινητικότητα σε υψηλότερα ποσοστά. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο παρατηρείται αύξηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων καθώς ολοκληρώνεται η περίοδος σπερμίας, σε μερικά είδη (Fostier et al, 1982, Buyukhatiroglu & Holtz 1984). Η μέγιστη τιμή κινητικότητας για το χελόνι (40%, 7<sup>η</sup> ημέρα) είναι εξαιρετικά χαμηλή, συγκριτικά με την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων άλλων εκτρεφόμενων ειδών. Για παράδειγμα η κινητικότητα του σπέρματος του φαγκριού είναι της τάξης του 95% (Mylonas et al., 2003). Η χαμηλή κινητικότητα μπορεί να οφείλεται: (1) στο σύντομο χρόνο παραμονής των σπερματοζωαρίων στους σπερματογωγούς, ή (2) σε ορμονικές διαταραχές, όπως για παράδειγμα οι διαταραχές στην έκκριση προγεσταγόνων ή ακόμα σε διάφορους εξωτερικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Vladic & Jarvi, 1997; Alavi & Cosson, 2005), το pH (Ingermann et al., 2002; Alavi & Cosson, 2005 *in Wirtz et al., 2006*), η ωσμωμοριακότητα (Morisawa & Suzuki, 1980; Litvak & Trippel, 1998; Ohta & Shinriki, 1998; Haddy & Pankhurst, 2000; Cosson, 2004; Alavi & Cosson, 2006), και η παρουσία ρυπαντών στο νερό (xenobiotic substances (Khan & Weis, 1987a, b, c; Kime et al., 1996; Rurangwa et al., 1998, 2002; Ciereszko & Dabrowski, 2000; Van Look, 2001; Wagner et al., 2002; Van Look & Kime,

2003 in Wirtz et al., 2006), που όπως είναι γνωστό επηρεάζουν την κινητικότητα του σπέρματος των ψαριών.

Εκτός από τη χαμηλή κινητικότητα, το σπέρμα του χελονιού είχε μειούμενη κινητικότητα η οποία έφθασε την τιμή 18% προς το τέλος της περιόδου σπερμίας. Ανάλογη μείωση της κινητικότητας έχει αναφερθεί και σε άλλα είδη (Billard et al., 1982, Aas et al., 1991, Metheven & Crim 1991, Rana 1995, Rainis et al., 1993). Για παράδειγμα, στο λαβράκι η κινητικότητα τους σπέρματος μειώθηκε από 95% στη μέση της περιόδου σπερμίας σε 40% στο τέλος της (Rainis et al., 2003). Αυτή η μείωση θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της γήρανσης των σπερματοζωαρίων και της μείωσης της ικανότητας των όρχεων να παράγουν στεροειδείς ορμόνες, που επηρεάζουν και καθορίζουν την ποιότητα του σπέρματος (Nagahama 1994, Mylonas et al., 2003) και μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια αναμενόμενη απόκριση (Billard, 1986; Sorbera et al., 1996).

Αναμφίβολα, η χαμηλή και σταδιακά μειούμενη κινητικότητα αποτελεί ισχυρή ένδειξη για την μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης των σπερματοζωαρίων του χελονιού, σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Οι ερευνητικές εργασίες σε άλλα είδη αναφέρουν ότι η χορήγηση ορμονών και συγκεκριμένα του GnRH<sub>a</sub>, βελτιώνει σημαντικά την κινητικότητα του σπερματοζωαρίων. Για παράδειγμα, στο πλατύψαρο (*Pleuronectes ferrugineus*, yellowtail flounder), η χορήγηση GnRH<sub>a</sub> με συστήματα μακροχρόνιας διανομής αύξησε την κινητικότητα από 20% σε 40–90% (Clearwater and Crim, 1998). Επίσης στο πλατύψαρο *Hippoglossus hippoglossus* (Atlantic halibut), η χορήγηση GnRH<sub>a</sub> στο τέλος της περιόδου σπερμίας, μείωσε το ιξώδες και την πυκνότητα του σπέρματος (Vermeirssen et al., 2000) και αύξησε την κινητικότητα του (Mazorra de Quero et al., 2000). Σπέρμα με υψηλή κινητικότητα και διάρκεια κινητικότητας, θα έχει καλύτερες ευκαιρίες για επιτυχή γονιμοποίηση μεγάλου αριθμού αυγών. Ωστόσο, σε μερικά είδη η χορήγηση GnRH<sub>a</sub> δεν επιδρά ευεργετικά στην κινητικότητα, όπως για παράδειγμα στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), στο οποίο δεν παρατηρήθηκε καμία ευεργετική επίδραση του GnRH<sub>a</sub>, ούτε κατά την αξιολόγηση του σπέρματος αμέσως μετά τη συλλογή του ούτε και μετά την ολονύκτια αποθήκευση του στους 4°C (Rainis et al., 2003).

