



**Πρωτόκολλο Πρόκλησης Γαμετοτοκίας στον Κρανιό (*Argyrosomus regius*)**



**Κωνσταντίνος Μυλωνάς**  
**Διευθυντής Ερευνών**  
**Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών**  
**Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών**  
**Ηράκλειο, Κρήτη**

**April 30, 2020**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Εισαγωγή</i>	<u>3</u>
<i>Αξιολόγηση αναπαραγωγικής ωριμότητας</i>	<u>5</u>
<i>Πρωτόκολλο πρόκλησης γαμετοτοκίας</i>	<u>11</u>

## Εισαγωγή

Ο κρυνιός (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) ανήκει στην Τάξη Perciformes, Οικογένεια Sciaenidae η οποία περιλαμβάνει 270 είδη. Το γένος *Argyrosomus* περιλαμβάνει οκτώ είδη. Ο κρυνιός συναντάται κατά μήκος των ακτών του Ανατολικού Ατλαντικού Ωκεανού και σε όλη τη Μεσόγειο, στο δυτικό άκρο της Μαύρης Θάλασσας και της Θάλασσας του Μαρμαρά, καθώς επίσης στις λίμνες του Δέλτα του Νείλου και από τις Bitter Lakes έως τη διώρυγα του Σουέζ. Είναι είδος που συναντάται σε παράκτιες περιοχές, από 15-200 μέτρα βάθος. Μπαίνει σε εκβολές ποταμών και παράκτιες λιμνοθάλασσες, ειδικά κατά την περίοδο της ωοτοκίας. Τρέφεται με ψάρια, κεφαλόποδα και καρκινοειδή που κολυμπούν. Τα νεαρά άτομα σχηματίζουν κοπάδια, ενώ τα ενήλικα συναντώνται απομονωμένα είτε σε μικρές ομάδες. Πρόκειται για είδος που περνά περιόδους της ζωής του και σε γλυκό και σε θαλασσινό νερό. Οι κρυνιοί μεταναστεύουν για να αναπαραχθούν, να τραφούν και να προφυλαχτούν από το κρύο.

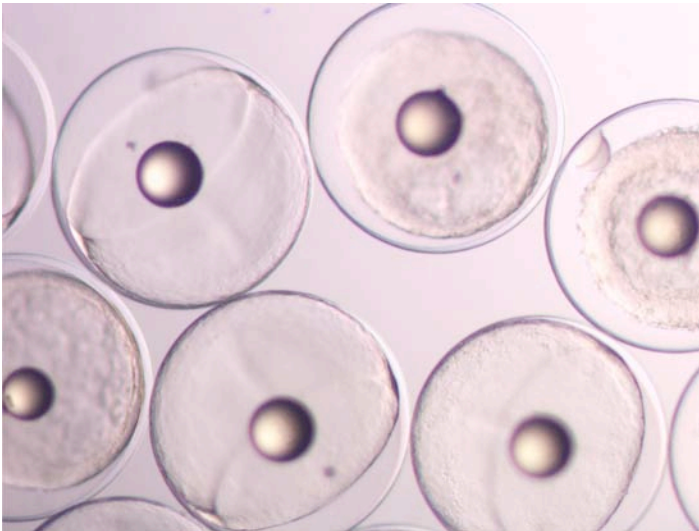
Μπορεί να φτάσει σε μέγεθος τα 140 cm, ίσως και τα 200 cm SL, με συχνότερη τιμή τα 50 cm. Η ανάπτυξη του είδους πραγματοποιείται κυρίως κατά τους θερινούς μήνες και φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια του χειμώνα δεν τρέφεται καθόλου. Η ανάπτυξη των νεαρών ατόμων είναι πολύ γρήγορη αφού μέχρι τον πρώτο χειμώνα της ζωής τους (περίπου 6 μηνών) αποκτούν κατά μέσο όρο μήκος 20cm και βάρος 50g, ενώ το δεύτερο χειμώνα 40cm και 1000g και τον τρίτο 55cm και 3000g. Η ανάπτυξή τους παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις ανάμεσα στα έτη, που οφείλονται στη θερινή θερμοκρασία και τη διαθέσιμη τροφή.

