

**ιστολογική μελέτη  
της γεννητικής  
ωριμάνσης του  
Ρυπαζο ρυπαζο**

δρ παρπουρα α

δεικτακη ε  
χαλικια ι

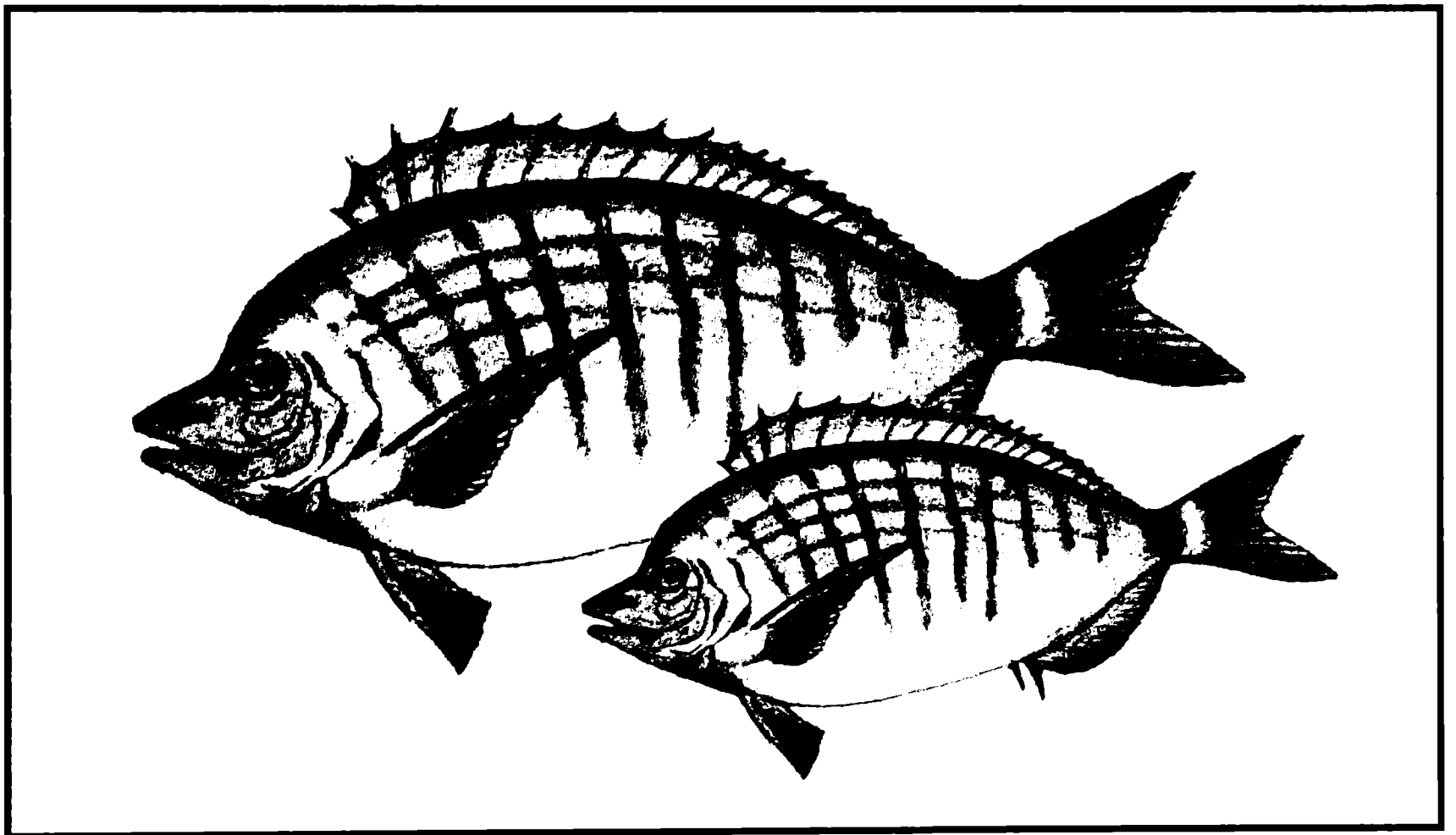




Αρ. 66 7 IS

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ: Ιστολογική μελέτη της γεννητικής ωρίμανσης του είδους *Puntazzo puntazzo* (GMELIN 1789)  
(Προκαταρκτικά αποτελέσματα)



Σπουδάστριες:  
Χαλικιά Ιωάννα  
Δεικτάκη Ειρήνη

Εγκρίνεται  
Α. Παπούρα

Εισηγήτρια:  
Άλκηστις Παπούρα





Τ.Ε.Ι ΜΕΣΣΟΛΟΓΓΙΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΟΥΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ

**ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΗΤΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ  
ΕΙΔΟΥΣ *PUNTAZZO PUNTAZZO* (GMELIN 1789)**

Πτυχιακή εργασία  
Δεικτάκη Ειρήνη  
Χαλικιά Ιωάννα

Εισηγητής:  
Dr Παρπούρα Άλκηστις

Σεπτέμβριος 2001







<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u>	ΣΕΛΙΔΑ
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	« 1
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u>	« 3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Συστηματική κατάταξη	« 3
2.Εξαπλωση	« 3
3.Μορφολογία	« 5
4.Βιολογία	« 6
5.Αναπαραγωγή ψαριών	« 6
<i>Trachurus trachurus</i>	
<i>Pagrus pagrus</i>	«
	«
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	« 37
2.1.Μονιμοποίηση	« 38
2.2Επεξεργασία των ιστών στην Ιστοκινέτα και τον μικροτόμο	« 38
2.3.Χρώσεις: αιματοξυλίνη-εωζίνη	« 44
2.4 Εκτίμηση ιστολογικών τομών	« 46
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</u>	« 51
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Μεγέθη και κατανομή ωοκυττάρων	« 53
3.2 Ωρίμανση γονάδας	
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</u>	« 71
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
4.1 Ερμαφροδιτισμός	« 71
4.2 Ωοκύτταρα	« 72
4.3 Ατρησία	« 73
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	« 77
ABSTRACT	« 78
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	« 79







## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας υπήρξε πολύτιμη η βοήθεια μιας πληθώρας ατόμων στους οποίους θα θέλαμε να εκφράσουμε την αστείρευτη ευγνωμοσύνη μας.

Αρχικά ευχαριστούμε θερμά τους γονείς μας για την υλική αλλά και ηθική υποστήριξη, την υπομονή και την κατανόηση που μας έδειξαν όχι μόνο κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά καθ' όλη την περίοδο των σπουδών μας.

Εν συνεχεία να ευχαριστήσουμε την εισηγήτρια της εργασίας Dr. Παρπούρα Άλκηστη για την ακούραστη προσπάθεια της να επιλύσει κάθε μας πρόβλημα καθώς και για την ουσιαστική συμμετοχή της στην πραγμάτωση της πτυχιακής μας ακόμα και σε περιόδους ιδιαίζουσας δυσκολίας.

Ομοίως να ευχαριστήσουμε τις Ιχθυοκαλλιέργειες Ρ. Παρπούρα για την παραχώρηση των δειγμάτων.

Ευχαριστούμε επίσης το Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου για την υλικοτεχνική και οικονομική υποστήριξη. Ιδιαίτερος να απευθύνουμε τις ευχαριστίες μας στον κ. Βορεινάκη Θεοφάνη, για την παραχώρηση των εργαστηρίων Ιχθυοπαθολογίας και Ιστολογίας καθώς και για την συχνότατη και χρήσιμη επέμβαση του.

Τέλος, οφείλουμε να αναφέρουμε το προσωπικό του νοσοκομείου Αγρινίου για την προσφορά του στην εκμάθηση της ιστολογικής τεχνικής καθώς και το νοσοκομείο Κορίνθου για την ανιδιοτελή παραχώρηση αναλώσιμων υλικών.





Στον Θύμιο ...

Στον Σταύρο...





# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**





## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Το είδος *Puntazzo puntazzo* (κ.ν μυτάκι ή σουβλομύτης ή χιόνα) ανήκει στην οικογένεια Sparidae, η οποία περιλαμβάνει 100 περίπου είδη, 24 από τα οποία απαντώνται στον ελληνικό χώρο (Ondrias, 1971; Χριστοδούλοπούλου και Αθανασόπουλος, 1992)

Η συστηματική κατάταξη του *Puntazzo puntazzo* είναι η εξής:

Τάξη : Perciformes

Οικογένεια: Sparidae

Γένος: *Puntazzo*

Είδος: *Puntazzo puntazzo*

Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Gmelin (1789) ο οποίος του έδωσε την ονομασία *Sparus puntazzo*. Είναι συνώνυμο με τα είδη: *Sparus acutirostris* Deloroche, 1809, *Charax puntazzo* Valenciennes, 1830, *Sagrus puntazzo* Steinbchner, 1867, *Puntazzo puntazzo* Fowler, 1936, *Diplodus puntazzo* Bauchot and Hureau, 1986 (Papaconstantinou, 1988)

### 1.2 ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Απαντάται στην Μεσόγειο και τον Ανατολικό Ατλαντικό, στα Κανάρια νησιά, στα στενά του Γιβραλτάρ και στη Μαύρη θάλασσα. Στις ελληνικές θάλασσες έχει παρατηρηθεί από πολλούς ερευνητές στο Αιγαίο: Κυκλάδες, Τήνος, Δωδεκάνησα : Ρόδος, στο Β. Αιγαίο: Αλεξανδρούπολη, Καβάλα, στο Σαρωνικό, στον Ευβοϊκό και τον Παγασητικό Κόλπο, τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου και τον Πατραϊκό (Papaconstantinou, 1988).









### 1.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Το μυτάκι έχει σώμα ωσειδές και το μήκος του κυμαίνεται μεταξύ 30-40 cm (Χριστοδουλοπούλου και Αθανασόπουλος, 1992, Κριμπένη 1994, Παρπούρα, 1998). Έχει ρύγχος οξύληκτο και προτεταμένο στόμα, αρκετά μικρό που φέρει 8 ισχυρά δόντια σε κάθε γνάθο, τα οποία είναι αιχμηρά και κεκλιμένα προς τα εμπρός (Κριμπένη, 1994). Το ανώτερο προφίλ του κεφαλιού εμφανίζει κοίλωμα. Η πλευρική γραμμή καλύπτεται από 50-60 λέπια, είναι καλά σχηματισμένη και συνεχής που φτάνει μέχρι τη βάση του ουραίου περυγίου. Το ουραίο περύγιο είναι λιγότερο ή περισσότερο διχαλωτό. Τα λέπια είναι κυκλοειδή και κτενοειδή. Οι βραγχιακές άκανθες είναι πολύ κοντές και κυμαίνονται μεταξύ 7-10.

Το χρώμα είναι γκρι-ασημί με 7-10 μαύρες και κάθετες λωρίδες. Στον ουραίο μίσχο υπάρχει μια μαύρη κηλίδα. Τα περύγια είναι γκρι ενώ τα θωρακικά, τα κοιλιακά και το ουραίο εμφανίζουν μαύρη άκρη.







## 1.4 Βιολογία

Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής (Σεπτέμβριος- Νοέμβριος), το ανώτερο τμήμα του κεφαλιού γίνεται γκρι-μπλε. Στην περιοχή που βρίσκεται κοντά στα μάτια, εμφανίζεται μια έντονη καφέ λωρίδα, λεπτή μπροστά και φαρδιά προς τα πίσω (Luther and Fiedler, 1982).

Έχει αναφερθεί ότι το ενήλικο μυτάκι περιλαμβάνει στην διατροφή του σημαντικό ποσοστό φυτικής ύλης (Luther and Fiedler, 1982). Μελέτη που έγινε στο στομαχικό περιεχόμενο νεαρών ατόμων, ηλικιακής κλάσης 0+ και έδειξε 91% κωπήποδα και οι υπόλοιπες ταξινομικές ομάδες ήταν 4,3 % αμφίποδα, 3,9 % οστρακώδη, 0,4% πολύχαιτοι και 0,3% νηματώδεις (Cecares et al., 1984).

Έρευνα που διεξήχθη σε είδη της οικογένειας Sparidae και Serranidae έδειξε ότι το μυτάκι διαθέτει 7-8 πυλωρικά τυφλά σε αντίθεση με την τσιπούρα που φέρει 4, γεγονός που δείχνει τον φυτοφάγο-παμφάγο χαρακτήρα του ψαριού αυτού. Στην ίδια έρευνα που αφορούσε συγκριτικές παρατηρήσεις στις λιποπρωτείνες του πλάσματος υποστηρίζεται ότι οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ειδών καθορίζονται από τις διατροφικές τους συνήθειες, τόσο στην απορρόφηση των λιπών όσο και στο ρυθμό της διαδικασίας ωρίμανσης των λιποπρωτεϊνών. (Santulli et al. 1991).

## 1.5 Αναπαραγωγή ψαριών

Γενικά τα ψάρια έχουν ένα ζευγάρι διπλευρών γονάδων που αναρτώνται από το ραχιαίο τμήμα της σωματικής κοιλότητας, το μεσοωθήκιο για το θηλυκά και το μεσοόρχεο για τα αρσενικά. Η ανάπτυξη των γονάδων είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με τα νεφρά και τους ωαγωγούς τους.

Στην αρχή της οντογένεση εμφανίζονται σαν ένα ζευγάρι που σχηματίζει τη γενετική ακρολοφία (ridge) αποτελούμενη από τα πρωτογενή κύτταρα σπέρματος και τον συνδετικό ιστό γύρω από αυτά.

Το πρωταρχικό σπερματικό κύτταρο είναι αρκετά μεγάλο και ελαφρώς ωοειδές με ένα μεγάλο σφαιροειδή πυρήνα που περιέχει ένα εξίσου μεγάλο πυρηνίσκο. Ακόμα και σε αναπτυγμένη κατάσταση η γενετική ακρολοφία των κυκλόστομων και τελεόστεων



αποτελεί μόνο ένα μέρος σε σχέση με το φλοιό των άλλων σπονδυλωτών.

Με τον πολλαπλασιασμό των πρωταρχικών κυττάρων, οι γονάδες καθώς αυξάνουν διαφοροποιούνται σχηματίζοντας το αρσενικό και θηλυκό φύλο.

Στη συνέχεια περιγράφεται ενδεικτικά η διαδικασία ωογένεσης για το *Trachurus trachurus* και η σπερμιογένεση για το *Pagrus pagrus*, ώστε να περιγραφούν τα στάδια που γενικά παρατηρούνται στις γονάδες των θαλασσινών ψαριών.

### **Ωογένεση στο *Trachurus trachurus***

Σύμφωνα με ιστολογικές μελέτες στο *Trachurus trachurus* η ωογένεση χαρακτηρίζεται από δύο φάσεις, την πρωτογενή (primary) και τη δευτερογενή αυξητική φάση (secondary growth phase) (Wallace & Selman 1981; Specker et al 1987; Mayer et al 1988)

#### **Πρωτογενής αυξητική φάση**

##### **α. ωογονία**

Παρουσιάζονται ως μικρά στρογγυλά κύτταρα διαμέτρου 10-20μm έντονα βασεόφιλικά με ομοιογενή υφή χωρίς εμφανείς πυρήνες (εικ 1.1)

##### **β. Στάδιο πυρηνίσκου (Chromatin nucleus stage)**

Τα ωοκύτταρα (διαμ. 20-30μ) έχουν μεγάλο στρογγυλό πυρήνα λιγότερο βασεοφιλικό από το περιβάλλον κυτόπλασμα. Γύρω από τον πυρήνα το κυτόπλασμα φαίνεται ως μια λεπτή κυτοπλασματική ζώνη (Mayer et al, 1988). Στον πυρήνα αναγνωρίζονται ως τρεις έντονα βασεόφιλοι πυρηνίσκοι (εικ. 1.1).

##### **γ. Περιπυρηνισκικό στάδιο (Perinucleus stage)**

Η ωοθήκη οργανώνεται σε εγκάρσια προς το τοίχωμα της, ωοφόρα ελάσματα κατευθυνόμενα προς το κέντρο της, στην επιφάνεια των οποίων παρουσιάζονται πολυγωνικά ωοκύτταρα ως 60μ. Στον πυρήνα οι πυρηνίσκοι είναι περιφερειακοί ενώ το κυταρόπλασμα παραμένει έντονα βασεοφιλικό.

Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης (το ωοκύτταρο καθώς μεγαλώνει χάνει το πολυγωνικό του σχήμα και το κυταρόπλασμα βάφεται ελαφρώς ασθενέστερα) το βασεοφιλικό υλικό





συγκεντρώνεται στο περιπυρηνικό κυτόπλασμα ενώ στο τέλος του σταδίου αυτού το πλέγμα των χρωμοσωμάτων είναι πολύ έντονο.

Το περιπυρηνισκικό στάδιο είναι το στάδιο ουσιαστικά που χαρακτηρίζει τα κύτταρα αδράνειας. Στις εικόνες 1.2 και 1.3 φαίνεται η ωθήκη καθώς και λεπτομέρειες της ωθήκης με τα ωκύτταρα, ώριμα ωκύτταρα με κυτταρόπλασμα με κενοτόπια και ο συνδετικός ιστός.

### **Δευτερογενής αυξητική φάση**

Σ' αυτή τη φάση ένας αριθμός πρωτογενών ωκύτταρων εισέρχεται στον κύκλο της λεκιθογένεσης. Ανάλογα με το αν η λέκιθος σχηματίζεται ενδογενώς ή εξωγενώς, η φάση χωρίζεται στην εξωγενή και ενδογενή λεκιθογένεση

#### **α.Ενδογενής λεκιθογένεση**

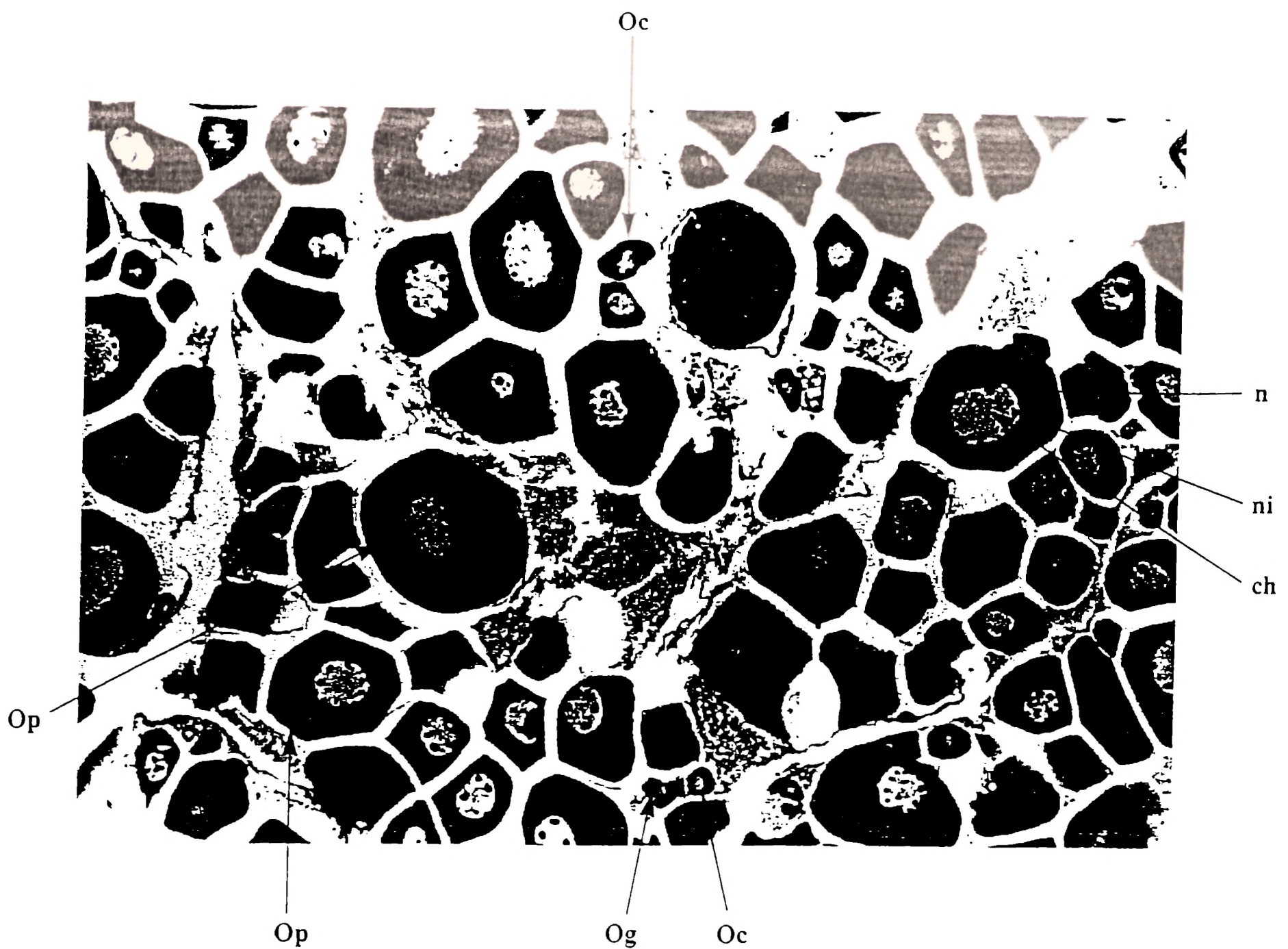
Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση λιπιδικών λεκιθικών σταγονιδίων (lipids droplets ή yolk vesicles), τα οποία δεν χρωματίζονται από τη χρώση H+E. Στις ωθήκες του *T. Trachurus* τα λιπιδικά σταγονίδια εμφανίζονται περιφερειακά του κυτοπλάσματος ή περιπυρηνικά. Τα ωκύτταρα μεγαλώνουν και φτάνουν τα 250μ, ενώ τα σταγονίδια πολλαπλασιάζονται καλύπτοντας όλο το κυτόπλασμα. Το επιθήλιο είναι μια χαρακτηριστικό αποτελούμενο από δυο στοιβάδες κυττάρων, την εσωτερική με αραιά βελονόμορφα κύτταρα (granulosa cells) και την εξωτερική αποτελούμενη από μακρόστενα κύτταρα καλούμενα από δω και στο εξής κύτταρα θήκης (thecal cells). Μεταξύ των κυττάρων της θήκης παρεμβάλλονται τα τριχοειδή αγγεία. Συγκεκριμένα, στις ιστολογικές τομές του *T. Trachurus* παρατηρήθηκαν τρεις πιθανοί τρόποι ανάπτυξης και διάταξης των λιπιδικών σταγονιδίων (ξεκινώντας πάντα από μέγεθος ωκύτταρων 150μ).