Τα αποτελέσματα ερευνητικών εργασιών στην Ιταλία και στο Μαρόκο έχουν δείξει ότι οι γεννήτορες του χελονιού απελευθερώνουν αυγά καλής ποιότητας μετά από τεχνητή πρόκληση της ωοτοκίας με ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη (HCG), με υψηλά ποσοστά εκκολαψιμότητας. Όμως, η τεχνολογία αναπαραγωγής με



χορήγηση HCG υστερεί σε σχέση με τους GnRHs, ενώ ακόμα δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο πρωτόκολλο χρήσης της HCG για μαζική παραγωγή αυγών του χελονιού. Η ανάπτυξη τέτοιων πρωτοκόλλων πρέπει να περιλαμβάνει τη διερεύνηση της επίδρασης ορμονών στην ωοτοκία (Roortenaar and Pankhurst, 2000a,b) και στη παραγωγή σπέρματος για να μπορεί να αναπτυχθεί μια αποτελεσματική τεχνητή γονιμοποίηση (Pankhurst and Roortenaar, 2000). Οι πρώτες ορμόνες που πρέπει να διερευνηθούν είναι κατά την άποψη μας, οι GnRHs.

#### **4.2.4. Διάρκεια κινητικότητας**

Η μέση διάρκεια της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων ήταν 1,46min. Η διάρκεια κινητικότητας του χελονιού είναι παρόμοια με αυτή άλλων ειδών, όπως για παράδειγμα της κουτσομούρας (*Mullus barbatus*, 1.5min, Lahnsteiner & Patzner 1998), του κυπρίνου (*Cyprinus carpio*, 1.5 min, Billard et al., 1995b) του αμερικάνικου λαβρακιού (*Morone saxatilis*, 1.4 min, Holland et al., 1996), του καλκανιού (*Scopthalmus maximus*, 1.7 min, Chauvaud et al., 1995) αλλά μικρότερη αυτής του φαγκριού (*Pagrus pagrus* 2.6-3.9min, Mylonas et al., 2003), και της ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*, 3.6 min, Billard et al., 1982). Αναμφίβολα, τα σπερματοζωάρια με μεγάλη διάρκεια κίνησης θα είναι πιο αποτελεσματικά στη γονιμοποίηση των ωαρίων γιατί θα έχουν περισσότερο χρόνο στη διάθεση τους και καλύτερες πιθανότητες για να εντοπίσουν και να διαπεράσουν τη μικροπύλη (Geffen, 1999). Η διάρκεια της κινητικότητας δεν μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια της περιόδου σπερμίας. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν οι Mylonas et al. (2003) στο φαγκρί αλλά και οι Rainis et al. (2003) στο λαβράκι. Επιπλέον, οι Rainis et al. (2003) αναφέρουν ότι η διάρκεια της κινητικότητας στο λαβράκι δεν μεταβλήθηκε ούτε και μετά τη χορήγηση ορμονών για τη βελτίωση της ποσότητας και της ποιότητας του σπέρματος.