Ο κρυνιός είναι είδος γονοχωριστικό, χωρίς φυλετικό διμορφισμό (Εικόνα 1). Η αναπαραγωγική ωρίμανση πραγματοποιείται σε μέγεθος >5 Kg στα αρσενικά και >6 Kg στα θηλυκά, μεγέθη που επιτυγχάνονται τον 3 ή 4 χρόνο σε συνθήκες εκτροφής. Στην Φύση, αναπαράγεται από Απρίλιο έως Ιούλιο στην Νότια Μεσόγειο συνήθως σε εκβολές ποταμών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου της αναπαραγωγής, τα αρσενικά εκπέμπουν υπόκωφους κρωγμούς, που προέχονται από τη δράση των κοιλιακών μυών πάνω στα τοιχώματα της νυκτικής κύστης, παρόμοια με το συγγενικό μυλοκόπτι (*Umbrina cirrosa*) και συκιό (*Sciaena umbra*). Με βάση την δική

μας εμπειρία, η περίοδος αναπαραγωγής σε συνθήκες εκτροφής στην Ελλάδα είναι τον Απρίλιο-Μάιο, σε θερμοκρασίες 18-20°C. Η αναπαραγωγή γίνεται τις πρώτες πρωινές ώρες, όπως και στο λαβράκι. Ο κраниός είναι πολυ-εναποθέτης (multiple spawner) και γεννά 3-5 φορές κατά την αναπαραγωγική περίοδο. Τα αυγά είναι πελαγικά (με θετική πλευστότητα) διαμέτρου ~1 mm, με μία σταγόνα λιπιδίου (Εικόνα 2).



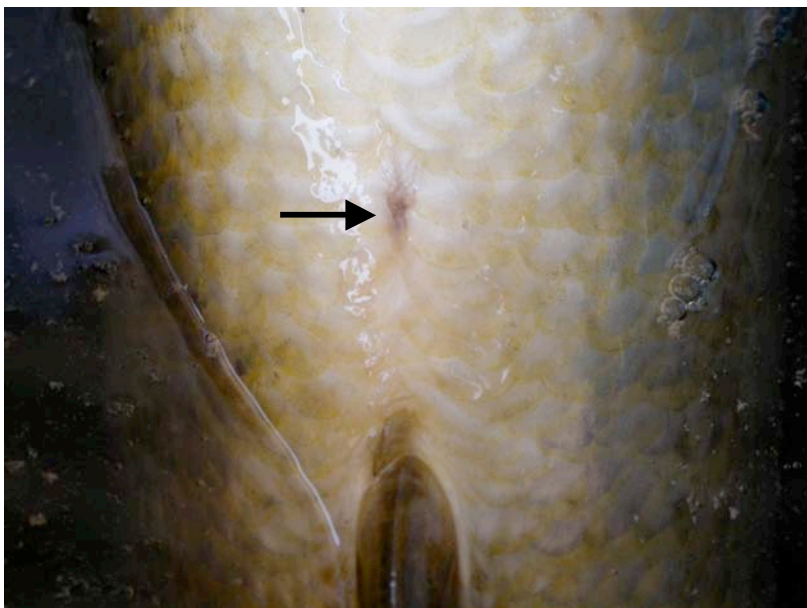
**Εικόνα 1.** Νεαρό άτομο κраниού (*Argyrosomus regius*). Η πλευρική γραμμή είναι ευδιάκριτη και σχηματίζει καμπύλη πάνω από την κοιλιακή χώρα.



**Εικόνα 2.** Γονιμοποιημένα αυγά κраниού.

## Αξιολόγηση αναπαραγωγικής ωριμότητας

Όπως λέχθηκε ήδη, ο κρανιός δεν παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό και η αναγνώριση του φύλου μπορεί να γίνει μόνο με λήψη βιοψίας από τις γονάδες. Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου τα ώριμα αρσενικά μπορούν να αναγνωριστούν από την απελευθέρωση σπέρματος μετά από ελαφρά κοιλιακή πίεση. Ο γενετικός πόρος στον κρανιό είναι πολύ κοντά στην έδρα και χρειάζεται προσοχή για την εισαγωγή του καθετήρα στις γονάδες (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Ο γενετικός πόρος ώριμου θηλυκού κρανιού (βέλος).