Σύμφωνα με τον 1<sup>ο</sup> τρόπο τα λιπιδικά σταγονίδια παρουσιάζονται στην περιφέρεια του κυτοπλάσματος και μετακινούνται προς τον πυρήνα, καθώς αυξάνονται. Ο πυρήνας κάνει το στρογγυλό του σχήμα.(Εικ.1.4<sup>α</sup>).

Σύμφωνα με το 2<sup>ο</sup> τρόπο τα λιπιδικά σταγονίδια εμφανίζονται περιφερειακά και αρχίζει αμυδρά η εξωγενής λεκιθογένεση.(Εικ.1.4<sup>β</sup>).

Σύμφωνα με τον 3<sup>ο</sup> τρόπο τα λιπιδικά σταγονίδια εμφανίζονται γύρω από τον πυρήνα, μεγαλώνουν ακόμη περισσότερο ενώ στην περιφέρεια παρουσιάζεται μια στεφάνη αποτελούμενη από ακρωματικούς σωλήνες και μικρά σταγονίδια.(Εικ.1.4<sup>γ</sup>).





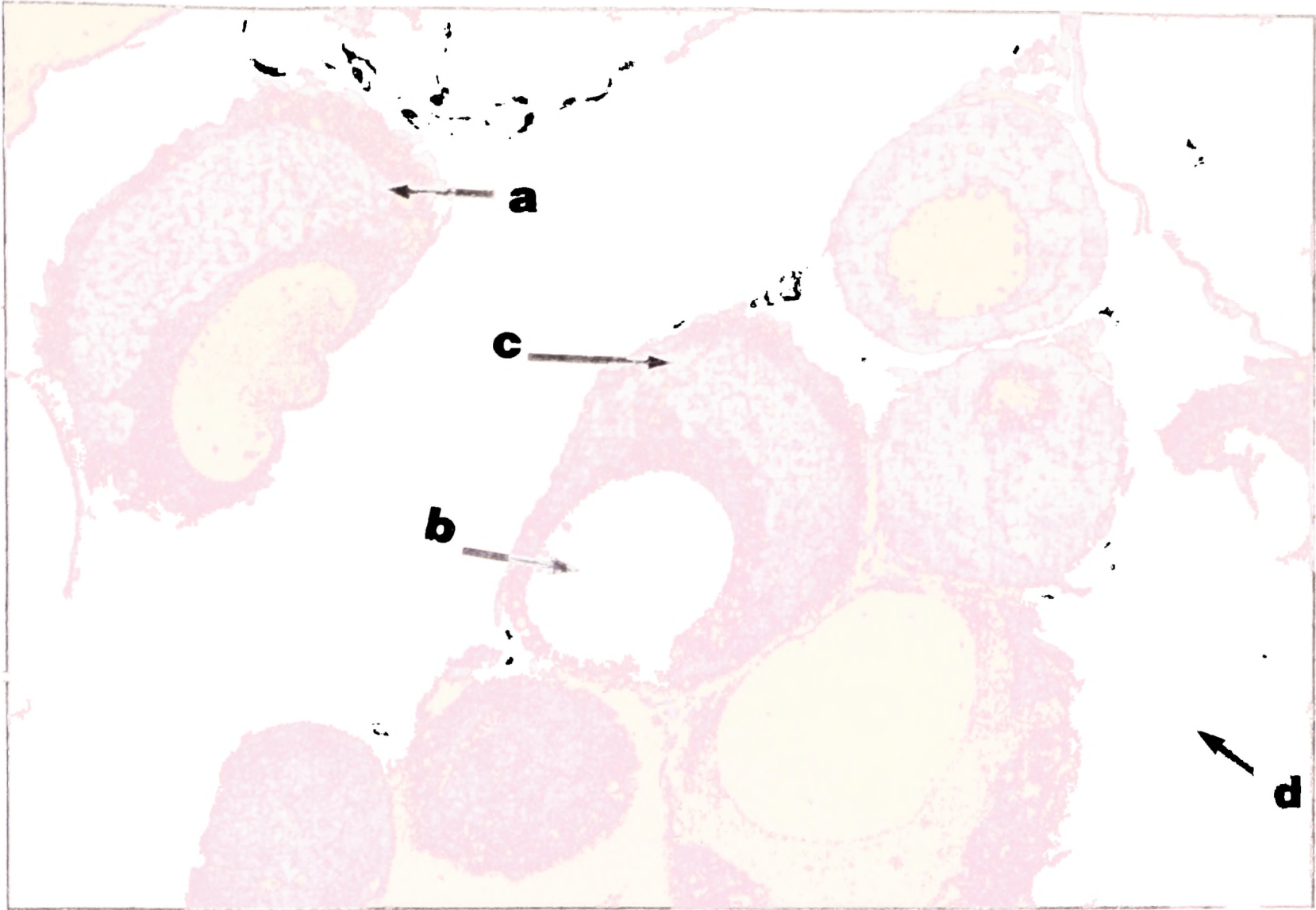
Εικ 1.1 Ωοκύτταρα του *Trachurus trachurus* στο στάδιο του πυρηνίσκου (Op) και στο περιπυρηνισκικό στάδιο (Op), n=πυρήνας, ni= πυρηνίσκοι, ch= χρωμοσώματα

## β. Εξωγενής λεκιθογένεση

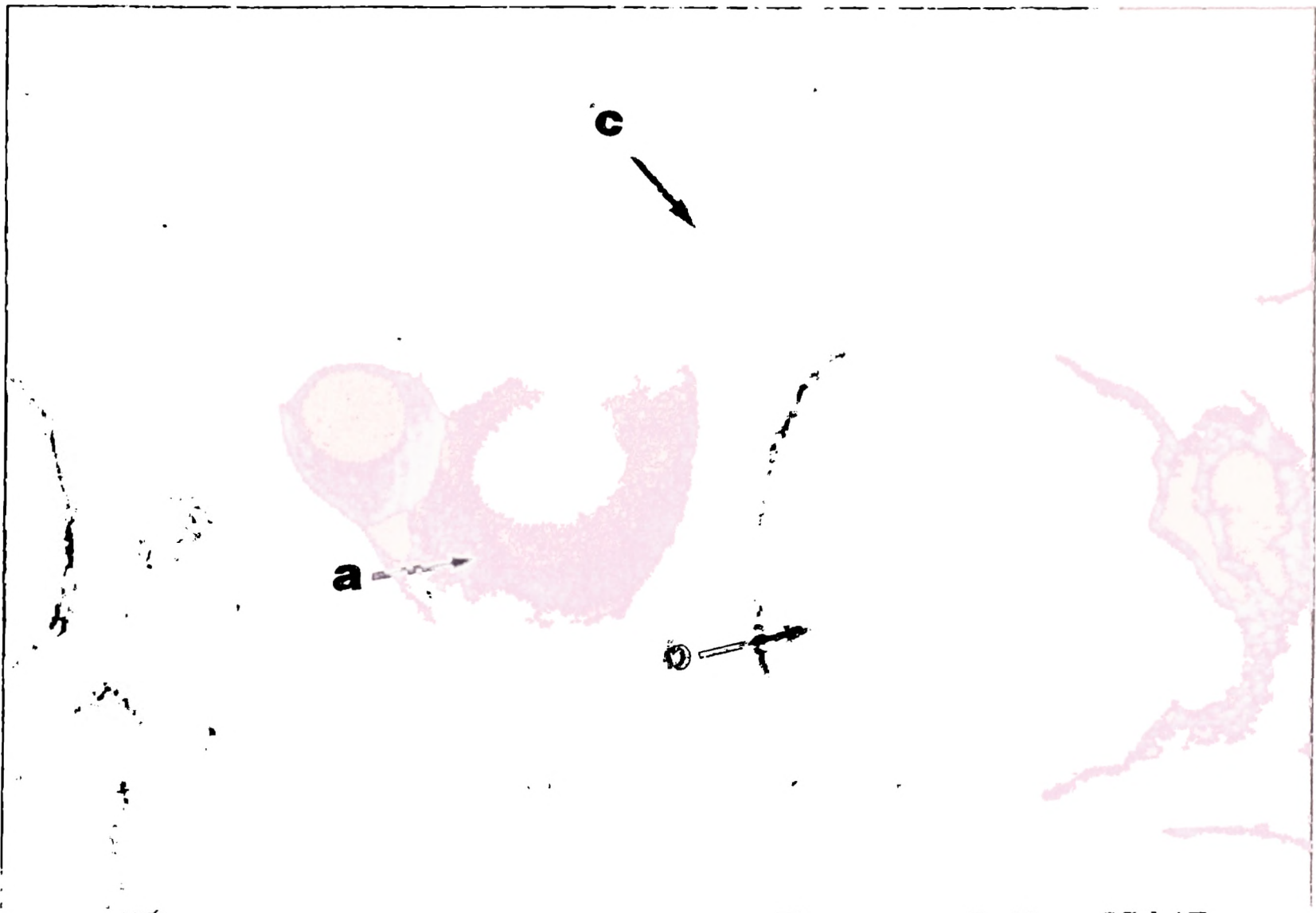
Αυτοραδιογραφικές μελέτες (Wallace & Selman 1981) έχουν αποδείξει ότι η λεκιθογενίνη μεταφέρεται από το συκώτι στο αίμα και συγκεντρώνεται στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου. Τα λεκιθικά ηωσινικά κοκκία αρχίζουν να εμφανίζονται περιφερειακά. Το μέγεθος του ωοκυττάρου κυμαίνεται από 250 ως 300μ, ενώ το ωοκύτταρο έχει σαφή κυτταρική μεμβράνη και επιθήλιο. Όταν το ωοκύτταρο φτάσει τα 400μ η κυτταρική μεμβράνη διακρίνεται σε εξωτερική λεπτή και βασεοφιλική και εσωτερική λιγότερο βασεοφιλική, αλλά φαρδύτερη. Ο πυρήνας έχει διάμετρο 130μ. Τα λεκιθικά κοκκία μεγαλώνουν και καλούνται πλέον σφαιρίδια.





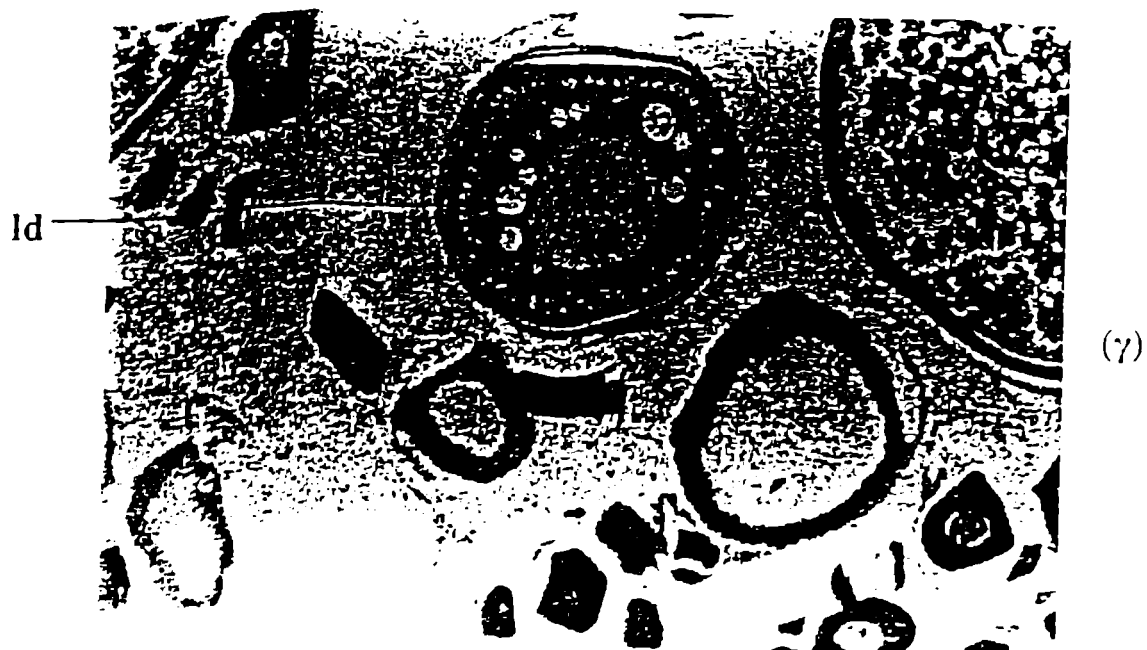
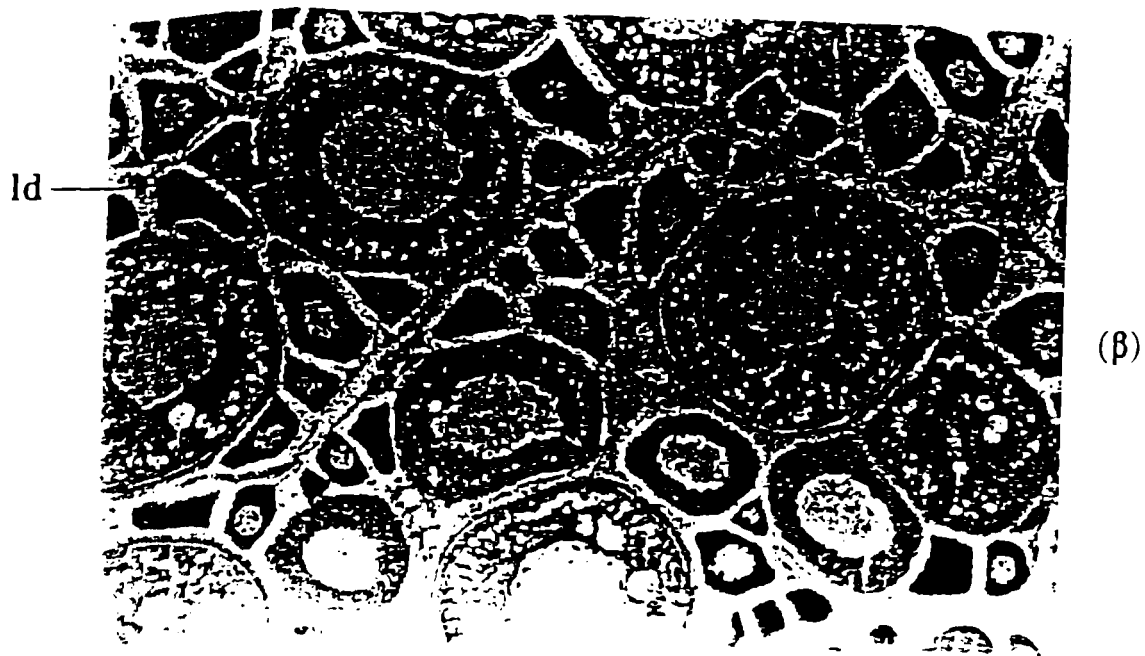


Εικ 1.2 Ωοθήκη: a) Ωοκύτταρο b) Πυρήνας c) Κυτταρόπλασμα d) Συνδετικός ιστός



Εικ. 1.3: Λεπτομέρειες της Ωοθήκης: a) Ωοκύτταρο b) Ωριμο ωοκύτταρο με κυτταρόπλασμα με κενोटόπια c) Συνδετικός ιστός





Εικ 1.4: Ενδογενής λεκιθογένεση και τρόποι διάταξης των λιπιδικών σταγονιδίων (ld) στα ωκύτταρα του *Trachurus trachurus*, με τη μορφή δύο στεφανών μιας περιφερειακής και μιας περιπυρηνικής (α) ή μιας στεφάνης περιφερειακής (β) ή μιας περιπυρηνικής (γ).





Σε μέγεθος ωοκυττάρων 450-500μ εμφανίζεται η ακτινωτή ζώνη (zona radiata ή ZR)

Σε μέγεθος 600μ τα λιπιδικά σταγονίδια είτε είναι μικρά και διάσπαρτα είτε μεγάλα και συγκεντρωμένα γύρω από τον πυρήνα. Η λεκιθογένεση έχει ολοκληρωθεί και ακολουθεί η ωρίμανση με τελικό στάδιο την ενυδάτωση του ωοκυττάρου.(Εικ.1.5).

### **γ. Ωρίμανση**

Ωρίμανση του ωοκυττάρου σημαίνει συγχώνευση των λεκιθικών σφαιριδίων και μετατόπιση του πυρήνα προς το ζωικό πόλο. Ακολουθεί αυθόρμητη είσοδος νερού στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα αύξηση του όγκου, "τέντωμα" των κυττάρων του επιθηλίου και την εμφάνιση της λεπτής ιώδους κυτταρικής μεμβράνης (χορίο), από την οποία λείπουν οι ακτινωτές διατάξεις. Τα κοκκιόμορφα κύτταρα του επιθηλίου φαίνονται ως μακρά τετράγωνα ενώ τα κύτταρα θήκης παρουσιάζονται στην τομή πολύ συρρικνωμένα (Hunter et al, 1985). Το ωοκύτταρο είναι έτοιμο να απελευθερωθεί στο περιβάλλον.

Σύμφωνα με τον 1<sup>ο</sup> τρόπο δημιουργούνται λεκιθικές πλάκες (yolk plates) από τη συγχώνευση των λεκιθικών σφαιριδίων και μεγάλες ελαιοσταγόνες (oil droplets) από τα λιπιδικά σταγονίδια. Ο πυρήνας αρχίζει να μετατοπίζεται, οι ελαιοσταγόνες συγκεντρώνονται στην αντίθετη κατεύθυνση της μετατόπισης μέχρι που ο πυρήνας αρχίζει να διαλύεται (εικ.1.6<sup>α</sup>) και οι λεκιθικές πλάκες ενυδατώνονται.(Εικ.1.6β).