## 5. Συμπεράσματα

1. Η παρουσία μόνο λεκιθικών ωοκυττάρων (εύρους από 700-1000μm περίπου) στις βιοψίες των ωοθηκών του χελονιού και η απουσία ωοκυττάρων άλλων σταδίων ανάπτυξης, αποτελεί ισχυρή ένδειξη για το ότι το χελόνι είναι ένας **πολλαπλός αποθέτης** αυγών, με **σύγχρονη κατά ομάδες** ανάπτυξη των ωοκυττάρων. Η ιστολογική εξέταση των δειγμάτων θα αποκαλύψει τον πραγματικό τύπο της ωοτοκίας του είδους.
2. Τα θηλυκά χελόνια δεν ωοτοκούν αυθόρμητα σε συνθήκες αιχμαλωσίας παρόλο που ωριμάζουν φυσιολογικά μέχρι το στάδιο της προχωρημένης λεκιθογένεσης. Παρόλο που δεν γνωρίζουμε τα ακριβή αίτια αυτής της απόκρισης και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι, αυτή είναι μια γνωστή δυσλειτουργία των θηλυκών γεννητόρων κατά την παραμονή τους σε συνθήκες αιχμαλωσίας, μπορούμε στα πλαίσια μιας μελλοντικής εργασίας να δοκιμάσουμε την αποτελεσματικότητα των ορμονών για να προκαλέσουμε την τελική ωρίμανση και την ωοτοκία. Τέτοιες ορμόνες θα μπορούσαν να είναι οι εκλυτικοί παράγοντες των γοναδοτροπινών (GnRHs) σε συνδυασμό με αναστολείς της ντοπαμίνης (DA). Η χορήγηση τους θα μπορούσε να γίνει είτε με ένεση είτε με συστήματα βραδείας απελευθέρωσης (π.χ. εμφυτεύματα). Ωστόσο τα συστήματα βραδείας απελευθέρωσης έχουν αποδειχθεί πιο αποτελεσματικά από τις ενέσεις, στα είδη των ψαριών που δοκιμάστηκαν μέχρι σήμερα. Πάντως, μέχρι σήμερα η χρήση προγεστερόνης και HCG για την πρόκληση της ωοτοκίας στο χελόνι, είχαν μόνο μερική επιτυχία (μικρός αριθμός αποκρινόμενων θηλυκών, απρόβλεπτο ποσοστό επιτυχίας) και γι' αυτό δεν προτείνονται για τη μαζική παραγωγή αυγών σε συνθήκες αιχμαλωσίας.
3. Η κινητικότητα του σπέρματος του χελονιού ήταν χαμηλή (40%) και μειώθηκε σημαντικά κατά την διάρκεια της περιόδου σπερμίας (20%). Όμως η διάρκεια της κινητικότητας κυμάνθηκε σε φυσιολογικές τιμές και δεν μειώθηκε (1,46min). Αν και δεν γνωρίζουμε τα αίτια της χαμηλής κινητικότητας, μπορούμε να υποθέσουμε βάσιμα ότι μπορεί να οφείλεται σε ορμονικές διαταραχές (διαταραχές στην έκκριση προγεσταγόνων), στο σύντομο χρόνο παραμονής του σπέρματος στους σπερματογωγούς, στη γήρανση του σπέρματος ή και στην ακαταλληλότητα των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού (θερμοκρασία, αλατότητα, ωσμωμοριακότητα). Ωστόσο, ακόμα και με κινητικότητα της τάξης του 40% υπάρχει επαρκής

αριθμός σπερματοζωαρίων για την γονιμοποίηση των αυγών, αφού η μέση πυκνότητα του σπέρματος του χελονιού υπολογίστηκε σε  $20 \times 10^9$  σπερματοζωάρια ανά ml. Επιπλέον, στα πλαίσια μιας μελλοντικής εργασίας θα ήταν χρήσιμο να γίνει απόπειρα βελτίωσης της κινητικότητας του σπέρματος, με χορήγηση ορμονών και συγκεκριμένα του GnRH, ο οποίος έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός σε πολλά είδη ψαριών. Κατ' αντιστοιχία με τα θηλυκά άτομα, η χορήγηση του GnRH με συστήματα βραδείας απελευθέρωσης, αναμένεται να είναι πιο αποτελεσματική από τη χορήγηση με ενέσεις.