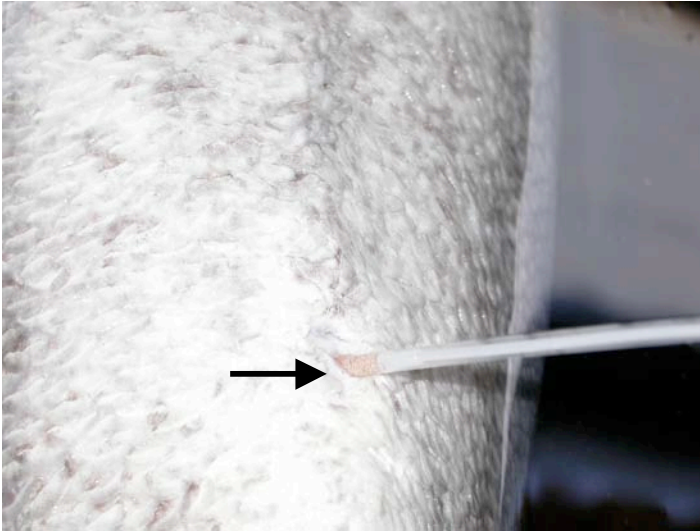
Για την λήψη βιοψίας τα ψάρια πρέπει να είναι τελείως αναισθητοποιημένα σε διάλυμα γαρυφαλέλαιου  $0.3-0.4 \text{ ml L}^{-1}$ , η φαινοξικής αιθανόλης  $3-4 \text{ ml L}^{-1}$ . Ο καθετήρας μπορεί να είναι πλαστικός με σφαιρικό τέρμα (Pipelle de Cornier) η γυάλινος μετά από ομαλοποίηση της άκρης του με φωτιά. Ο καθετήρας αρχικά τοποθετείται κάθετα προς τον επιμήκη άξονα του ψαριού, μπροστά από την ουρήθρα, δηλαδή στο κεντρικό μέρος του γενετικού πόρου (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Λήψη βιοψίας ωοθήκης από ώριμο άτομο βλάχου (*Polyprion americanus*) με χρήση γυάλινου καθετήρα ενωμένου με πλαστικό σωληνάκι.

Αφού γίνει η αρχική εισαγωγή μέσα στον γενετικό πόρο, τότε ο καθετήρας σπρώχνεται με πρόσθια κατεύθυνση και γωνιά 45 μοιρών προς τον επιμήκη άξονα του ψαριού. Ο καθετήρας εισάγεται περίπου 5-10 cm μέσα στην ωοθήκη και εφαρμόζεται κενό είτε χρησιμοποιώντας το πλαστικό έμβολο (Pipelle de Cornier), ή με αναρρόφηση στο σωληνάκι που είναι ενωμένο με τον γυάλινο καθετήρα (Εικόνα 4). Ο καθετήρας αφαιρείται προσεκτικά από την ωοθήκη χωρίς να βγεί από τον γενετικό πόρο, μέχρι που να διαπιστωθεί ότι έχει παρθεί βιοψία από την ωοθήκη. Τα ωοκύτταρα είναι ευδιάκριτα μέσα στον καθετήρα (Εικόνα 5), και η φάση της ωρίμανσης τους μπορεί να εκτιμηθεί σε πρώτη φάση από το χρώμα. Όσο πιά ανώριμα είναι τα ωοκύτταρα τόσο πιά σκούρο κίτρινο προς το πορτοκαλί θα είναι το χρώμα τους. Όσο κοντεύουν στο τέλος της λεκιθογένεσης το χρώμα τους θα γίνεται πιά ανοιχτό κίτρινο προς το άσπρο.