Σύμφωνα με τον 2<sup>ο</sup> τρόπο σχηματίζονται οι ελαιοσταγόνες γύρω από τον πυρήνα και αρχίζει ελαφρά μετατόπιση του πυρήνα συμπαρασύροντας τις ελαιοσταγόνες, οι οποίες συγκεντρώνονται και πάλι στο αντίθετο άκρο του. Τα λεκιθικά σφαιρίδια δημιουργούν μεγάλες διαθλαστικές σφαίρες (refractives globules), ενώ αρχίζει η διάλυση του πυρήνα.(Εικ.1.7<sup>α</sup>). Οι σφαίρες ενυδατώνονται και τέλος αλλάζουν σχήμα παίρνοντας το χαρακτηριστικό των ενυδατωμένων πλακών (hydrates plates).(Εικ.1.7β). Η κυτταρική μεμβράνη παίρνει κυματοειδή μορφή και αρχίζει ελαφρά αποκόλληση του επιθηλίου.(Εικ.1.7γ,1.7δ).

### **Ιστολογική ταξινόμηση θηλυκών**

Τα θηλυκά σύμφωνα με τα ιστολογικά κριτήρια ταξινομούνται σε ώριμα και ανώριμα για κάθε αναπαραγωγική περίοδο.



**Ανώριμα.** Άτομα τα οποία είχαν ωογόνια ή κύτταρα στο στάδιο πυρηνίσκου και στο περιπυρηνισκικό στάδιο χωρίς κανένα ίχνος ατρησίας.

**Ώριμα.** Τα ώριμα διακρίθηκαν σε δραστήρια και μη δραστήρια άτομα.

**Δραστήρια.** Άτομα που είχαν ενυδατωμένα ωοκύτταρα ή ωοκύτταρα σε οποιοδήποτε στάδιο λεκιθογένεσης. Με βάση την παρουσία άδειων ωοθυλακίων ή ενυδατωμένων, διακρίθηκαν σε άτομα ωοτοκούντα, εκείνα δηλαδή που μόλις ωοτόκησαν ή θα ωοτοκήσουν πολύ σύντομα και σε μη ωοτοκούντα, εκείνα που δεν είχαν ιστολογικά γνωρίσματα πρόσφατης ή αμέσως επερχόμενης ωοτοκίας.

**Μη δραστήρια.** Άτομα που τελείωσαν την αναπαραγωγική τους περίοδο και ανήκαν στις ατρησιακές καταστάσεις 2 και 3 (λεπτομέρειες κεφάλαιο 4).

Στον πίνακα 1.9 δίνεται η αντιστοιχία των μακροσκοπικών γνωρισμάτων των ωοθηκών και των αντίστοιχων ιστολογικών σε συνδυασμό με τα αναπαραγωγικά στάδια των θηλυκών.

Αναπαραγωγικό στάδιο	Μακροσκοπική περιγραφή ωοθήκης	Ιστολογική περιγραφή ωοθήκης
I. Ανώριμα I	Στρογγυλές διαφανείς, ωοθήκες, καταλαμβάνουν λιγότερο από το 1/4 της σπλαχνικής κοιλότητας. Όχι ορατοί ωόκυτοι.	Παρουσία ωογονίων, ωοκύτταρα στο χρωματικό στάδιο και λίγα στο πρώιμο περιπυρηνικό, όλα σε πυκνή διάταξη χωρίς ενδιάμεσα κενά. Μέγεθος κυττάρων 10-60 μm.
II. Ανώριμα II	Στρογγυλές, ροδόχρωμες σφικτές ωοθήκες, καταλαμβάνουν το 1/4 - 1/3 της σπλαχνικής κοιλότητας. Όχι ορατοί ωόκυτοι	Σχηματισμοί εγκάρσιων προς το τοίχωμα της ωοθήκης ωοφόρων ελασμάτων. Παρουσία λίγων ωογονίων, αρκετών ωοκυττάρων στο χρωματικό και περιπυρηνικό στάδιο. Μέγεθος ωοκυττάρων 20 - 150 μ
III. Αναπτυσσόμενα	Πορτοκαλόχρωμες σφικτές ωοθήκες. Καταλαμβάνουν το 1/3 - 1/2 της σπλαχνικής κοιλότητας. Ορατοί αδιαφανείς ωόκυτοι.	α) Έναρξη και ολοκλήρωση ενδογενούς λεκιθογένεσης. Παρουσία λιπιδικών σταγονιδίων. β) Έναρξη εξωγενούς λεκιθογένεσης. Συγκέντρωση κοκκίων λεκίθου αρχικά περιφερειακά του ωοκυττάρου και στη συνέχεια επέκταση τους εσωτερικότερα. Μέγεθος ωοκυττάρων 150- 400μ.





IV.α Αναπτυγμέν α	Πορτοκαλόχρωμες - κίτρινωπές ωθήκες. Καταλαμβάνουν τα 2/3 της σπλαχνικής κοιλότητας. Ορατοί αδιαφανείς ωόκυτοι	Ολοκλήρωση της εξωγενούς λεκιθογένεσης. Το ωκύτταρο καλύπτεται σε όλη την επιφάνεια από μεγάλα λεκιθικά σφαιρίδια. Διάσπαρτα τα λιπιδικά σταγονίδια. Κυτταρική μεμβράνη με ζωνώσεις και κυβοειδή κοκκιόμορφα κύτταρα επιθηλίου. Μέγεθος ωοκυττάρων 400-600μ
IV.β.Ετοιμα για ωοτοκία	Κίτρινωπές ωθήκες που καταλαμβάνουν όλη τη σπλαχνική κοιλότητα. Μερικά ενυδατωμένα ωοκύτταρα φαίνονται κάτω από το τοίχωμα της ωθήκης ως μελανά στίγματα. Με ελαφρά πίεση τα ωοκύτταρα ελευθερώνονται	Τα λεκιθικά σφαιρίδια α) συγχωνεύονται σε λεκιθικές πλάκες και τα λιπιδικά σταγονίδια συνενώνονται γύρω από τον πυρήνα ο οποίος μετατοπίζεται. Ή β) συνενώνονται σε μεγαλύτερες σφαίρες και μεγάλες ελαιοσταγόνες περιβάλλουν τον πυρήνα ο οποίος μετατοπίζεται. Μέγεθος ωοκυττάρων 600-800μ.
V.Κυρίως ωοτοκούντα	Ωοθήκες ανοικτού κίτρινου χρώματος καταλαμβάνουν όλη τη σπλαχνική κοιλότητα. Πολλά ενυδατωμένα ωοκύτταρα φαίνονται κάτω από το τοίχωμα της ωθήκης, τα οποία εξέρχονται ελεύθερα από το γεννητικό πόρο.	Το ωόπλασμα αρχίζει να ενυδατώνεται, ο πυρήνας διαλύεται, η κυτταρική μεμβράνη πιέζεται από τα μέσα και φαίνεται λεπτότερη, ο όγκος του ωοκυττάρου αυξάνει πολύ. Μέγεθος ωοκυττάρων 700- 1200 μ
VI.Μερικώς ωαποθέντα	Χαλαρές μικρότερες από του προηγούμενου σταδίου ωοθήκες, ανοικτού κίτρινου χρώματος με κοκκινωπές περιοχές.	Άδεια ωοθυλάκια, παρουσία ωοκυττάρων σε οποιοδήποτε στάδιο λεκιθογένεσης, ύπαρξη ενίοτε ατρησιακών ωοκυττάρων, πιθανή παρουσία β-, γ-, δ-ατρησίας
VII.Ολικώς ωαποθέντα	Χαλαρές κόκκινες ωοθήκες, καταλαμβάνουν το 1/3 ή ακόμη λιγότερο της σπλαχνικής κοιλότητας	Πιθανά άδεια ωοθυλάκια, ή παρουσία των τελευταίων λεκιθοφόρων ωοκυττάρων ≥50% των οποίων έχουν α-ατρησία. Παρουσία β-, γ-,ή δ-ατρησιακών ωοθυλακίων, ύπαρξη ανώριμων ωοκυττάρων άτακτα διασκορπισμέ



Με βάση την ιστολογική μελέτη στο *T. Trachurus* παρατηρήθηκε μέγιστο της αναπαραγωγικής δραστηριότητας στα τέλη Μαρτίου με αρχές Απριλίου καθώς επίσης ότι τα νεαρά άτομα τελειώνουν πρώτα την αναπαραγωγική τους περίοδο. Συγκεκριμένα τα νεαρότερα εισέρχονται αργότερα στον αναπαραγωγικό τους κύκλο και τελειώνουν την αναπαραγωγική τους περίοδο νωρίτερα (Wine & Knaggs, 1975) όπως συμβαίνει στους περισσότερους τελεόστεους (DeMartini & Fountain, 1981; Hunter & Macewicz 1985). Επιπλέον, στις τομές συνυπήρχαν διάφορα αναπτυξιακά στάδια ωοκυττάρων (ακριβώς όπως και στις δικές μας). Αν θεωρηθεί ότι αυτό σημαίνει ανεξάρτητες πιθανές ωοτοκίες (Hunter et al, 1992) τότε διακρίνονται αρκετές στις ιστολογικές τομές.

#### Γοναδοσωματικός και ηπατικός δείκτης.

Ο υπολογισμός του γοναδοσωματικού δείκτη (gonado- somatic index, GSI) γνωστού και ως συντελεστή ωρίμανσης, αποτελεί τρόπο καταγραφής της ανάπτυξης των γονάδων:

$$GSI = W_g / W_f * 100$$

όπου  $W_g$  = το βάρος της γονάδας και

$W_f$  = το βάρος του σώματος (με ή χωρίς γονάδες)

Η μεταβολή του GSI σε συνάρτηση με το χρόνο ή την εποχή (μήνες) ποικίλει από είδος σε είδος. Γενικά αυξάνεται πλησιάζοντας στην ωρίμανση και μειώνεται μετά την ωοτοκία.

Ο ηπατοσωματικός δείκτης αφορά την αποθήκευση λίπους στο σπκώτι, δηλαδή τις μεταβολές της ενέργειας (κατανάλωση ή όχι). Έτσι ο υπολογισμός του, μας δίνει στοιχεία για τις περιόδους υψηλότερης κατανάλωσης ενέργειας όπως μετανάστευση, αναπαραγωγή και διαχείμανση.

$$HSI = W_H / W_F * 100$$

$W_H$  = το βάρος του σπκωτιού

$W_F$  = το βάρος του σώματος





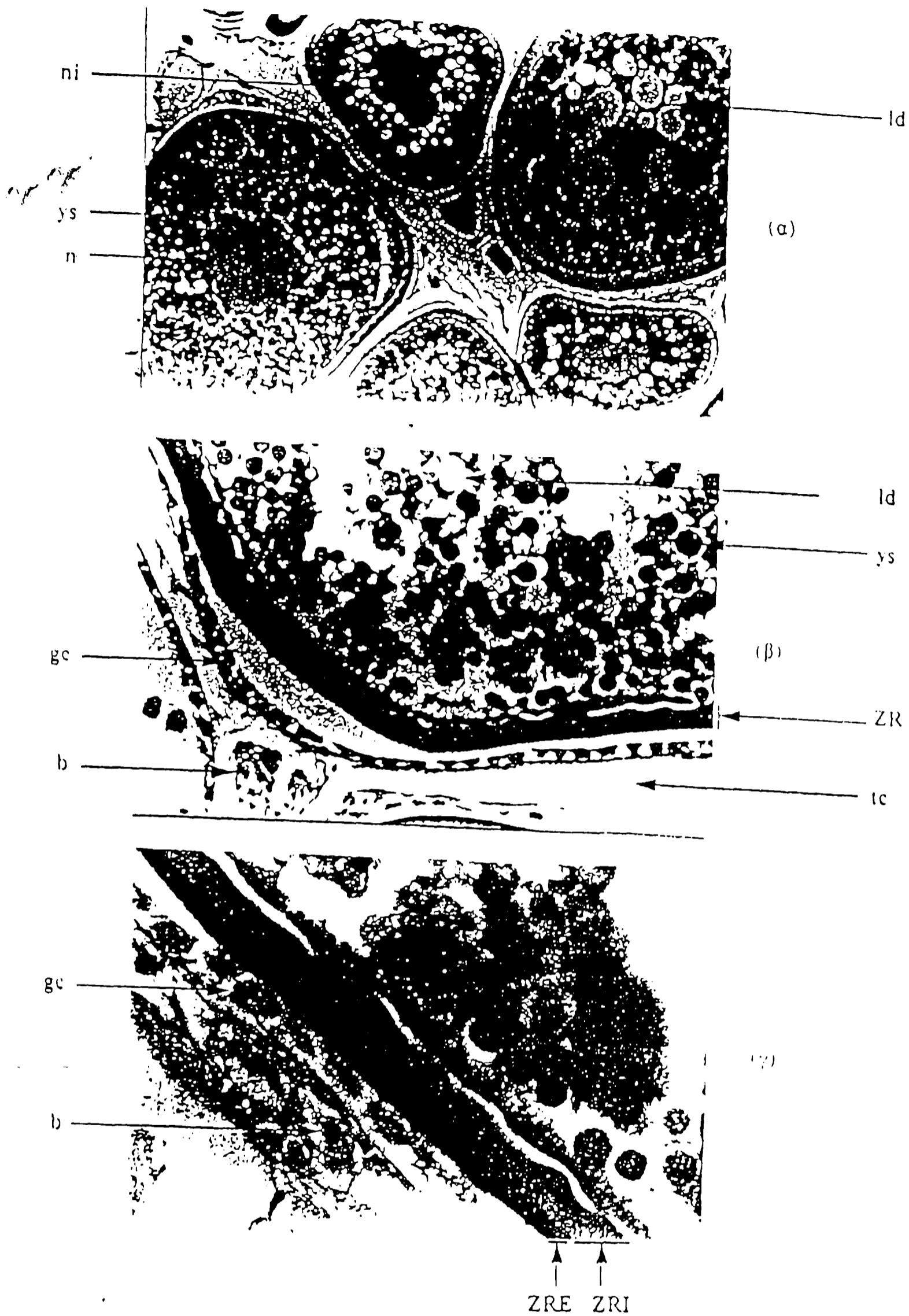
Γενικά σ' αυτές τις περιόδους (αναπαραγωγή, διαχείμανση, μετανάστευση) ο δείκτης μειώνεται ενώ αυξάνεται κατά τις περιόδους υψηλής διατροφής και χαμηλής δραστηριότητας

Όπως αναφέρεται και από τον Kaiser (1973) για το *Trachurus murphyi* ο γοναδοσωματικός και ο ηπατοσωματικός δείκτης ακολουθούν περίπου αντίστροφη πορεία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Αυτό είναι αναμενόμενο, εφόσον η γονάδα αναπτύσσεται σε βάρος της ενεργειακής συσσώρευσης στο συκώτι (Wallace & Selman, 1981). (Εικ.1.8).

Μελετήθηκε επίσης η σχέση του μέσου γοναδοσωματικού δείκτη με το αναπαραγωγικό στάδιο. (Εικ.1.9). Παρατηρείται η αύξηση της τιμής του γοναδοσωματικού δείκτη ως το V αναπαραγωγικό στάδιο, ενώ ακολουθεί αμέσως μετά απότομη πτώση.

Η ανάλυση διακύμανσης του γοναδοσωματικού δείκτη με τη μέθοδο των Kruskal και Wallis έδειξε ότι εξαρτάται στατιστικά σημαντικά από την ηλικία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Στην εικόνα 1.10 φαίνεται ότι τα νεαρότερα άτομα σε σχέση με τα μεγαλύτερα έχουν χαμηλότερες μέσες τιμές του γοναδοσωματικού δείκτη. Η απότομη αύξηση του δείκτη από την ηλικία 2 στην ηλικία 3 επιβεβαιώνει την κρίσιμη ηλικία, η οποία αντιστοιχεί στο μήκος των κατά 50% ώριμων θηλυκών. Για την καλύτερη απόδοση αυτής της μεταβολής, στη γραφική παράσταση λήφθηκε υπόψη και η τιμή του μέσου GSI των θηλυκών ηλικίας 1, έστω και αν αυτά δεν συμμετέχουν στην αναπαραγωγική διαδικασία.



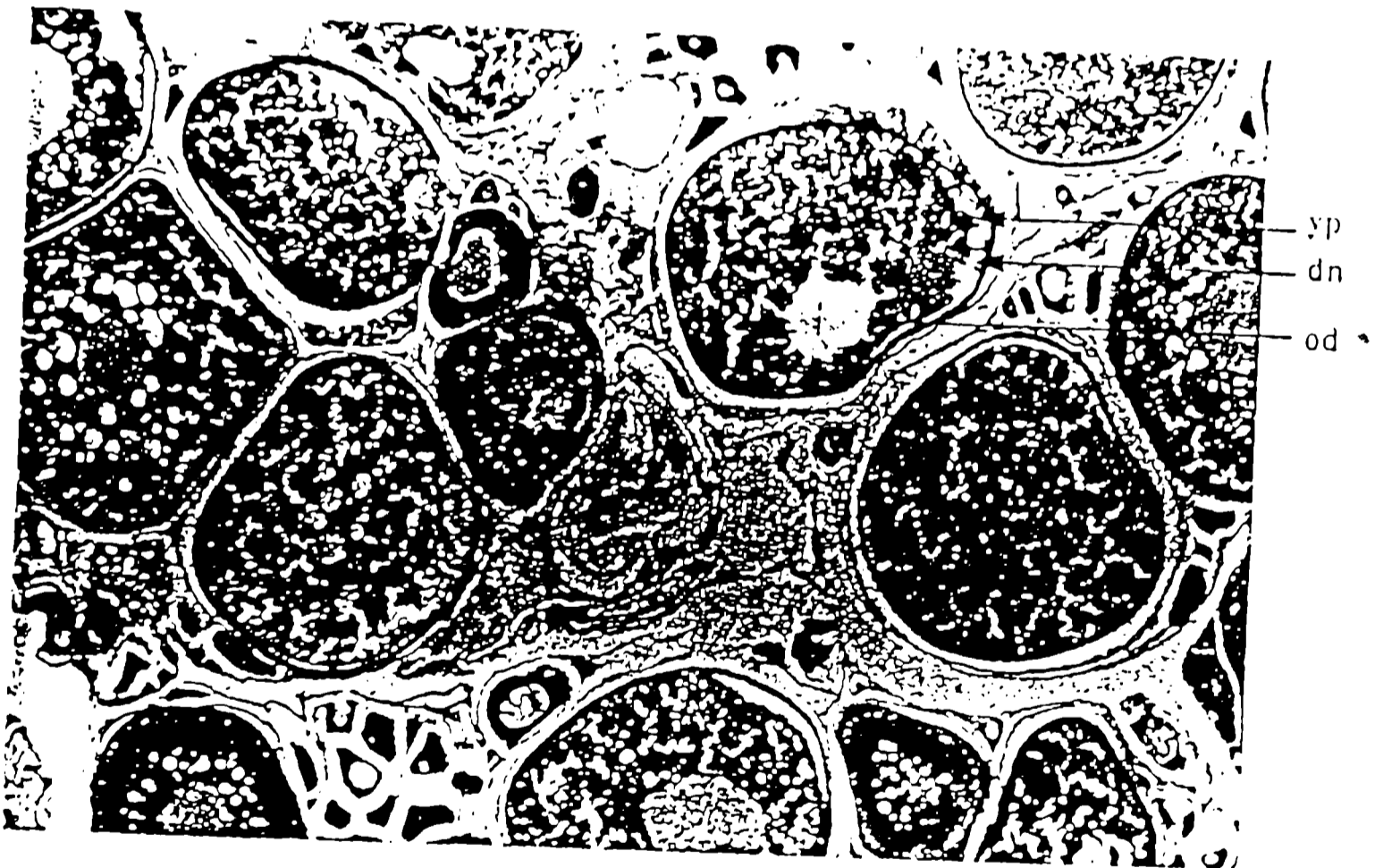


Εικ 1.5: Εξωγενής λεκιθογένεση- Ιστολογικά χαρακτηριστικά ολικώς λεκιθοφόρου ωοκυττάρου του *T. Trachinus* σε τρεις διαφορετικές μεγεθύνσεις: 76x(a), 304x(b) και 760(γ). n= πυρήνας, ni= πυρηνίσκοι, ys= λεκιθικά σφαιρίδια, ZR= κυτταρική μεμβράνη ως ακτινωτή ζώνη, ZRI= εσωτερική κυτταρική μεμβράνη, ZRE= εξωτερική κυτταρική μεμβράνη, gc= κοκκιόμορφα κύτταρα, tc= κύτταρα θήκης, b= αιμοφόρα αγγεία, ld= λιπιδικά σταγονίδια