## 6. Βιβλιογραφία

### 6.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Aas GH, Refstie T, Gjerde B (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95: 125-132.
- 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.
- Alavi SMH and Cosson J (2005). Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, 29:101-110.
- Alavi SMH and Cosson J (2006). Sperm motility in fishes: (II) effects of ions and osmotic pressure: a review. *Cell Biology International*, 30: 1-14.
- Arabaci M and Sari M (2004). Induction of ovulation in endemic pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi*), living in the highly alkaline Lake Van, using GnRH<sub>a</sub> ([d-Ser(tBu)<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-NEt]-GnRH) combined with haloperidol. *Aquaculture*, 238: 529-535.
- Ben Khemis I, Zouiten D, Besbes R, Kamoun F (2006). Larval rearing and weaning of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) in mesocosm with semi-extensive technology. *Aquaculture*, 259: 190-201.
- Billard R (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Development*, 26:877-920.
- Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39: 65-79.
- Billard R, Cosson J, Crim LW, Suquet M (1995a). Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell, Oxford, pp. 25-52.
- Billard R, Cosson J, Perchec G. & Linhart O (1995b) Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.
- 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.
- Breton B, Weil C, Sambroni E, Zohar Y (1990). Effects of acute versus sustained administration of GnRH<sub>a</sub> on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 91: 371-383.
- Bromage N, Jones J, Randall C, Thrush M, Springate J, Duston J, Barker G (1992). Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141-166.
- Bromage N, Porter M, Randall C (2001). The environmental regulation of maturation in fanned finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*, 197: 63-98.
- Buyukhatipoglu S and Holtz W (1984). Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*, 37: 63-71.
- Cabrita E, Robles V, Herraes P (2009). *In Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. CRC Press Taylor & Francis Group.

- Cataudella S, Crosetti D, Massa F, Rampacci M (1988a). The propagation of juvenile mullet (*Chelon labrosus*) in earthen ponds. *Aquaculture*, 68: 321–323.
- Cataudella S, Massa F, Rampacci M, Crosetti D (1988b). Artificial reproduction and larval rearing of the thick lipped mullet (*Chelon labrosus*). *J. Appl. Ichthyol.*, 4: 130-139.
- Czerniejewski P, Keszka S, Rybczyk A. (2008). *Chelon labrosus* (Risso, 1827)–the first record from Lake Dabie (Poland). *Oceanologia*, 50:281–284.
- Chen YF (2005). Induced ovulation and embryonic development of ocellated puffer, *Takifugu ocellatus*. *J. Appl. Ichthyol.*, 21: 136–140.
- Chauvaud L, Cosson J, Suquet M, Billard R (1995). Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*: initiation of movement and changes with time of swimming characteristics. *Environmental Biology of Fishes*, 43: 341-349.
- Chervinski J (1977). Adaptability of *Chelon labrosus* (Risso) and *Liza saliens* (Risso) (Pisces, Mugilidae) to fresh water. *Aquaculture*, 11: 75-79.
- Ciereszko A and Dabrowski K (2000). In vitro effect of gossypol acetate on yellow perch (*Perca flavescens*) spermatozoa. *Aquatic Toxicology*, 49:181–187.
- Clearwater SJ and Crim LW (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.
- Cosson J (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12: 69–85.
- Crim LW, Sherwood NM, Wilson CE (1988). Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 74: 87–95.
- De Silva SS (1980). Biology of juvenile grey mullet: A short review. *Aquaculture*, 19: 21-36.
- Fauvel C, Savoye O, Dreanno C, Cosson J, Suquet M (1999). Characteristics of sperm of captive sea bass in relation to its fertilization potential. *J. Fish Biol.*, 54: 356– 369.
- Fostier A, Billard R, Breton B, Legendre M, Marlot S (1982). Plasma 11-oxotestosterone and gonadotropin during the beginning of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *General and Comparative Endocrinology*, 46: 428-438.
- Geffen AJ (1999). Variations in sperm motility of the Atlantic herring *Clupea harengus*. *Marine Biology*, 134: 637-643.
- Glubokov AI, Kouril J, Mikodina EV, Barth T (1994). Effects of synthetic GnRH analogues and dopamine antagonists on the maturation of Pacific mullet, Mugil so-iuy Bas. *Aquacult. Fish. Manage.*, 25: 419–425.
- Holland MC, Mylonas CC, Zohar Y (1996). Sperm characteristics of precocious 1-year-old male striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27: 208-212.
- Hotos GN, Vlahos N (1988). Salinity tolerance of *Mugil cephalus* and *Chelon labrosus* (Pisces: Mugilidae) fry in experimental conditions, *Aquaculture*, 167: 329-338.