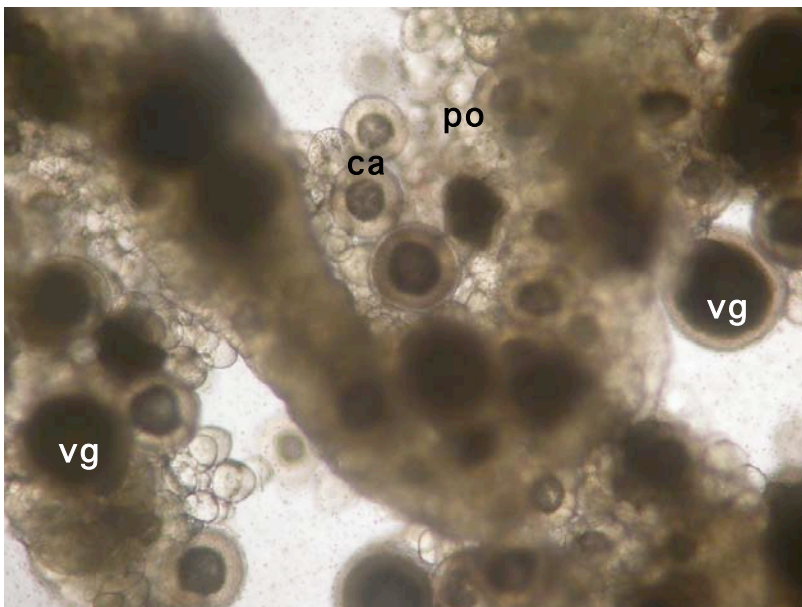
Για την αξιολόγηση της στο μικροσκόπιο, η βιοψία τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αναδεύεται με την χρήση μυτερού αντικειμένου, όπως υποδερμικής βελόνας (21-25G), ώστε να διασπαστεί ο σωματικός ιστός που κρατεί τα ωοκύτταρα και να μπορούν να διασπαρτούν στην αντικειμενοφόρο για αξιολόγηση. Μετά τοποθετείται φυσιολογικός ορρός και τα ωοκύτταρα αναδεύονται ξανά πριν γίνει αξιολόγηση τους σε μεγέθυνση 40X και 100X.



**Εικόνα 4.** Λήψη βιοψίας ωθήκης από ώριμο άτομο βλάχου (*Polyprion americanus*) με χρήση πλαστικού καθετήρα (Pipelle de Cornier). Φαίνονται τα ωκύτταρα στο εσωτερικό του καθετήρα.

Στην χαμηλή μεγέθυνση (40X) γίνεται ολική εκτίμηση της κατάστασης της ωθήκης παρατηρώντας το ποσοστό των ωκυττάρων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Χαρακτηριστικά είναι τα στάδια πρωτογενών ωκυττάρων ή πυρηνίσκων (perinucleolar stage, po), φλοιϊκών κυψελίδων (cortical alveoli, ca) και λεκιθογένεσης (vitellogenesis, vg) τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν τόσο από το μέγεθος των ωκυττάρων όσο και από το περιεχόμενό τους (Εικόνα 5). Όσο αναπτύσσονται τα ωκύττα προχωρώντας στην περίοδο της λεκιθογένεσης, τόσο πιά μεγαλά και πιά αδιαφανή γίνονται. Εάν η βιοψία της ωθήκης παρουσιάζει περισσότερα από μερικά πρωτογενή ωκύτταρα (Εικόνα 5), τότε μάλλον σημαίνει ότι το άτομο αυτό είναι αρκετά μακριά από το τελικό στάδιο της λεκιθογένεσης, κατά το οποίο θα ήταν δυνατή η πρόκληση της ωρίμανσης και γαμετοτοκία με την χρήση εξωγενών ορμονών. Εάν το η βιοψία πάρθηκε στην αρχή της αναπαραγωγικής περιόδου, τότε το ψάρι αυτό μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται αναπαραγωγικά και να είναι έτοιμο σε μεταγενέστερο ημερομηνία. Εάν όμως η δειγματοληψία έγινε στο μέσο της περιόδου φυσικής ωοτοκίας, ίσως σημαίνει ότι το ψάρι αυτό δεν θα ωριμάσει αυτή την χρονιά. Αυτό μπορεί να ωφείλεται στο ότι αυτή είναι η χρονιά της ήβης για το άτομο αυτό, ή ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ήταν σωστές.