(α)

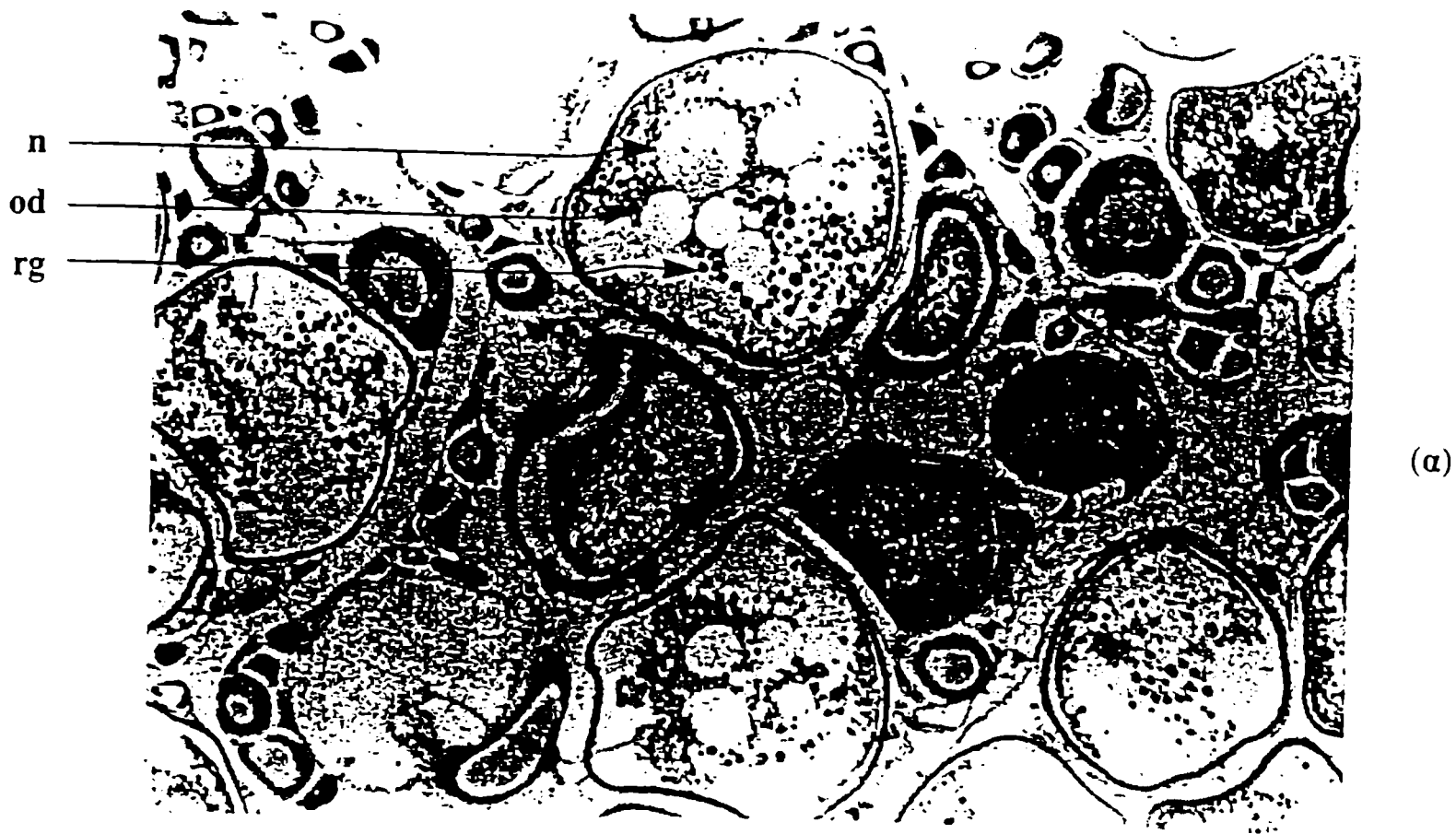


(β)

Εικ 1.6: Ωρίμανση ωοκυττάρου του *Trachurus trachurus* με τη δημιουργία μικρών λεκιθικών πλακών, μετατόπιση (α) και αποδιοργάνωση του πυρήνα (β). n= πυρήνας, od= ελαιοσταγόνες, yp= μικρές λεκιθικές πλάκες, dn= διασκορπιζόμενος πυρήνας.







(α)

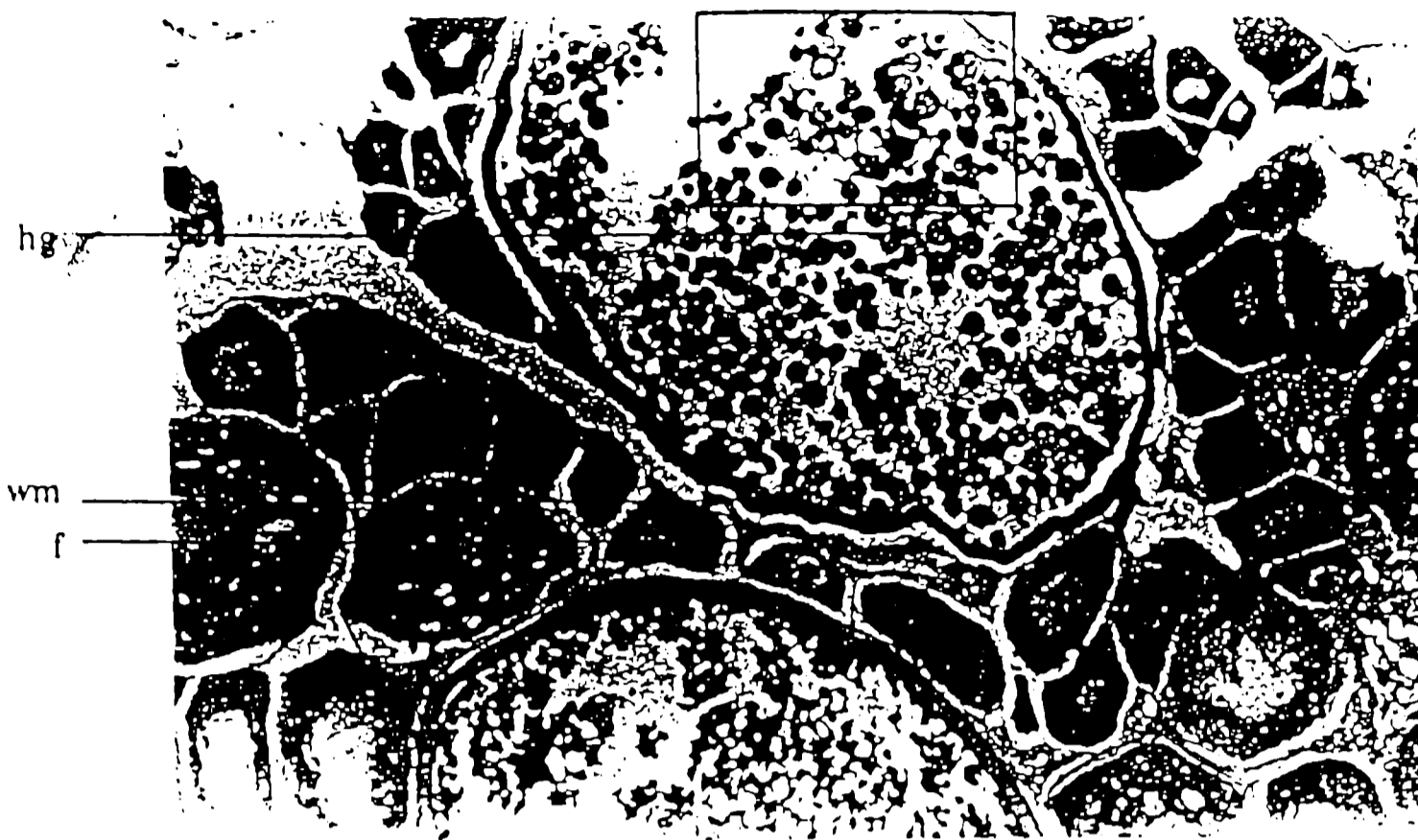


(β)

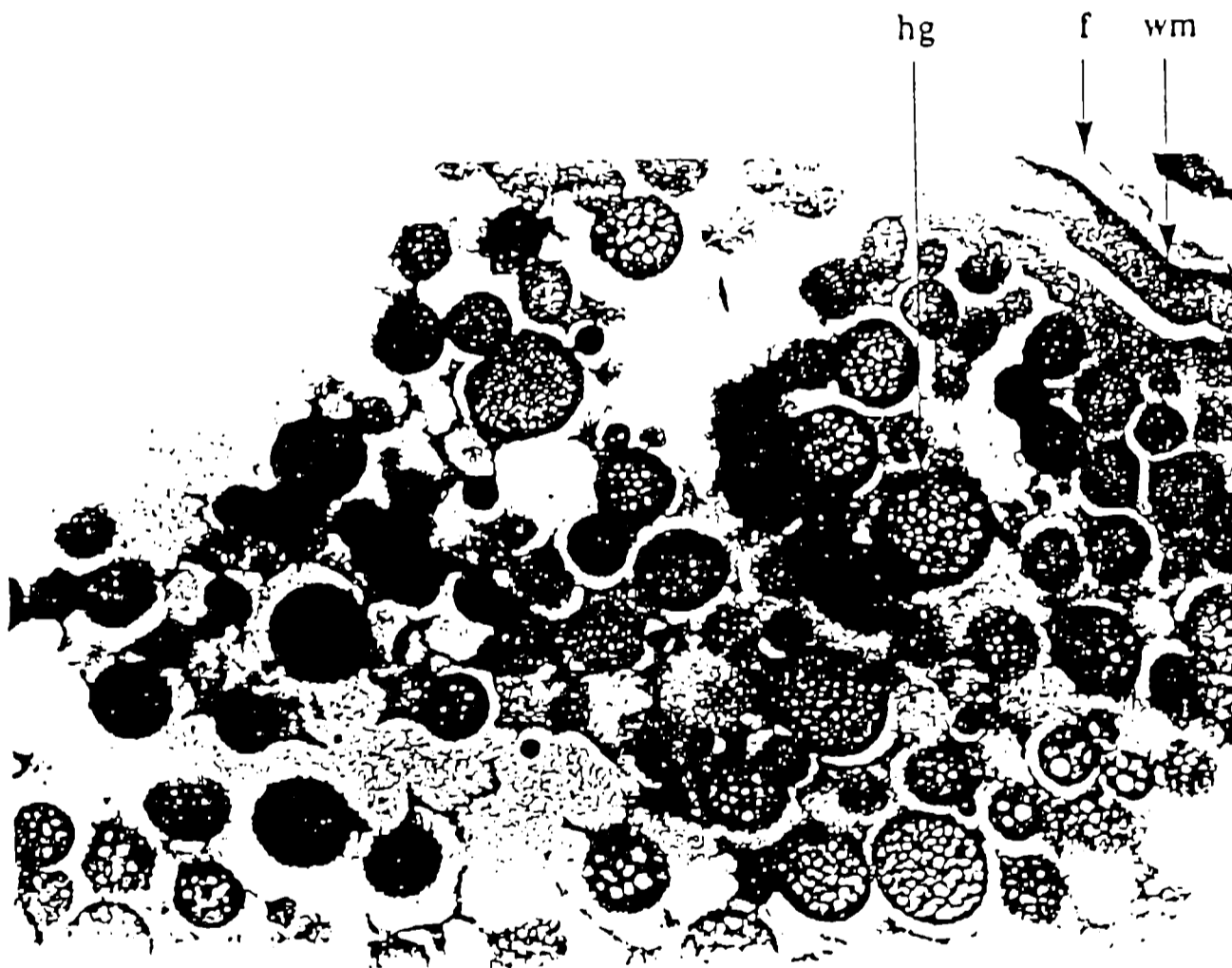
Εικ. 1.7: Ωρίμανση ωοκυττάρου του *Trachurus trachurus* με τη δημιουργία διαθλαστικών σφαιρών (α). Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση ενυδάτωση των σφαιρών σε πρώτο στάδιο (β). Ενυδάτωση σε μεταγενέστερο στάδιο, φαίνεται η χαρακτηριστική κυματοειδής κυτταρική μεμβράνη (γ).

Λεπτομέρεια της εικόνας 1.7γ,δ: n= πυρήνας, od= ελαιόσταγόνες, rg= διαθλαστικές σφαίρες, hg= ενυδατωμένες σφαίρες, wm= κυματοειδής κυτταρική μεμβράνη, f= επιθήλιο.





(7)



(8)

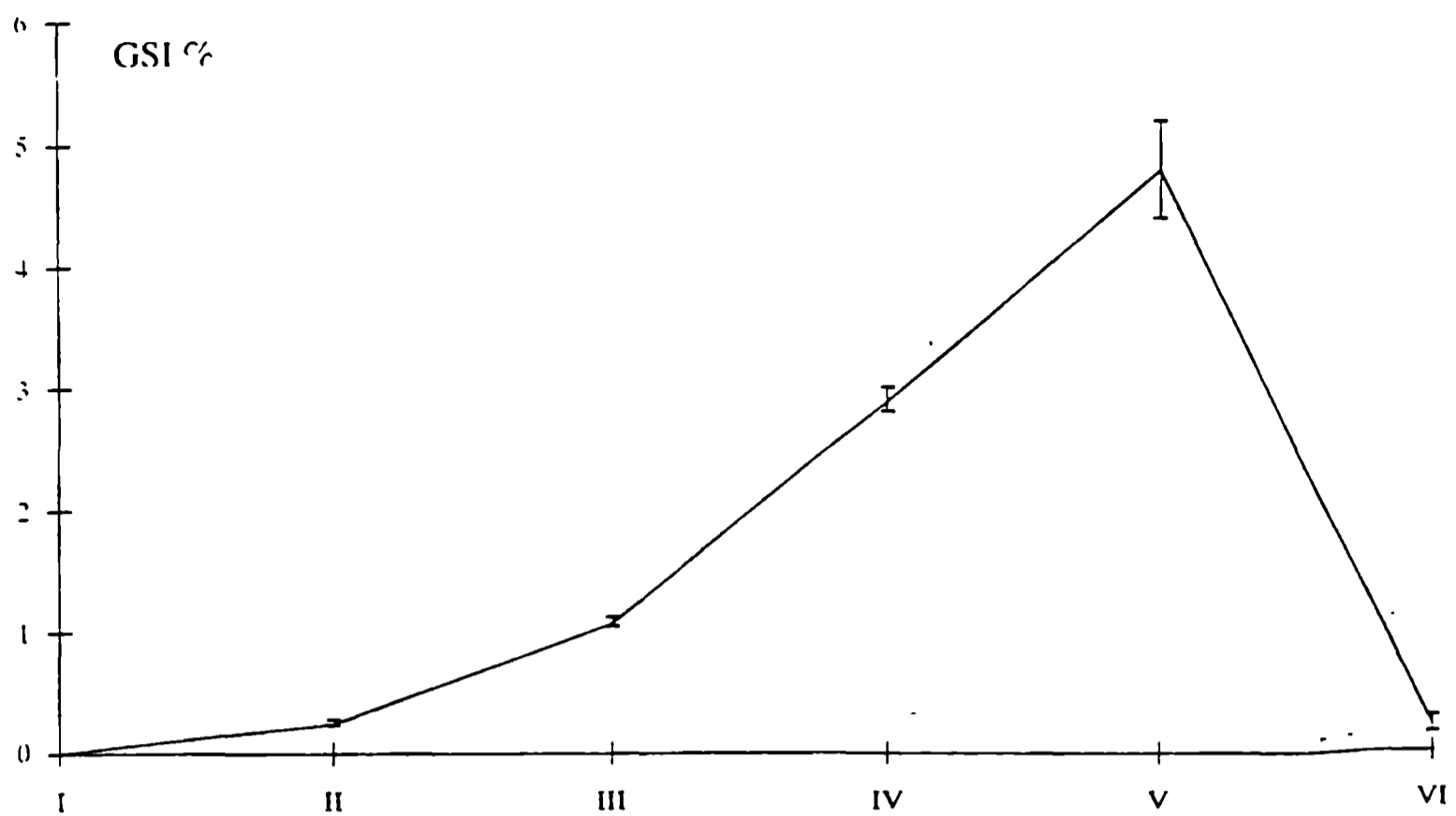
Εικ 1.7 (συνέχεια)



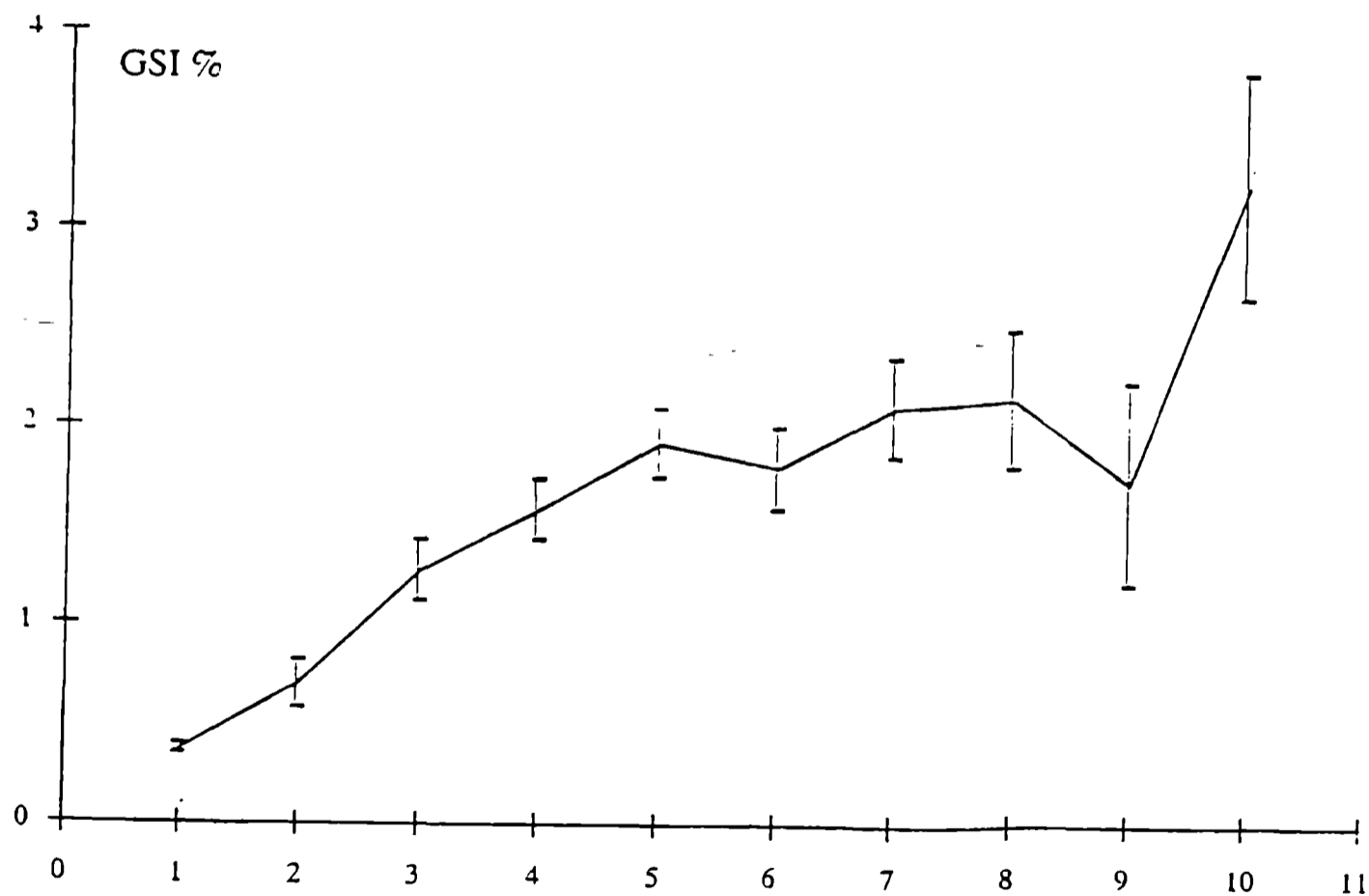








Εικ. 1.9: Διακύμανση του μέσου γοναδοσωματικού δείκτη (GSI) σε σχέση με το αναπαραγωγικό στάδιο του *Trachurus trachurus* κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής και μετααναπαραγωγικής περιόδου. Οι κατακόρυφες γραμμές δείχνουν το σταθερό σφάλμα στη μέση τιμή.