- Haddy JA and Pankhurst NW (2000). The effects of salinity on reproductive development, plasma steroid levels, fertilisation and egg survival in black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Aquaculture*, 188:115–131.
- Ingermann R L, Bencic DC, Gloud JG (2002). Low seminal plasma buffering capacity corresponds to high pH sensitivity of sperm motility in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24:299–307.
- Kagawa H, Tanaka H, Ohta H, Unuma T, Nomura K (2005). The first success of glass eel production in the world: basic biology on fish reproduction advances new applied technology in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.*, 31: 193-199.
- Kokokiris L, Canario AVM, Mylonas CC, Pavlidis M, Kentouri M, Divanach P (2005). Induction of ovulation and spawning in the Mediterranean red porgy, *Pagrus pagrus*, by controlled delivery and acute injection of GnRH $\alpha$ . *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57: 223-230.
- Kraul S (1983). Results and hypotheses for the propagation of the grey mullet, *Mugil cephalus* L. *Aquaculture*, 30: 273-284.
- Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner, RA, (1996). Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 167–179.
- Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA, (1998). Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, 163: 163–181.
- Mananos E, Carrillo M, Sorbera LA, Mylonas CC, Asturiano JF, Bayarri MJ, Zohar Y, Zanuy S (2002). Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J. Fish Biol.* 60, 328–339.
- Mananos E, Duncan N, Mylonas CC (2008). Reproduction and control of ovulation, spermiation, nad spawning in cultured fish. *In: Cabrita E, Robles V, Herraes MP, (eds). Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 3-80.*
- Mazorra de Quero C, Shields RJ, Scott AP, Mylonas CC, Zohar Y, Bromage N, (2000). Effects of late season GnRH $\alpha$  implants on male Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* spermiation. Proceedings of the Aqua 2000, May 2– 6, Nice, France.
- Methven D.A. & Crim L.C. (1991) Seasonal changes in spermatocrit, plasma sex steroids, and motility of sperm from Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Sheffield, UK.
- Miura T., Kasugai T., Nagahama Y. & Yamauchi K. (1995) Acquisition of potential for sperm motility in vitro in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 61: 533:534.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261: 359-363.
- Mylonas C and Y Zohar (2001). Use of GnRH $\alpha$ -delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 463–491.