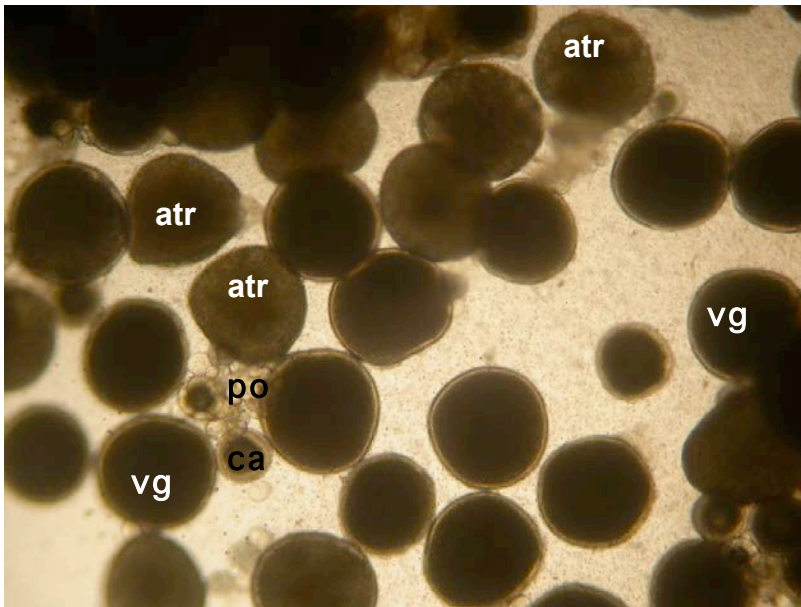




**Εικόνα 5.** Ανώριμο θηλυκό άτομο με ωκύτταρα στην αρχική φάση της λεκιθογένεσης (vitellogenesis, vg), με τον μεγαλύτερο πληθυσμό στο στάδιο των πρωτογενών ωκυττάρων ή πυρηνίσκων (perinucleolar stage, po) και φλοιϊκών κυψελίδων (cortical alveoli, ca).

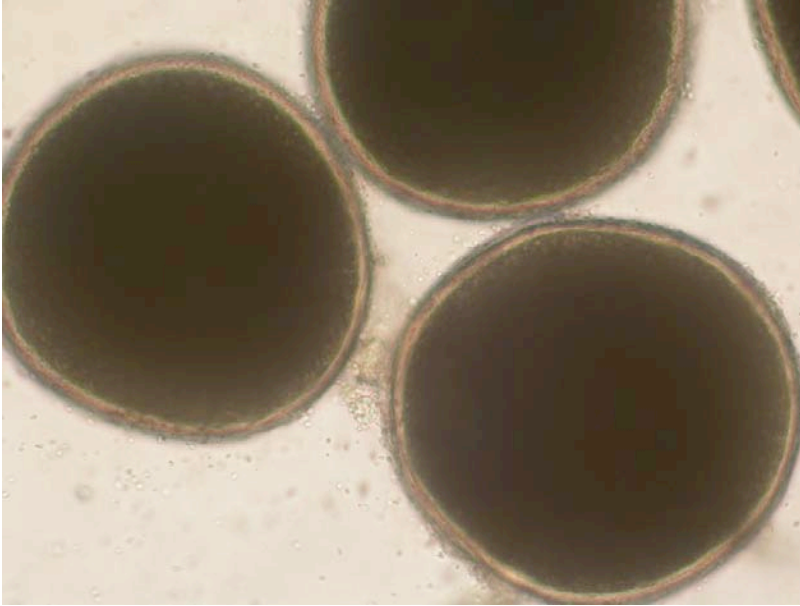
Αντίθετα, εάν το θηλυκό άτομο είναι σε φάση που μπορεί να αντιδράσει θετικά σε θεραπεία με εξωγενής ορμόνες, η βιοψία θα αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από λεκιθογενή ωκύτταρα διαφορετικών μεγεθών (Εικόνα 6). Μπορεί επίσης να περιέχει και ωκύτταρα σε φάση απόπτωσης (ατρησίας), η οποία είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία θανάτου και απορρόφησης των ωκυττάρων. Η παρουσία μερικών αποπτωτικών ωκυττάρων είναι απόλυτα φυσιολογική, νοούμενου ότι το ποσοστό δεν υπερβαίνει το 5-10% των λεκιθογενών ωκυττάρων. Εάν το ποσοστό είναι πολύ μεγαλύτερο, τότε το ψάρι αυτό έχει σταματήσει να υποστηρίζει την αναπαραγωγική διαδικασία και τα ωκύτταρα που φαινομενικά είναι υγιή έχουν αρχίσει την φάση της απόπτωσης κατά τα αρχικά στάδια της οποίας μόνο ιστολογικές και βιοχημικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώρισή της. Επίσης, μπορεί το ψάρι αυτό να μην έχει πλέον την ικανότητα να αντιδράσει σε οποιοσδήποτε εξωτερικές αναπαραγωγικές ορμόνες. Έτσι είτε δεν θα ωριμάσει και δεν θα γεννήσει, ή ο μικρός αριθμός αυγών που θα δώσει δεν θα είναι καλής ποιότητας.