Εικ. 1.10: Μέσος γοναδοσωματικός δείκτης (GSI) σε σχέση με την ηλικία θηλυκών ατόμων του *Trachurus trachurus* κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου των ετών 1989-91. Οι κατακόρυφες γραμμές δείχνουν το σταθερό σφάλμα στη μέση τιμή.



## **Σπερμιογένεση στο *Pagrus pagrus***

### Γενική μορφολογία των όρχεων

Οι όρχεις είναι του λοβοειδούς τύπου. Αποτελούνται από πολλούς λοβούς κυκλικού σχήματος που οριοθετούνται από συνδετικό ιστό και διαχωρίζονται από το διάμεσο τμήμα στο οποίο απαντούν τα σωματικά κύτταρα. (Εικ.1.11). Κάθε λοβός αποτελείται από πολλές σπερματικές κύστεις μέσα στις οποίες τα γεννητικά κύτταρα βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης. (Εικ.1.12). Οι σπερματικές κύστεις είναι διατεταγμένες στην περιφέρεια της κεντρικής κοιλότητας του λοβού στην οποία απελευθερώνονται τα σπερματοζώαρια κατά την σπερμίαση. (Εικ.1.15,1.19). Ο σπερματογωγός, βρίσκεται κάτω από τη ζώνη συνδετικού ιστού που διαχωρίζει το θηλυκό ιστό της γονάδας από τον όρχι, στην εξωτερική πλευρά του όρχι. (Εικ.1.22) Είναι ραχιαία τοποθετημένος σε σχέση με τον όρχι, βρίσκεται ακριβώς κάτω από τη σειρά ζώνη σε άμεση γειτνίαση με την ωοθήκη, και χαρακτηρίζεται από πολλές αναδιπλώσεις.

### Τα στάδια ωρίμανσης των όρχεων

Οι όρχεις κατατάσσονται σε πέντε στάδια ωρίμανσης, με κριτήριο την παρουσία των πιο ανεπτυγμένων κυττάρων και τη σχετική αφθονία τους.

### Στάδιο ανωριμότητας

Στο στάδιο αυτό ο όρχις αρχίζει να αποκτάει ή έχει αποκτήσει την λοβοειδή δομή του. Ο συνδετικός ιστός καταλαμβάνεται από πολυάριθμους λοβούς μέσα στους οποίους απαντούν σπερματογόνα συναθροισμένα κατά ομάδες σε κύστεις διατεταγμένες στην περιφέρεια της κεντρικής κοιλότητας του λοβού (Εικ.1.27,1.28). Τα σπερματογόνα είναι μεγάλα σφαιρικά κύτταρα με ένα μεγάλο πυρήνα κεντρικά τοποθετημένο, και ένα διακριτό μερικές φορές πυρηνίσκο (Εικ.1.12). Το κυτόπλασμα είναι αμυδρά κοκκιώδες και σχηματίζει μια εκτεταμένη ζώνη συγκριτικά με το κυτόπλασμα των αρσενικών γεννητικών κυττάρων στα επόμενα στάδια ανάπτυξης. Ο όρχις είναι λευκόχροος και αδιαφανής. Το μέγεθος του είναι μικρό και συνήθως συνυπάρχει με μια ωοθήκη σε κατάσταση ανωριμότητας. Ο μέσος γοναδοσωματικός δείκτης σ' αυτό το στάδιο είναι  $0.285 \pm 0.12$





### Στάδιο σπερματογένεσης

Στους λοβούς παρατηρούνται οι πρώτες πυκνές οξεόφιλες συναθροίσεις σπερματοκυττάρων (Εικ.1.11,1.29,1.30). Στο στάδιο αυτό παρατηρούνται συχνά τα σπερματοκύτταρα β και εξαιρετικά σπάνια τα σπερματοκύτταρα α (Εικ.1.12). Τα σπερματοκύτταρα β είναι σφαιρικά κύτταρα μικρότερου μεγέθους από τα σπερματογόνια και τα σπερματοκύτταρα α, με ένα διακριτικό πυρήνα ομογενούς σύστασης (εξαιτίας της ομογενούς εμφάνισης της χρωματίνης) στον οποίο δεν διακρίνεται ο πυρηνίσκος. Σε μερικούς λοβούς μπορεί να παρατηρούνται κύστες με σπερματίδες σε σχήμα ' 'μπουκέτου' ' όπως επίσης και σπερματοζωάρια (Εικ.1.12) αλλά η αφθονία αυτών των κύστεων είναι μικρή. Ο μέσος γοναδοσωματικός δείκτης στο στάδιο της σπερματογένεσης είναι  $0.21\% \pm 0.04$ .

### Στάδιο σπερμιογένεσης

Στις κοιλότητες των λοβών παρατηρούνται μεγάλες ποσότητες σπερματίδων και σπερματοζωαρίων. Η διάμετρος των λοβών και το μέγεθος των όρχεων αυξάνονται σημαντικά σ' αυτό το στάδιο, εξαιτίας της μαζικής παραγωγής σπερματίδων και σπερματοζωαρίων (Εικ.1.14,1.15,1.16). Οι σπερματίδες είναι σφαιρικές με μέγεθος μικρότερο των σπερματοκυττάρων, που προσεγγίζει το μέγεθος των σπερματοζωαρίων (Εικ.1.12,1.17). Παρατηρούνται αρχικά συναθροισμένες κατά ομάδες με τις κεφαλές διαχωρισμένες και τα μαστίγια ενωμένα, έχοντας τη μορφή ενός ' 'μπουκέτου' ', αλλά διαχωρίζονται στη συνέχεια. Τα σπερματοζωάρια παρατηρούνται ως ομάδες μικρών σφαιρικών κυττάρων με διακριτή οξεόφιλη κεφαλή και εωσινοφιλο μαστίγιο σε στάσεις που υποδηλώνουν κινητικότητα (Εικ 1.21). Το χρώμα των όρχεων είναι λευκό και η εμφάνιση τους γαλακτώδης.(Εικ.1.13). Στον σπερματογωγό παρατηρούνται σπερματοζωάρια, αλλά δεν απελευθερώνεται σπέρμα κατά την άσκηση πίεσης στους όρχεις. Ο μέσος γοναδοσωματικός δείκτης στο στάδιο της σπερμιογένεσης είναι  $1.02\% \pm 0.16$ .



### Στάδιο σπερμίας

Οι κοιλότητες των λοβών καταλαμβάνονται από πυκνές μάζες ενυδατωμένου σπέρματος (Εικ.1.31,1.32) και τα τοιχώματα των λοβών λεπταίνουν (Εικ.1.19). Το σχήμα τους γίνεται επίμηκες ενώ μερικοί διαρρηγνύονται από την τάση που ασκεί η υγρή μάζα του σπέρματος (Εικ.1.20). Ο σπερματογωγός κατακλύζεται από σπέρμα που ρέει μετά την άσκηση πίεσης στους όρχεις (Εικ.1.22). Οι όρχεις είναι γαλακτόχροι και καταλαμβάνουν μεγάλο τμήμα της περιτοναϊκής κοιλότητας (Εικ.1.18). Ο γοναδοσωματικός δείκτης αποκτά τη μέγιστη τιμή του και ανέρχεται σε  $2.125 \% \pm 0.45$

### Στάδιο ανάκτησης

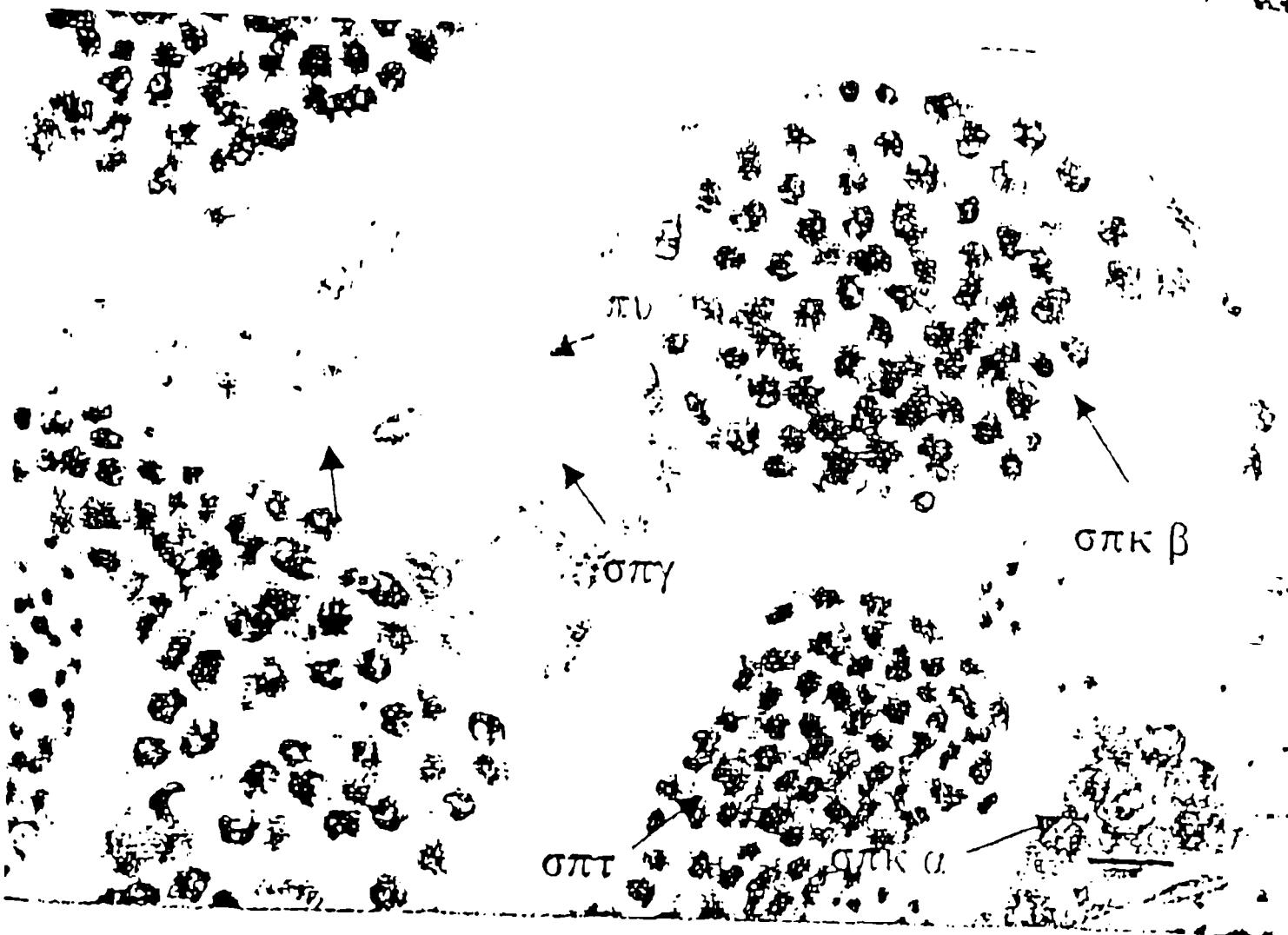
Οι σπερματικοί λοβοί είναι άδειοι ή διακρίνονται σε μερικούς, υπολείμματα του σπέρματος και σπερματοκύτταρα σε φάση εκφυλισμού και απορρόφησης (Εικ.1.22). Η κοιλότητα του λοβού επανέρχεται στις διαστάσεις που είχε πριν την σπερμίαση αλλά διατηρεί το επίμηκες σχήμα της. Στις σπερματικές κύστεις υπάρχουν κυρίως σπερματογόνια τα οποία συνιστούν το απόθεμα των κυττάρων της επόμενης ωρίμανσης.

Οι χώροι μεταξύ των λοβών καταλαμβάνονται από συναθροίσεις κοκκιωδών εωσινόφιλων κυττάρων και καφέ- κίτρινες εναποθέσεις ακυτταρικού υλικού (Εικ.1.26). Στο περιφερειακό τμήμα των όρχεων τα σπερματογόνια πολλαπλασιάζονται και δημιουργούνται νέοι λοβοί (Εικ.1.25).

Οι όρχεις επανέρχονται στις αρχικές τους διαστάσεις. Το χρώμα τους είναι λευκό, αλλά σικτό, με καφέ κηλίδες (Εικ.1.23). Ο γοναδοσωματικός δείκτης μειώνεται σε  $0.15\% \pm 0.02$ .







Εικ. 1.11: Μικροσκοπική εμφάνιση όρχι κατά την έναρξη της σπερματογένεσης. Μέσα στις κοιλότητες των σπερματικών λοβών διακρίνονται σπερματοκύτταρα κλ= κοιλότητα λοβού, σι= συνδεδειγμένος ιστός, σπγ= σπερματογόνια, σπκ= σπερματοκύτταρα, σπκ α= σπερματοκύτταρα α, σπκ β= σπερματοκύτταρα β, σπτ= σπερματίδες.

Εικ. 1.12: Αρσενικά γεννητικά κύτταρα μέσα στην κοιλότητα της ίδιας σπερματικής κύστης.



*Εικ.1.13: Μακροσκοπική εμφάνιση όρχι στο στάδιο σπερμιογένεσης. Αρσενικό, ηλικία 4+, 48<sup>ος</sup> μήνας, Μάρπιος, Βάρος γονάδων=15,73g, ΓσΔ=1,75%*

*Εικ 1.14:Μικροσκοπική εμφάνιση όρχι στο στάδιο σπερμιογένεσης*

*Εικ 1.15:Μεγέθυνση της προηγούμενης εικόνας. Στους σπερματικούς λοβούς παρατηρούνται σπερματίδες και σπερματοζωάρια.*

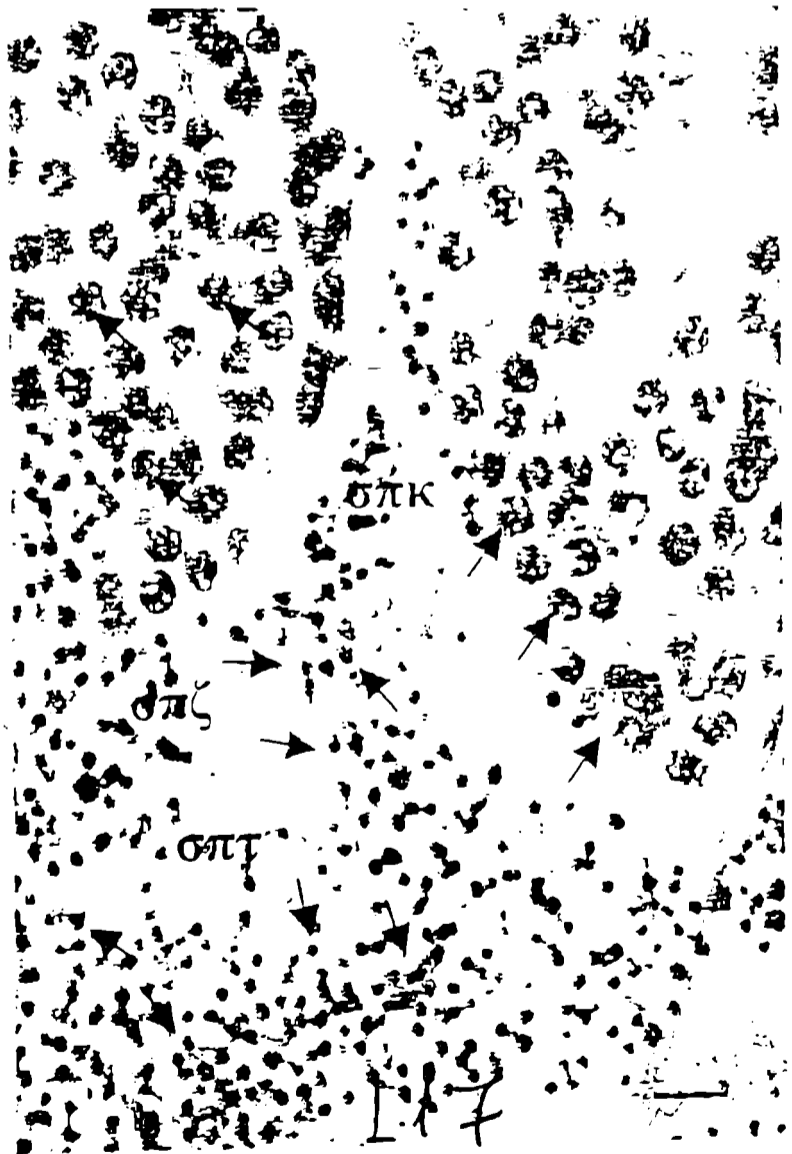
*Εικ 1.16:Εγκάρσια τομή όρχι στο στάδιο της σπερμιογένεσης. Στους σπερματικούς λοβούς διακρίνονται σπερματίδες και σπερματοζωάρια.*

*Εικ1.17: Σπερματίδες και σπερματοζωάρια στην κοιλότητα ενός σπερματικού λοβού.*

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

λι= λιπώδης ιστός,  
 ΟΑ3= όρχις στο στάδιο της σπερμιογένεσης,  
 πλκ ω= προλεκιθογόνα ωκύτταρα,  
 σλ= σπερματικός λοβός,  
 σπγ= σπερματογόνια,  
 σπζ= σπερματοζωάρια,  
 σπκ= σπερματοκύτταρα,  
 σπι= σπερματίδες.