- Mylonas CC and Zohar Y (2007). Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin PJ, Cerda J, Lubzens E. (Eds.), *The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 433–470.
- Mylonas CC, Tabata Y, Langer R, Zohar Y (1995). Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone GnRH, for inducing ovulation and spermiation in fish. *J. Controlled Release*, 35: 23–34.
- Mylonas CC, Gissis 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 GnRH<sub>a</sub>-delivery system. *Aquaculture*, 153: 301– 313.
- Mylonas CC, Scott AP, Vermeirssen EL, 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 CC, Papadaki M, Divanach P (2003). Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research*, 34: 1161-1170.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S (2009). Broodstock management and hormonal manipulations of reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, doi:10.1016/j.ygcen., 2009.03.007
- Nagahama Y (1994) Endocrine control of gametogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 38: 217-229.
- Nash CE, Shehadeh ZH (1980). Review of the breeding and propagation techniques for grey mullet, *Mugil cephalus* L. ICLARM Studies and Reviews 3, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, 87 pp.
- Peter RE, Yu KL (1997) Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 7: 173-197.
- Pankhurst NW, Poortenaar CW (2000). Milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina* following treatment with exogenous hormones. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, 33: 141–159.
- Poortenaar CW, Pankhurst NW (2000a). Effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogue and human chorionic gonadotropin on ovulation, plasma and ovarian levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. *J. World Aquac. Soc.*, 31:175–185.
- Poortenaar CW, Pankhurst NW (2000b). Testosterone treatment augments LHRH-A induced ovulation in greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 33: 281–291.
- Rainis S, Mylonas CC, Kyriakou Y, Divanach P (2003). Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRH<sub>a</sub> implants. *Aquaculture*, 219: 873-890.
- Rana K (1995). Preservation of gametes. In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality (ed. by N.R. Bromage & R.J. Roberts), pp. 53-75. Blackwell Science, Oxford.
- Scott AP and Baynes SM (1980). A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 17:707-739.

- Sorbera LA, Mylonas CC, Zanuy S, Carrillo 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, Omnes MH, Normant Y, Fauvel C (1992). Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 101: 177-185.
- Weil C, Crim LW (1983). Administration of LHRH analogues in various ways: effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 35:103–115.
- Wirtz S and Steinman P (2006). Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis*. *Journal of Fish Biology*, 68:1896-1902.
- Van Look KJW and Kime DE (2003). Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology*, 63: 1020–1033.
- Vermeirssen ELM, Shields R, Mazonra de Quero C, Scott AP (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.
- Vladic T and Jarvi T (1997). Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout. The effect of water temperature. *Journal of Fish Biology*, 50:1088–1093.
- Wagner E, Arndt R, Hilton B (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methasulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, 211: 353–366.
- Zohar Y (1989). Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. In: M. Shilo and S. Sarig (eds). *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Florida. pp. 65-119.
- Zohar Y and Mylonas CC (2001). Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99–136.
- 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*. INRA Press, Paris, pp. 47–62.
- Zouiten D, Ben Khemis I, Besbes R, Cahu C (2008). Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in «mesocosms». *Aquaculture*, 279:166-172.

## 6.2. Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία

- Κλαδάς Γ (2006). Παραγωγή ιχθυδίων θαλασσιών ειδών: Διαχείριση γεννητόρων και παραγωγή αυγών στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς θαλασσιών Ειδών. Ηγουμενίτσα, σελ. 25.
- Μίνος Γ (2004). Βιολογία και συστηματική ιχθύων. Σημειώσεις (τεύχος πρώτο). Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, σελ. 55.
- Μίνος Γ (2008). Βιολογία και συστηματική ιχθύων. Σημειώσεις (τεύχος δεύτερο). Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, σελ. 157-162.



Τσίκληρας Α (2004). Βιολογία και δυναμική του πληθυσμού του ιχθύος *Sardinella aurita* Valenciennes, 1847 (φρίσσα) στον Κόλπο Καβάλας. Διδακτορική διατριβή. Θεσσαλονίκη. σελ. 35,56.

## 7. Περίληψη

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετήσει την εξέλιξη της ωρίμανσης θηλυκών γεννητόρων του χελονιού (*Chelon labrosus*), να διερευνήσει τη δυνατότητα φυσικής ωοτοκίας σε συνθήκες αιχμαλωσίας και να περιγράψει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος του. Για το λόγο αυτό στις 18/2/2009 (Ημέρα 0) συγκροτήθηκαν δύο πληθυσμοί γεννητόρων, με αναλογία φύλου 1:1 ( $n=12$  γεννήτορες ανά πληθυσμό, μέσο σωματικό βάρος 1Kg). Ο πρώτος πληθυσμός αφέθηκε ανενόχλητος να αναπαραχθεί ενώ στον δεύτερο λαμβάνονταν βιοψίες των ωοθηκών και δείγματα σπέρματος κάθε εβδομάδα και για μια περίοδο 7 εβδομάδων (55 ημέρες μετά την ημέρα έναρξης του πειράματος).