**Εικόνα 6.** Βιοψία ωοθήκης από θηλυκό άτομο με ωοκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης και έτοιμα για την επαγωγή της ωρίμανσης, ωορρηξίας και (αν όλα πάνε καλά) ωοτοκίας. Φαίνονται επίσης ωοκύτταρα σε λιγότερο ώριμη φάση (πρωτογενή και φλοιικά κυστίδια), όπως και λεκιθογενή ωοκύτταρα σε φάση απόπτωσης (ατρησία, atr).

Στην υψηλή μεγέθυνση (100X) γίνεται εκτίμηση της κατάστασης των μεγαλύτερων λεκιθογενών ωοκυττάρων και του μεγέθους τους, αφού αυτό καθορίζει και τον βαθμό ωριμότητας τους (Εικόνα 7). Το σχήμα των ωοκυττάρων πρέπει να είναι σφαιρικό, η κυτταρική μεμβράνη και το ωοθυλάκιο παχύ και διαφανές. Το κυτταρόπλασμα πρέπει να είναι ομοιόμορφο, σκούρο και αδιαφανές. Επειδή όπως ειπώθηκε προηγουμένως ο κρυνιός είναι πολυεναποθέτης και γεννά περισσότερο από μία φορά κατά την αναπαραγωγική περίοδο, είναι απόλυτα φυσιολογικά να υπάρχουν λεκιθογενή ωοκύτταρα με αρκετά διαφορετικές διαμέτρους. Έτσι η αξιολόγηση του μεγέθους για την απόφαση αν το άτομο είναι έτοιμο να του δωθεί θεραπεία εξωγενών ορμονών βασίζεται στην διάμετρο των μεγαλύτερων ωοκυττάρων, τα οποία θα πρέπει να αποτελούν πέραν του 10% του ολικού αριθμού λεκιθογενών ωοκυττάρων. Στο τέλος της λεκιθογένεσης τα ωοκύτταρα του κρυνιού πρέπει να έχουν διάμετρο 550-600  $\mu\text{m}$ , και τότε είναι έτοιμα να ωριμάσουν μετά από ορμονική θεραπεία.



**Εικόνα 7.** Βιοψία ωθήκης από θηλυκό άτομο με ωκύτταρα στο τέλος της λεκιθογένεσης, και έτοιμα για την επαγωγή της ωρίμανσης, ωορρηξίας και (αν όλα πάνε καλά) ωοτοκίας. Διάμετρος ωκυττάρων 550-600  $\mu\text{m}$ . Η κυτταρική μεμβράνη και το ωοθυλάκιο είναι παχύ, το κυτταρόπλασμα ομοιόμορφο, σκούρο και αδιαφανές, και το σχήμα του ωκυττάρου σφαιρικό.