*Εικ.1.18: Μακροσκοπική εμφάνιση όρχι στο στάδιο της σπερμίας. Αρσενικό, ηλικία 5+ Απρίλιος, Βάρος γονάδων =79,1 g. ΓσΔ=4,74%*

*Εικ.1.19: Μικροσκοπική εμφάνιση όρχεων στο στάδιο της σπερμίας*

*Εικ.1.20: Διαστολή των σπερματικών λοβών σε όρχι σε προχωρημένο στάδιο σπερμίας*

*Εικ.1.21:Σπερματοζωάρια στη κοιλότητα του σπερματικού λοβού.*

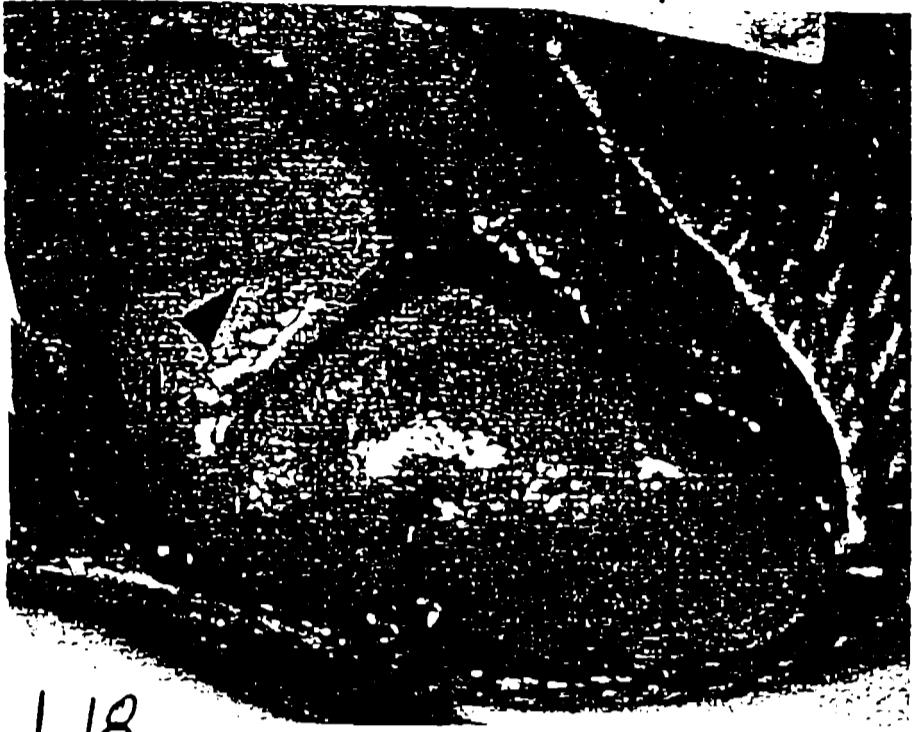
*Εικ.1.22: Άποψη τμήματος του σπερματογωγού κατά την σπερμίας. Το εσωτερικό του καταλαμβάνεται από σπέρμα.*

#### ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΟΑ4= όρχι στο στάδιο σπερμίας,  
σπλ= σπερματικός λοβός,  
σπζ= σπερματοζωάρια







L.18



L.19

σπέρμα

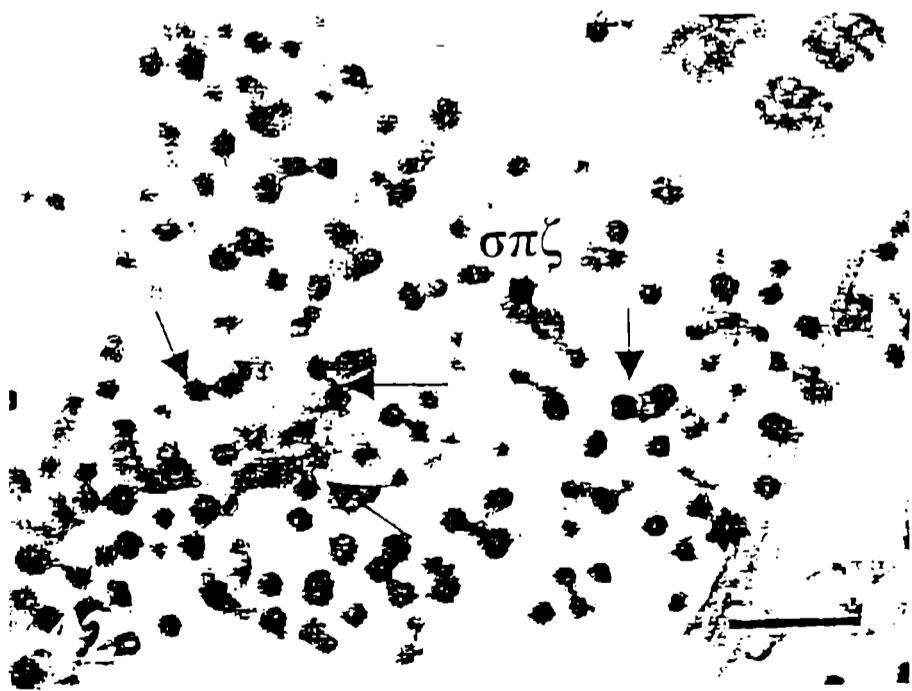
20



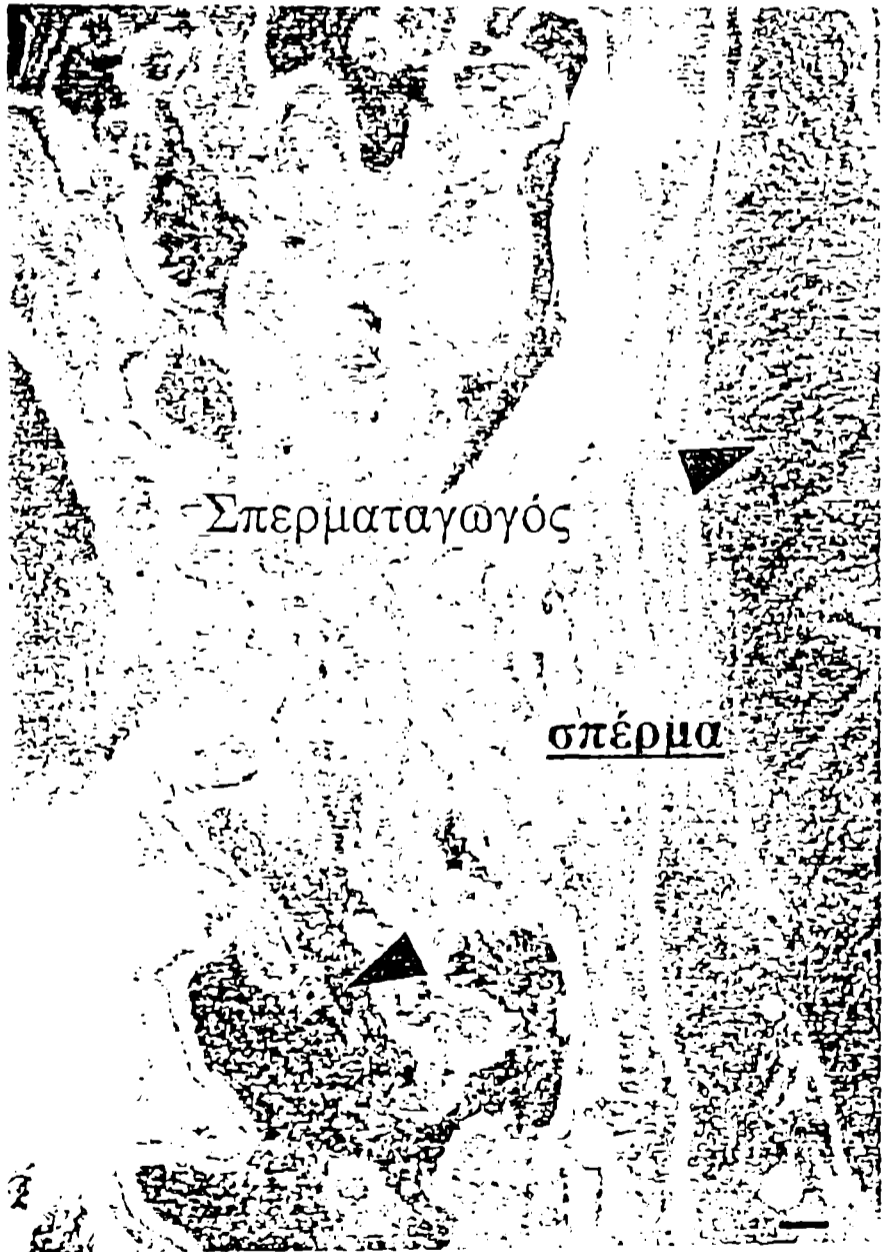
σπέρμα

στ

21



σπς



Σπέρματαγωγός

σπέρμα

L.22



*Εικ.1.23: Μακροσκοπική εμφάνιση όρχι στο στάδιο ανάκτησης. Ηλικία 6+, Ιούνιος, Βάρος γονάδων=5,4 g ΓσΔ=0,33%*

*Εικ.1.24: Μικροσκοπική εμφάνιση όρχι στο στάδιο ανάκτησης. Στις κοιλότητες των σπερματικών λοβών διακρίνονται υπολείμματα σπέρματος και σπερματοκύτταρα.*

*Εικ.1.25: Πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων και δημιουργία νέων σπερματικών λοβών στην περιφέρεια του όρχι.*

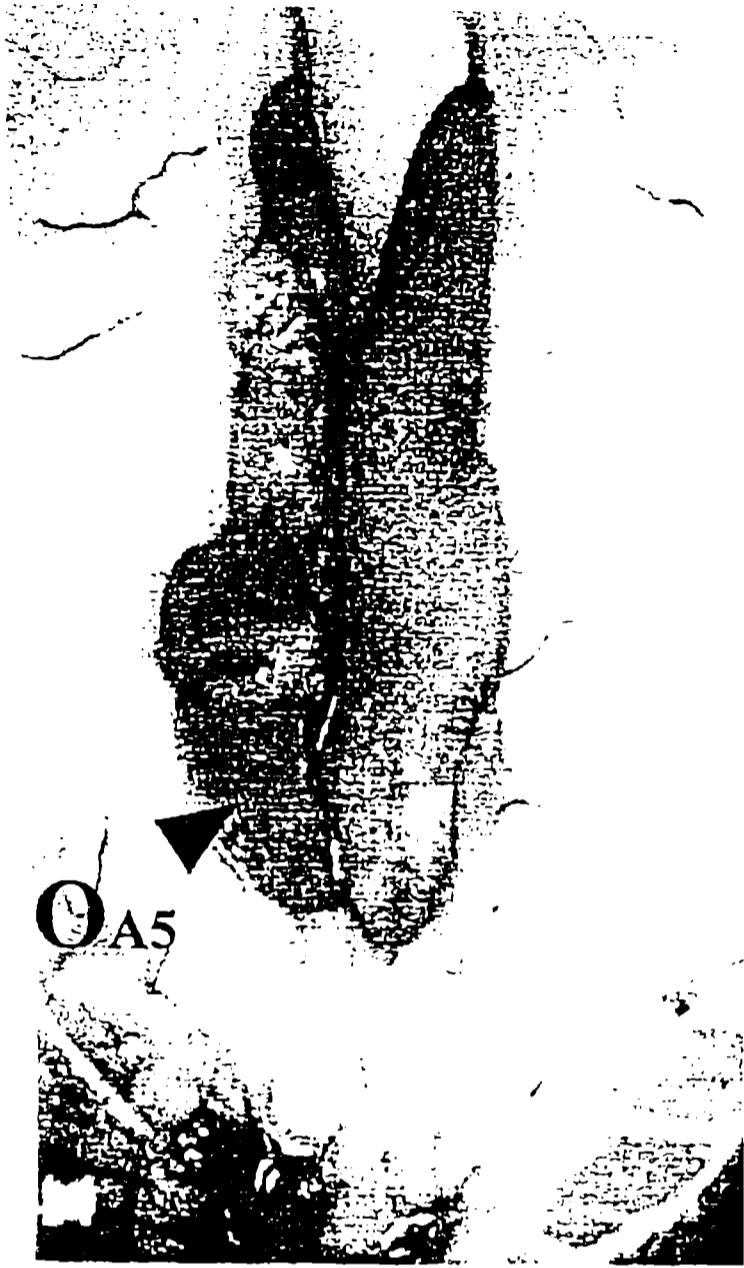
*Εικ.1.26: Όρχις σε φάση ανάκτησης. Εμφάνιση των εωσινόφιλων κοκκιωδών κυττάρων και σε σχηματισμός των καφέ σωματίων.(Κοκοκύρης, 1998)*

#### ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

*Ε κκ= εωσινόφιλα κοκκώδη κύτταρα,  
κλ= κοιλότητα λοβού,  
κσ= καφέ σωματία,  
ΟΑ5= Όρχις στο στάδιο ανάκτησης,  
σι= συνδετικός ιστός,  
σπγ=σπερματογόνια,  
σπζ= σπερματοζωάρια,  
σπκ= σπερματοκύτταρα*



23



1.24

1.25



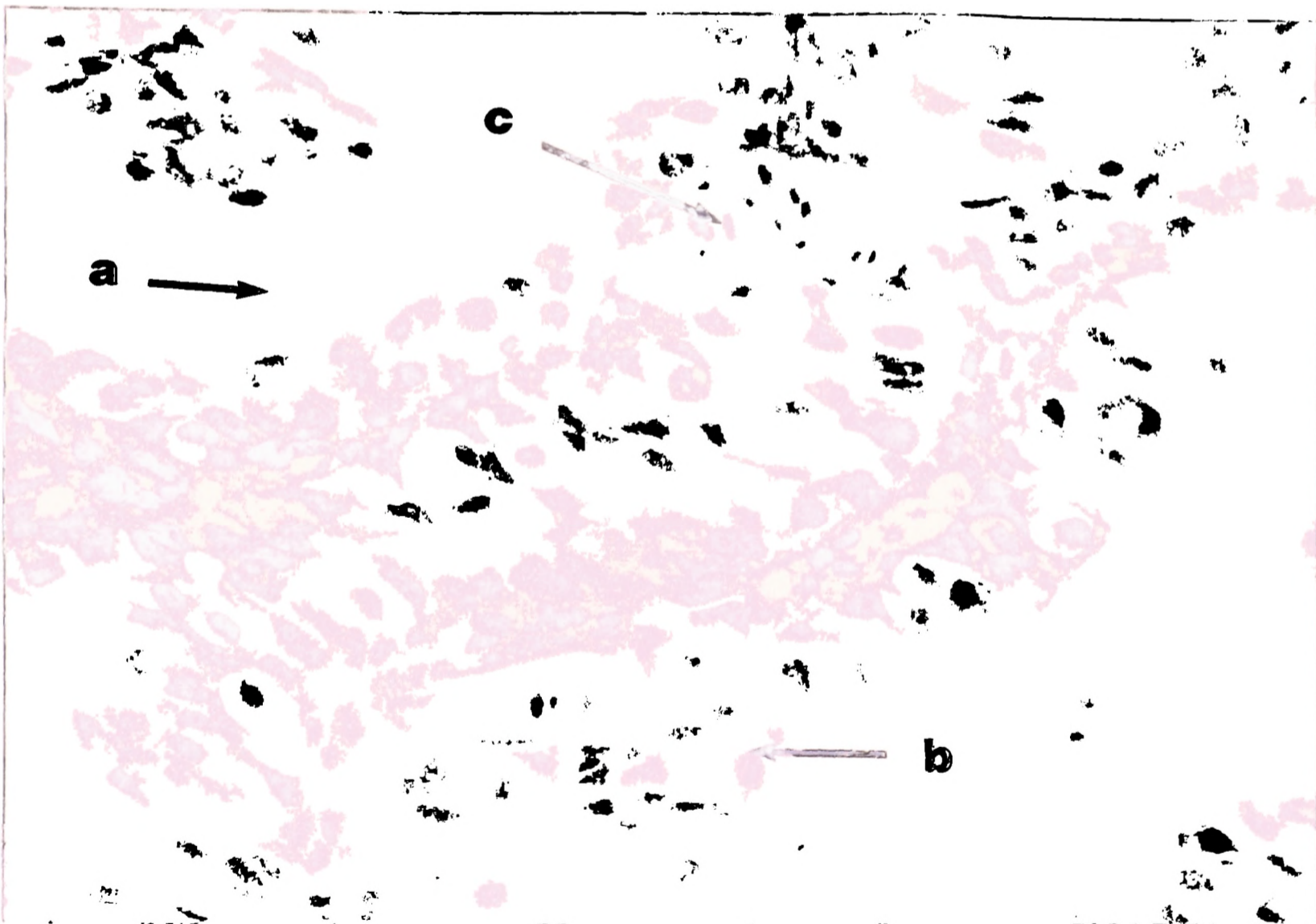
1.26







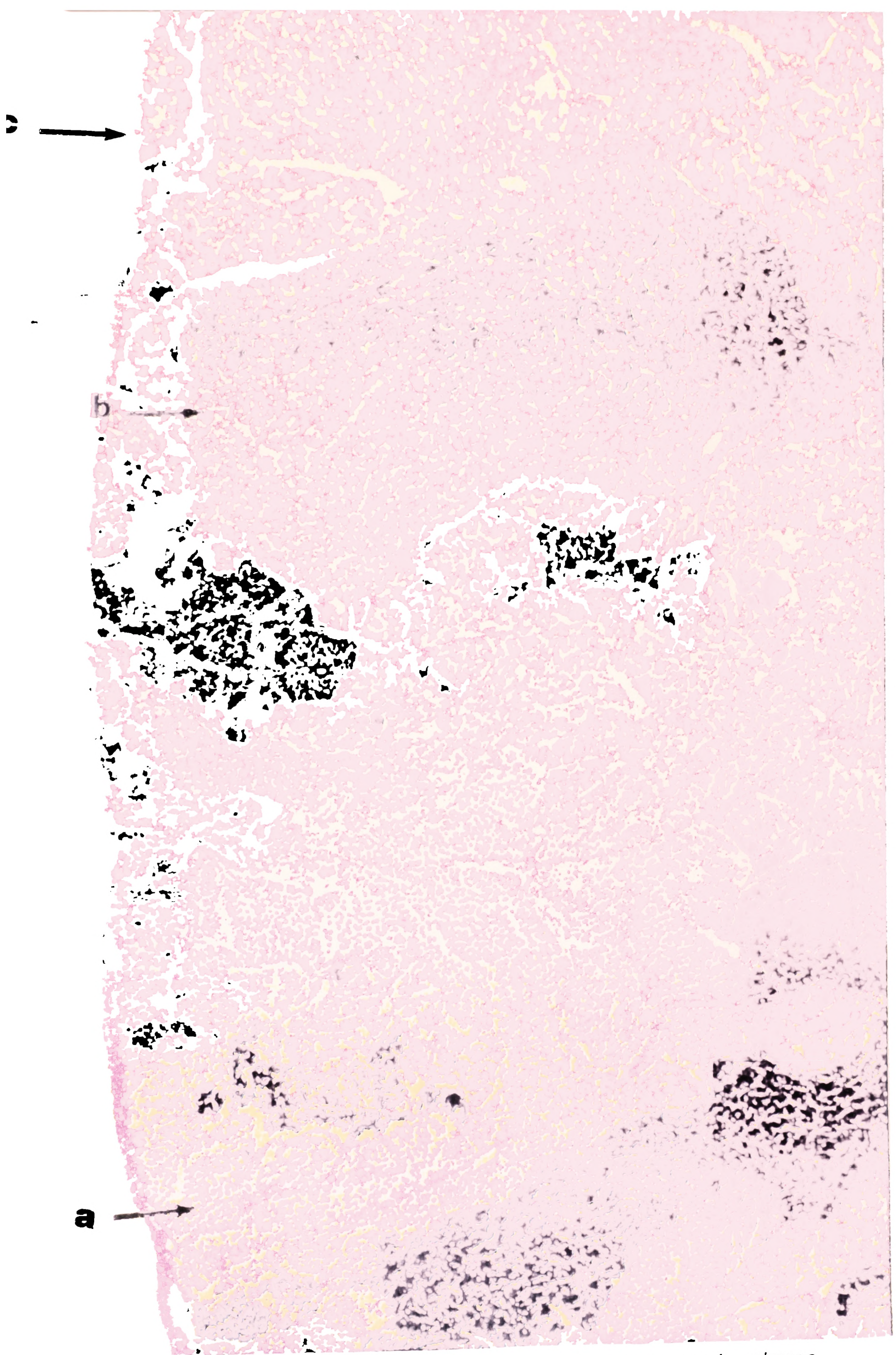
Εικ. 1.27: Ανώριμοι όρχεις: α) κάψα, β)σπερματικά σωληνάρια με σπερματογόνια



Εικ. 1.28: Λεπτομέρειες των ανώριμων όρχεων α) Σπερματικό σωληνάριο β) Σπερματογόνια γ) Αιμοφόρο αγγείο