Σε κανέναν από τους δύο πληθυσμούς δεν υπήρξε ωοτοκία. Όμως, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση του μεγέθους των ωοκυττάρων από τα 730 $\mu\text{m}$  (Ημέρα 0) στα 925 $\mu\text{m}$  (48<sup>η</sup> ημέρα). Η μακροσκοπική εξέταση των ωοκυττάρων έδειξε ότι η λεκιθογένεση προχωράει κανονικά σε συνθήκες αιχμαλωσίας αλλά τα ωοκύτταρα δεν εισέρχονται στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης και στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου η ανάπτυξη τους διακόπτεται, μεταπίπτουν σε ατρητικά και αρχίζουν να απορροφούνται.

Κατά την έναρξη του πειράματος (18/2/2009), τα περισσότερα αρσενικά ήταν σε κατάσταση πλήρους σπερμίας (80%, στάδιο σπερμίας 3: άφθονο σπέρμα) και μάλιστα παρέμειναν σ' αυτό το στάδιο μέχρι το τέλος του πειράματος. Η μέση πυκνότητα του σπέρματος ήταν  $20,8 \times 10^9$  σπερματοζωάρια ανά ml σπέρματος αλλά ακολούθησε μια πτωτική πορεία, από τα  $31,6 \times 10^9$  σπερματοζωάρια (Ημέρα 0) σε  $9,1 \times 10^9$  σπερματοζωάρια ανά ml σπέρματος, στο τέλος της περιόδου σπερμίας. Όπως η πυκνότητα, έτσι και η κινητικότητα του σπέρματος εκτός του ότι ήταν χαμηλή (μέση κινητικότητα 33%) παρουσίασε πτωτική τάση κατά την περίοδο σπερμίας, αφού ξεκίνησε από την τιμή 42% την 7<sup>η</sup> ημέρα (D<sub>7</sub>) και έπεσε στην τιμή 18% (28<sup>η</sup> ημέρα). Μόνο η διάρκεια της κινητικότητας κυμαίνονταν σε φυσιολογικές τιμές (1,46min) συγκριτικά με άλλα είδη και επιπλέον παρέμεινε αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της περιόδου σπερμίας.

Οι προαναφερόμενες αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες είναι «αναμενόμενες» και παρατηρούνται σε γεννήτορες και άλλων εκτρεφόμενων ειδών. Η αντιμετώπιση τους θα μπορούσε να γίνει με χορήγηση ορμονών, οι οποίες έχουν δοκιμασθεί σε άλλα είδη και έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές, αφενός στην πρόκληση της ωοτοκίας και αφετέρου στη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπέρματος των γεννητόρων.

## 8. Abstract

Cultured thick lipped grey mullet, *Chelon labrosus*, females and males (n=24, sex ratio 1:1, mean weight 1Kg) were sampled on 18/2/2009 and every 1 week afterwards during a period of 55 days for oocytes and milt, in order to monitor changes in oogenesis and sperm quality parameters during a whole spawning period. No natural spawning was recorded. Vitellogenic oocytes increased their size from 730µm (Day 0) to 925µm (48<sup>th</sup> day) but they did not entered to final maturation and became atretic so no natural spawning was recorded. On 18<sup>th</sup> February 2009, 80% of the fish were spermiating, Sperm density showed a decreasing trend, with mean values ranging between 9.1 and 31,6 x 10<sup>9</sup> spermatozoa ml<sup>-1</sup>. Sperm motility percentage exhibited a significant decrease during the spawning season, with mean values ranging between 18 and 40%. The duration of forward motility was 1,46min and remained unchanged during the monitoring period. Thick lipped grey mullet does not spawn spontaneously under culture conditions and its sperm quality seemed to be low for an effective natural fertilization. These reproductive dysfunctions are common for fish reared in captive conditions. The application of an appropriate hormonal treatment could induce effectively spawning and sperm production of improved quality.