Η αξιολόγηση των αρσενικών γίνεται με την παρουσία σπέρματος μετά από απαλή κοιλιακή πίεση (Εικόνα 8). Για την συλλογή σπέρματος το αναισθητοποιημένο αρσενικό πρέπει να πληθεί για να αποφευχθεί η παρουσία αναισθητικού στο σπέρμα, και να στεγνωθεί με την χρήση πετσέτας για να αποφευχθεί η παρουσία νερού στο σπέρμα, το οποίο θα προκαλέσει άμεση ενεργοποίηση του σπέρματος πριν γίνει η αξιολόγηση του. Το σπέρμα φυλάσσεται σε ερμητικά κλειστό δοχείο σε θερμοκρασία  $+4^{\circ}\text{C}$ , μέχρι την αξιολόγηση του. Η αξιολόγηση σπέρματος περιλαμβάνει (α) εκτίμηση της πυκνότητας χρησιμοποιώντας κυτόμετρο (Newbauer, Tomas, η Malassez) η οποία είναι της τάξης των  $1 \times 10^9$  σπερματοζώαρια  $\text{ml}^{-1}$ , (β) εκτίμηση του ποσοστού αρχικής κινητικότητας η οποία πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 60-100% και (γ) εκτίμηση της διάρκειας πρόσθειας κίνησης η οποία στον κраниό είναι 1-2 min.



**Εικόνα 8.** Συλλογή σπέρματος από ώριμο άτομο βλάχου για σκοπούς αξιολόγησης και τεχνητής γονιμοποίησης.

### **Πρωτόκολλο πρόκλησης γαμετοτοκίας**

Η πρόκληση της ωοτοκίας γίνεται με την χρήση εμφυτευμάτων συνθετικής γοναδοεκλυτίνης (gonadotropin releasing hormone agonist, GnRHa), σε αρσενικά άτομα που είναι σε φάση σπερμίας, δηλ που απελευθερώνουν σπέρμα μετά από κοιλιακή πίεση, και σε θηλυκά άτομα με λεκιθογενή ωοκύτταρα διαμέτρου 550-600 μm. Για τα αρσενικά χρησιμοποιείται δόση  $\sim 25 \mu\text{g Kg}^{-1}$  και για τα θηλυκά  $\sim 50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , και είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη δόση χωρίς αρνητικές επιπτώσεις. Τα εμφυτεύματα τοποθετούνται υποδέρια-ενδομυϊκά με την χρήση βελόνας εσωτερικής διαμέτρου 2 mm, δηλαδή 12G (Εικόνα 9). Πρίν την εμφύτευση στο δέρμα τοποθετείται μικρή ποσότητα ιωδιούχου αλοιφής (betadine ointment), για μείωση του κινδύνου μόλυνσης του ψαριού (Εικόνα 10). Σε μεγάλα ψάρια με παχύ δέρμα και σκληρά λέπια, πρίν την εισαγωγή της βελόνας γίνεται κόψιμο του δέρματος με την χρήση μυτερού νυστεριού No 11 (Εικόνα 11). Το ψάρι πρέπει να είναι απόλυτα αναισθητοποιημένο και να ακινητοποιηθεί είτε στο νερό είτε έξω από το νερό πάνω σε μαλακό υπόστρωμα για να αποφευχθεί τραυματισμός του. Η βελόνα με το εμφύτευμα εισέρχεται στο σώμα το ψαριού με πρόσθια κατεύθυνση



**Εικόνα 9.** Εμφύτευση λαβρακιού (striped bass, *Morone saxatilis*) με εμφυτεύματα GnRHα. Το ψάρι βρίσκεται μέσα στην δεξαμενή αναισθησίας, αλλά θα μπορούσε να τοποθετηθεί σε τραπέζι, πάνω σε στρώμα από σφουγγάρι, και να ασφαλιστεί με βρεγμένη πετσέτα.

(πρός το κεφάλι, αντίθετα με την φορά των λεπιών), και όσο πιά επιφανειακά (δηλ υποδώρα) γίνεται, για να καταλήξει στο σημείο όπου υπάρχει ο κόκκινος μύς ο οποίος δέχεται περισσότερο αίμα από ότι ο λευκός μύς. Αφού εισαχθεί ολόκληρη η βελόνα, τότε πιέζεται το έμβολο για να βγάλει το εμφύτευμα από την βελόνα, μέσα στο σώμα του ψαριού. Εφαρμόζεται πίεση στο δέρμα με το δάχτυλο στο σημείο εισαγωγής της βελόνας και αφαιρείται η βελόνα. Το σημείο επαλείφεται με την ιωδιούχα αλοιφή που βρίσκεται ήδη στο σημείο, πάνω στο δέρμα του ψαριού. Το ψάρι τοποθετείται σε δεξαμενή με καθαρό νερό (χωρίς αναισθητικό) αφού πρώτα ξεπλυθούν τα βράγχια του με αρκετό καθαρό νερό μέχρι να ανακτήσει το αναπνευστικό ανακλαστικό και τα βραγχιακά καλύμματα να κινούνται.