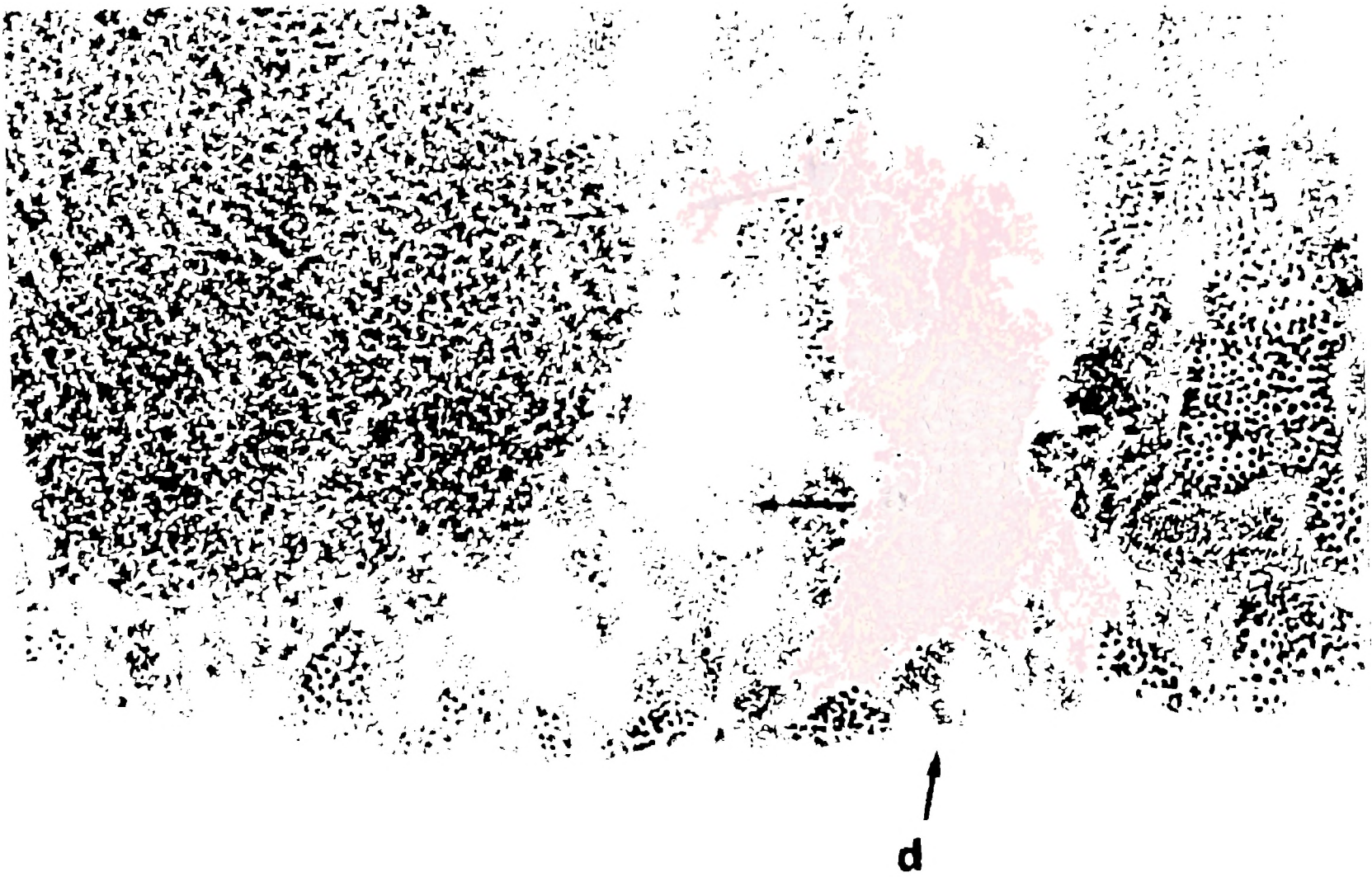




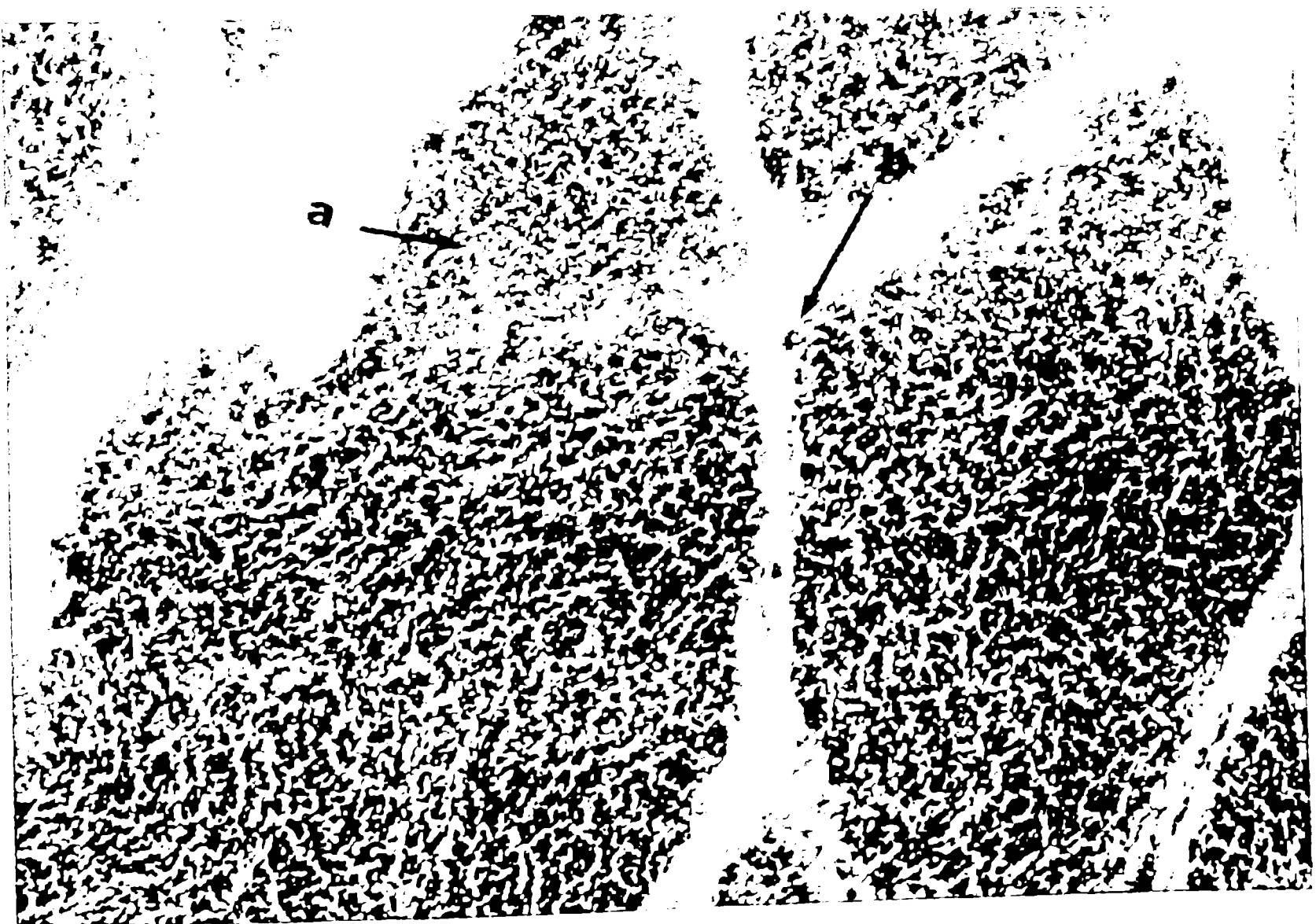
Εικ. 1.29: Όρχεις στο στάδιο ωρίμανσης α) Παραγόμενα σπερματικά κύτταρα  
β) Σπέρμα, γ) Κάψα







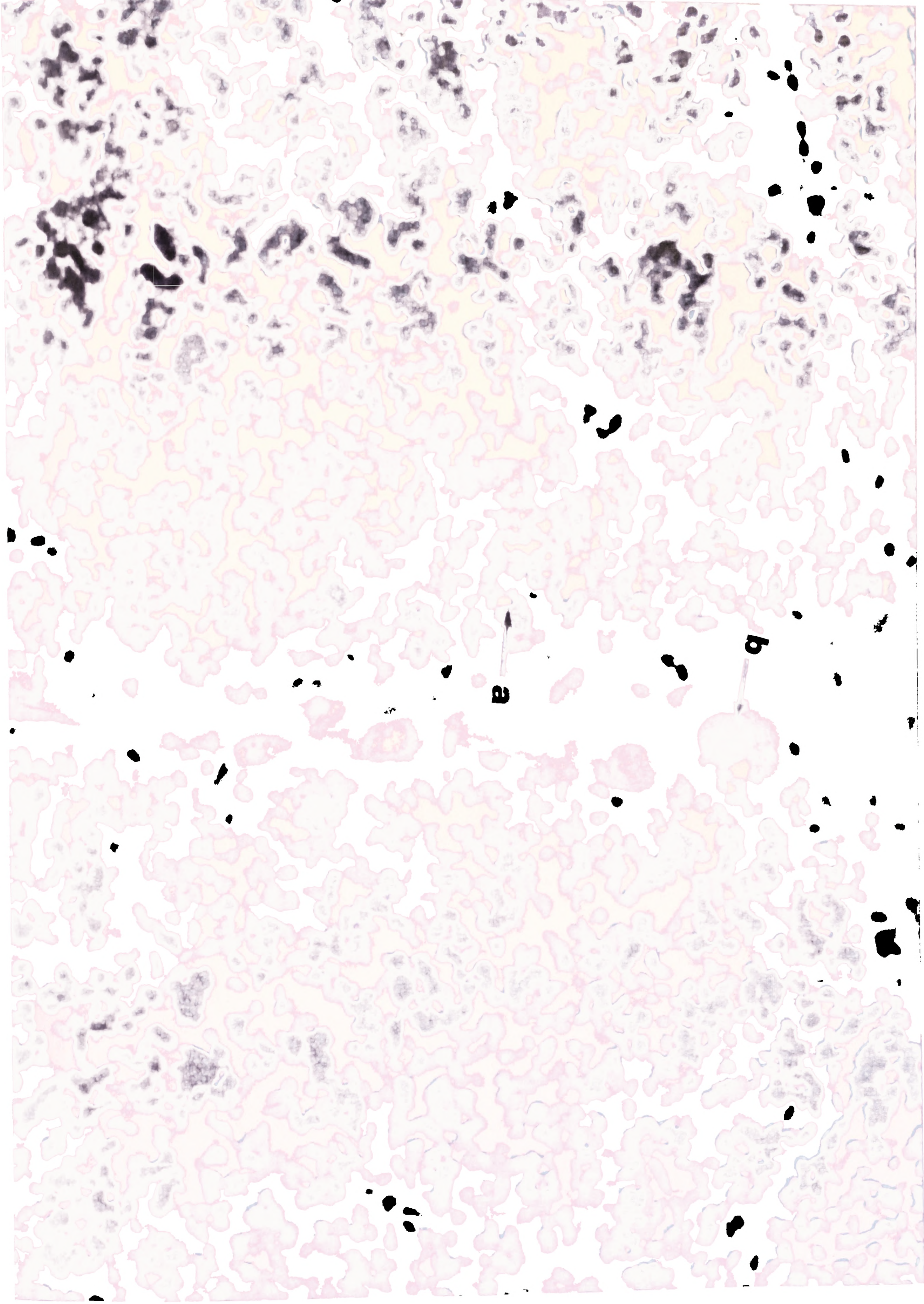
Εικ. 1.30: Όρχεις στο στάδιο ωρίμανσης α)Σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης β)Σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης γ)Σπέρμα δ)Κάψα



Εικ. 1.31: Όρχεις ωριμοί α) Σπέρμα β)Ενδιάμεσο κύτταρο











## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



## 2. Υλικά και μέθοδοι

Για την διεξαγωγή των ιστολογικών τομών των γονάδων χρησιμοποιήθηκαν ψάρια διαφόρων ηλικιών (1+ έως 4+) και μεγεθών (190 gr έως 1280 gr) που προήλθαν από μονάδα εκτροφής ψαριών της Δυτικής Ελλάδας. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις δειγματοληψίες, οι τρεις πρώτες κατά την γεννητική ωρίμανση του είδους (10/9 έως 3/11) και η τέταρτη πριν από την ωρίμανση του είδους (Ιούλιος).

Αναλυτικότερα τα δείγματα με τα βάρη των ψαριών και των γονάδων παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1

<b>Δειγματοληψία</b>	<b>Καθαρό βάρος ψαριών (σε gr)</b>	<b>Βάρος γονάδας (σε gr)</b>
1	455,0	5,0
1	485,0	10,0
1	210,0	3,0
1	190,0	2,0
2	685,0	15,0
2	625,0	10,0
3	760,0	170,0
4	1063,5	1,5
4	1279,0	18,0
4	636,0	3,4/25(βάρος παλιάς γονάδας).
4	409,5	<1
4	338,0	5,5

Πίνακας 2.1: Δειγματοληψία, καθαρό βάρος ψαριών, βάρος γονάδας.

Με τις παραπάνω μετρήσεις υπολογίστηκε ο γοναδοσωματικός δείκτης σύμφωνα με τον τύπο:

$$GSI = w_g/w_f * 100$$

όπου  $W_g$  = το βάρος της γονάδας και  
 $W_f$  = το βάρος του σώματος

Έγινε προσπάθεια τα δείγματα της πρώτης και τέταρτης δειγματοληψίας να έχουν άτομα διαφόρων ηλικιών για τον εντοπισμό πιθανού ερμαφροδιτισμού.



Τα δείγματα μετά τη συλλογή ζυγίζονταν με ακρίβεια 0,1 gr., και μειριόταν το ολικό μήκος τους. Στη συνέχεια ανοίγονταν και αφαιρούνταν οι γονάδες και τα υπόλοιπα εσωτερικά όργανα. Τα ψάρια ζυγίζονταν εκ νέου, για τη λήψη του καθαρού βάρους. Επίσης ζυγίζονταν οι γονάδες και τοποθετούνταν σε μονιμοποιητικό υγρό.

Για να ελεγχθεί η σύγχρονη ή όχι ωρίμανση των γονάδων πάρθηκαν δείγματα για ιστολογικές τομές από το πρόσθιο, μεσαίο και οπίσθιο τμήμα της γονάδας (καθορίζοντας ως πρόσθιο τμήμα το πλησιέστερο στο γεννητικό πόρο).

## 2.1 Μονιμοποίηση

Με την μονιμοποίηση επιτυγχάνεται πήξη των πρωτεϊνών και ανθεκτικότητα των ιστών πράγμα απαραίτητο στην μετέπειτα επεξεργασία τους.

### Πρακτική της μονιμοποίησης

Στις τρεις πρώτες δειγματοληψίες οι γονάδες διατηρήθηκαν σε υγρό Bouin's (πικρικό οξύ για τέσσερα χρόνια. (Σεπτέμβριος - Νοέμβριος 95)

Η σύσταση του μονιμοποιητικού υγρού ήταν :

1. πικρικό οξύ κεκορεσμένο υδατικό διάλυμα 75 ml
2. φορμόλη άκρατη 25 ml
3. οξικό οξύ 5 ml

Στην τέταρτη δειγματοληψία τα δείγματα διατηρήθηκαν σε εξουδετερωμένη φορμόλη.

Πριν αρχίσει η διαδικασία έγκλησης πραγματοποιήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες (7/6 έως 5/7) πλύσεις των δειγμάτων των τριών πρώτων δειγματοληψιών με οινόπνευμα 75° προκειμένου να απομακρυνθεί το υγρό Bouin's.

## 2.2 Επεξεργασία των ιστών στην ιστοκινέτα και τον μικροτόμο

Για να ελεγχθεί η σύγχρονη ή όχι ωρίμανση των γονάδων πάρθηκαν δείγματα για τις ιστολογικές τομές από το πρόσθιο, μεσαίο και οπίσθιο τμήμα της γονάδας (από το γεννητικό πόρο).

Τα τεμάχια των ιστών τοποθετήθηκαν σε ειδικές μικρές πλαστικές κασσετίνες και στη συνέχεια σε ένα μεγάλο καλάθι το οποίο αποτελεί εξάρτημα ενός αυτόματου κινούμενου οργάνου, της





ιστοκινέτας. Το μηχάνημα αυτό εμβαπτίζει τα ιστοτεμάχια στα διάφορα υγρά αφυδάτωσης, διαύγασης και διήθησης για τόσο χρονικό διάστημα όσο αυτό είχε προηγουμένως προγραμματισθεί.



Εικ. 2.2: Ιστοκινέτα της Sandon Citabel 1000

Η ιστοκινέτα που χρησιμοποιήθηκε, στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, είναι της Sandon, Citabel 1000, ενώ παράλληλα υπάρχει ειδικό μηχάνημα δημιουργίας κενού που προσαρμόζεται σε αυτήν και είναι επίσης της Sandon.

Αναλυτικότερα τα υγρά εμβάπτισης είναι:

- 1) **Αφυδάτωση:** αλκοόλες αυξανόμενων βαθμών, πριν την τελική τοποθέτηση σε απόλυτη αλκοόλη για την απομάκρυνση του νερού από τον μονιμοποιημένο ιστό
- 2) **Διαύγαση:** χρησιμοποιήθηκε ξυλόλη και Histo-clear. Σκοπός της διαδικασίας είναι η διευκόλυνση της ανάμειξης της αλκοόλης με την παραφίνη που χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο.





**3)Διήθηση:** Η διαδικασία αυτή, σκοπό έχει τη σκλήρυνση των ιστών ώστε να γίνουν οι τομές στον μικροτόμο.

Για την εμπότιση του ιστού χρησιμοποιήθηκε λιωμένη παραφίνη στους 54 έως 56° C.

Το πρόγραμμα της ιστοκινέτας που ακολουθήσαμε ήταν το εξής: Παραλείψαμε το πρώτο δοχείο και η διαδικασία ξεκίνησε από το δεύτερο ακολουθώντας την παρακάτω πορεία:

<b>2. 70° αλκοόλη</b>	<b>1h</b>
<b>3. 70° αλκοόλη</b>	<b>1h</b>
<b>4. 80° αλκοόλη</b>	<b>1h</b>
<b>5. 90° αλκοόλη</b>	<b>1h</b>
<b>6. 95° αλκοόλη</b>	<b>1h</b>
<b>7. 95° αλκοόλη</b>	<b>1h</b>
<b>8. 95° αλκοόλη</b>	<b>1h</b>
<b>9. Ευλόλη</b>	<b>2h</b>
<b>10. Ευλόλη</b>	<b>2h</b>
<b>11. Παραφίνη</b>	<b>14h</b>

Τα δείγματα παρέμειναν στο στάδιο 11 στην παραφίνη για όλη τη νύχτα (overnight).

Το πρόγραμμα που ακολουθήσαμε για τα αυγά ήταν το ίδιο με τη διαφορά ότι ξεκίνησε από το στάδιο 4, γιατί είχαν παραμείνει σε αλκοόλη 70° ακριβώς μετά το τέλος των πλύσεων με την παραπάνω αλκοόλη.

Μετά το τέλος του κύκλου της ιστοκινέτας, οι κασσετίνες ανοίχθηκαν και οι ιστοί τοποθετήθηκαν προσεκτικά με λεπτή λαβίδα σε ειδικά μεταλλικά καλούπια τα οποία γεμίσαμε με λιωμένη παραφίνη από ειδικό μηχάνημα (εικ.2.3).

Στην κορυφή τοποθετήθηκε ένα ειδικό πλαστικό για την αρίθμηση και αρχειοθέτηση του συγκεκριμένου ιστού. Προκειμένου να κρυώσει η παραφίνη, τα μπλοκ με τους ιστούς τοποθετήθηκαν σε ψυκτική πλάκα με θερμοκρασία κοντά στους 0° C (εικ.2.3).

Προτού αρχίσουμε να παίρνουμε τομές από το μικροτόμο είχαμε ετοιμάσει το λουτρό μια ειδική συσκευή μέσα στην οποία τοποθετήθηκε νερό 200 ml για κάθε 10 gr ζελατίνη. Επίσης προστέθηκαν σταγόνες γλυκερίνης. Φροντίσαμε η θερμοκρασία να μην ξεπερνά τους 35° C γιατί σε αντίθετη περίπτωση η παραφίνη λιώνει στο νερό και οι τομές καταστρέφονται.(Εικ.2.4).