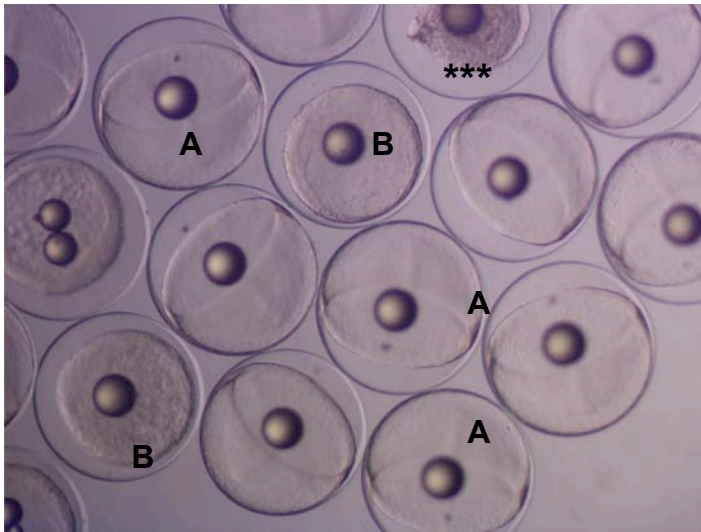


**Εικόνα 10.** Εμφύτευση βλάχου με εμφυτεύματα GnRHα. Το ψάρι βρίσκεται μέσα στην δεξαμενή αναπαραγωγής, αφού πρώτα αναισθητοποιήθηκε. Πρώτα τοποθετείται μικρή ποσότητα αλοιφής ιωδίου (Betadine ointment) στο δέρμα, στην περιοχή που θα τοποθετηθεί το εμφύτευμα (βέλος).



**Εικόνα 11.** Εμφύτευση βλάχου με εμφυτεύματα GnRHα. Το εμφύτευμα τοποθετείται δια μέσου της αλοιφής ιωδίου με σύριγγα 12 G (όπως τα PIT tags) μετά από κόψιμο του δέρματος με αιχμηρό νυστέρι No 11.

Η πρώτη ωοτοκία αναμένεται μετά από 48-72 h σε θερμοκρασίες 18-20°C. Η αναπαραγωγή γίνεται τις πρώτες πρωινές ώρες. Εάν τα θηλυκά είναι αρκετά ώριμα όταν τους δωθεί η ορμονική θεραπεία, τότε θα γεννήσουν περισσότερες από μία φορές σε διάρκεια 2-3 βδομάδων. Τα αυγά του κρανίου έχουν διάμετρο ~1 mm, με μία σταγόνα λιπιδίου και έχουν θετική πλευστότητα (Εικόνα 12). Η εκκόλαψη γίνεται σε 24-36 h, ανάλογα με την θερμοκρασία επώασης και 24 h μετά την γονιμοποίηση τα αυγά περιέχουν έμβρυα με καλά ανεπτυγμένα χρωματοφόρα (Εικόνα 13).



Εικόνα 12. Γονιμοποιημένα αυγά κρανίου σε δύο διαφορετικές φάσεις (A και B), όπως και ένα νεκρό αυγό (\*\*\*), πιθανώς μη γονιμοποιημένο.



Εικόνα 13. Αυγά κρανίου με έμβρυα 1 ημέρα μετά την γαμετοτοκία.

Έαν όλα εξελιχθούν καλά, τότε σε 2 ημέρες από την ωοτοκία θα εκκολαφθούν οι νύμφες (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Προνύμφη κρaniuού λίγο μετά την εκκόλαψη.

**Καλή επιτυχία!!!!!!!**