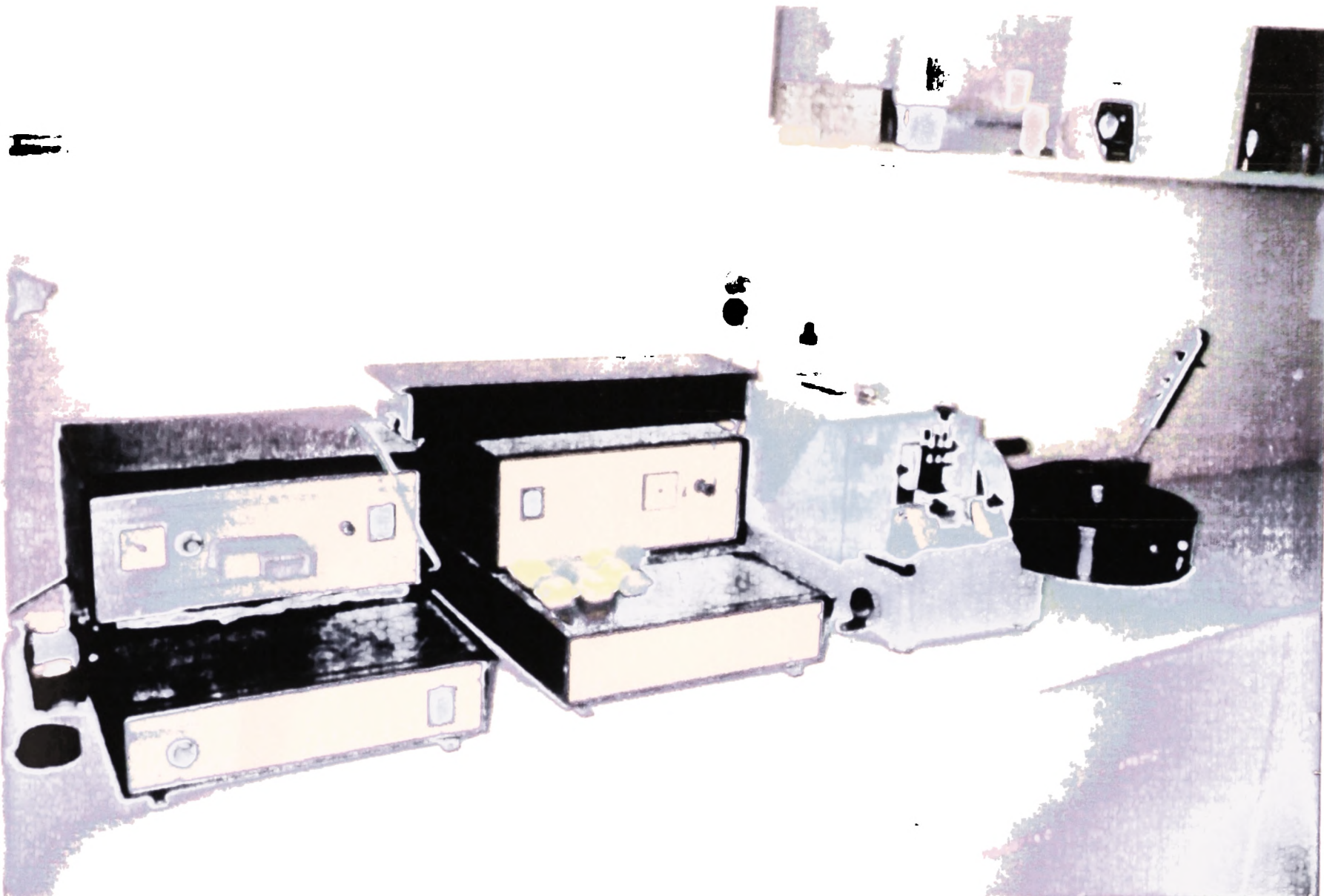


Αφού πήραμε τομές στο μικροτόμο στα 5μm, τις τοποθετήσαμε στο θερμό λουτρό για να πάρουν καλύτερο σχήμα. Έγιναν περίπου 5-15 τομές από κάθε τμήμα ιστού. Στη συνέχεια βυθίσαμε μέχρι τη μέση (πλάγια) μια αντικειμενοφόρο πλάκα κάτω από την τομή και την ανεβάσαμε απότομα. Με αυτόν τον τρόπο η τομή μένει επάνω στην αντικειμενοφόρο. Ακολούθως, οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε οριζόντια θέση στον κλίβανο σε θερμοκρασία 60°C για 20 λεπτά περίπου για να λιώσει το φιλμ της παραφίνης που περιβάλλει τους ιστούς και να σταθεροποιηθούν επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

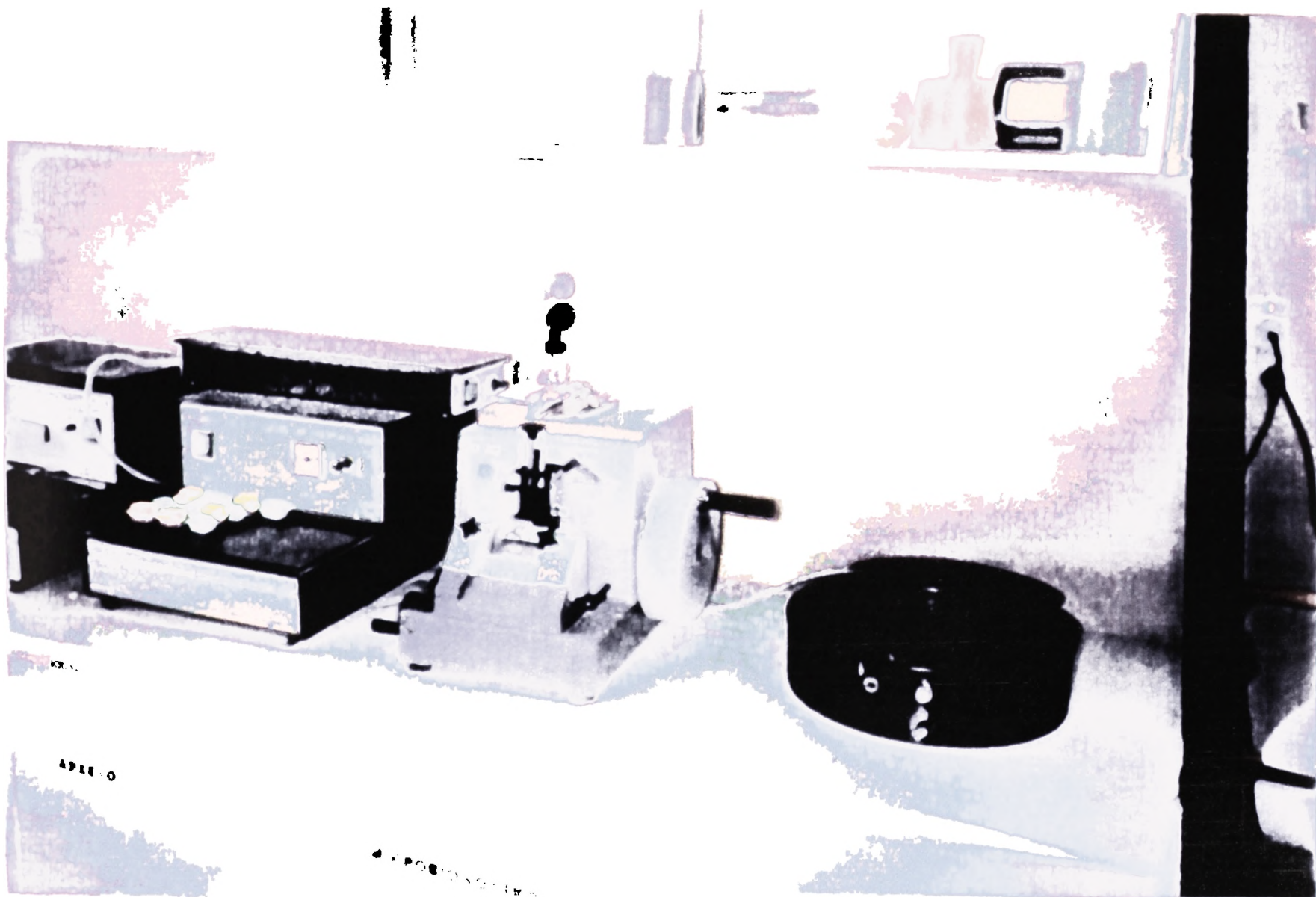
Μετά το στέγνωμα οι τομές ήταν έτοιμες για την περαιτέρω επεξεργασία χρώσης.







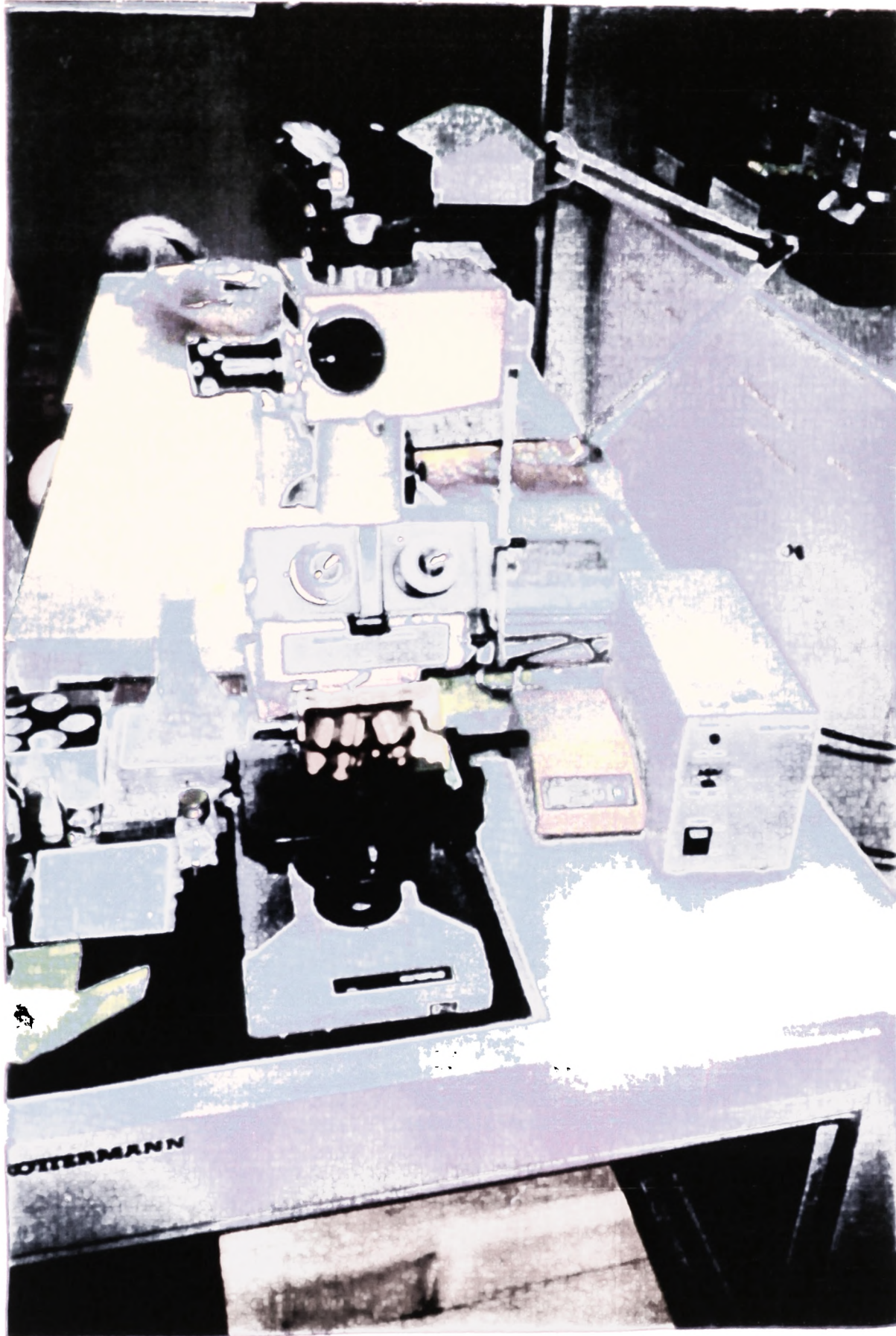
Εικ. 2.3: Αντλία έκχυσης παραφίνης- ψυχρή πλάκα μικροτόμος (Shandon hypercut)



Εικ. 2.4: Μπάνιο απεσταγμένου νερού







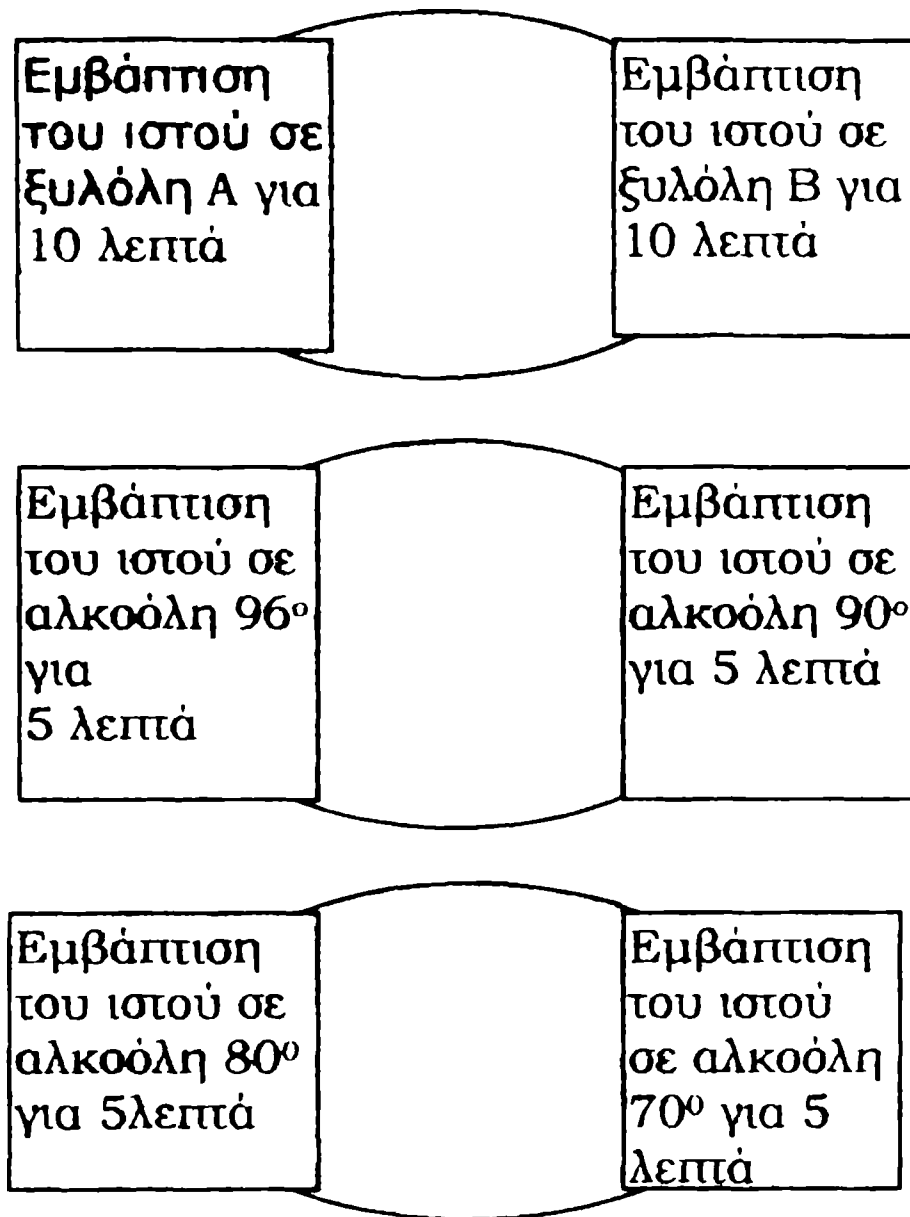
Εικ.2.5 Μικροσκόπιο μελέτης τοπίων (Olympus BH2)



### 2.3 Χρώσεις

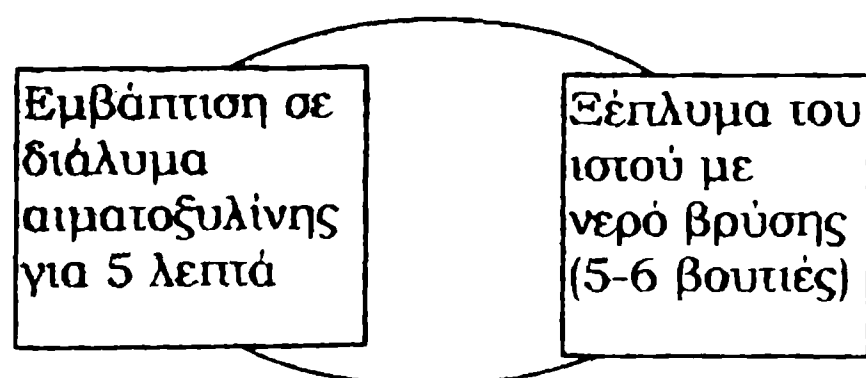
Πριν από την εφαρμογή οποιασδήποτε μεθόδου χρώσης εφαρμόζεται αποπαραφίνωση κατιούσα με σκοπό η παραφίνη που είχαν οι τομές να διαλυθεί και να ενυδατωθεί βαθμιαία ο ιστός, λόγω του ότι οι περισσότερες χρωστικές είναι υδατικά διαλύματα.

Η αποπαραφίνωση κατιούσα περιλαμβάνει τα εξής στάδια:



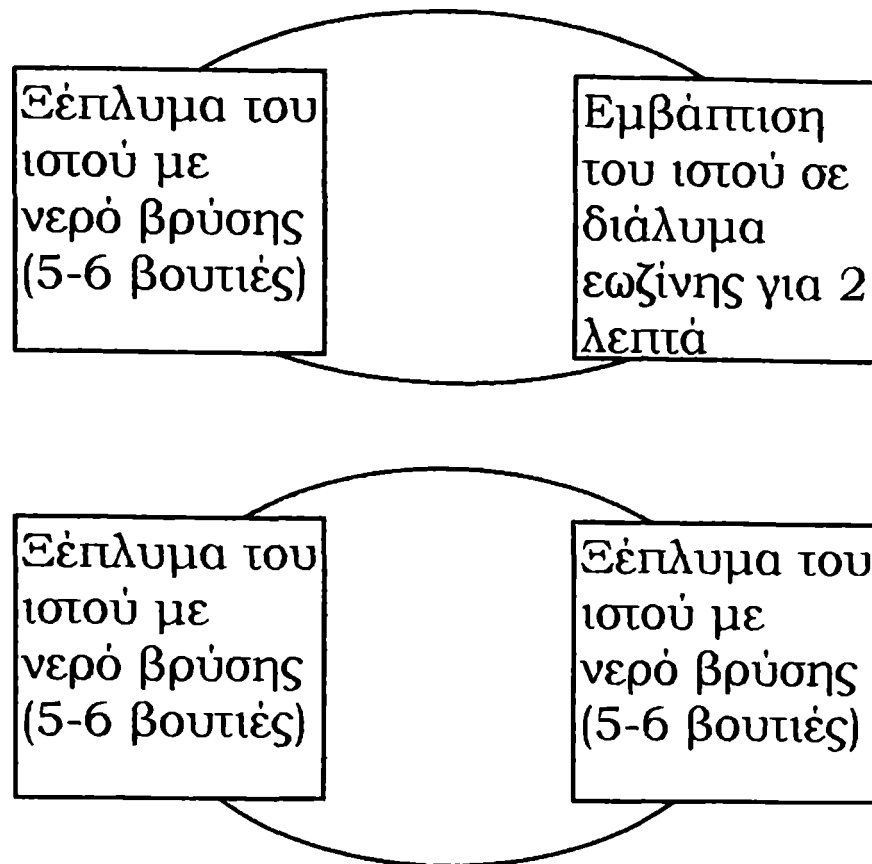
Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η χρώση αιματοξυλίνης-εωζίνης. Με την τεχνική αυτή οι πυρήνες βάφονται μπλε ενώ το κυτταρόπλασμα και ο συνδετικός ιστός ερυθρά.

Διαδικασία βαφής με χρωστικές αιματοξυλίνης-εωζίνης:



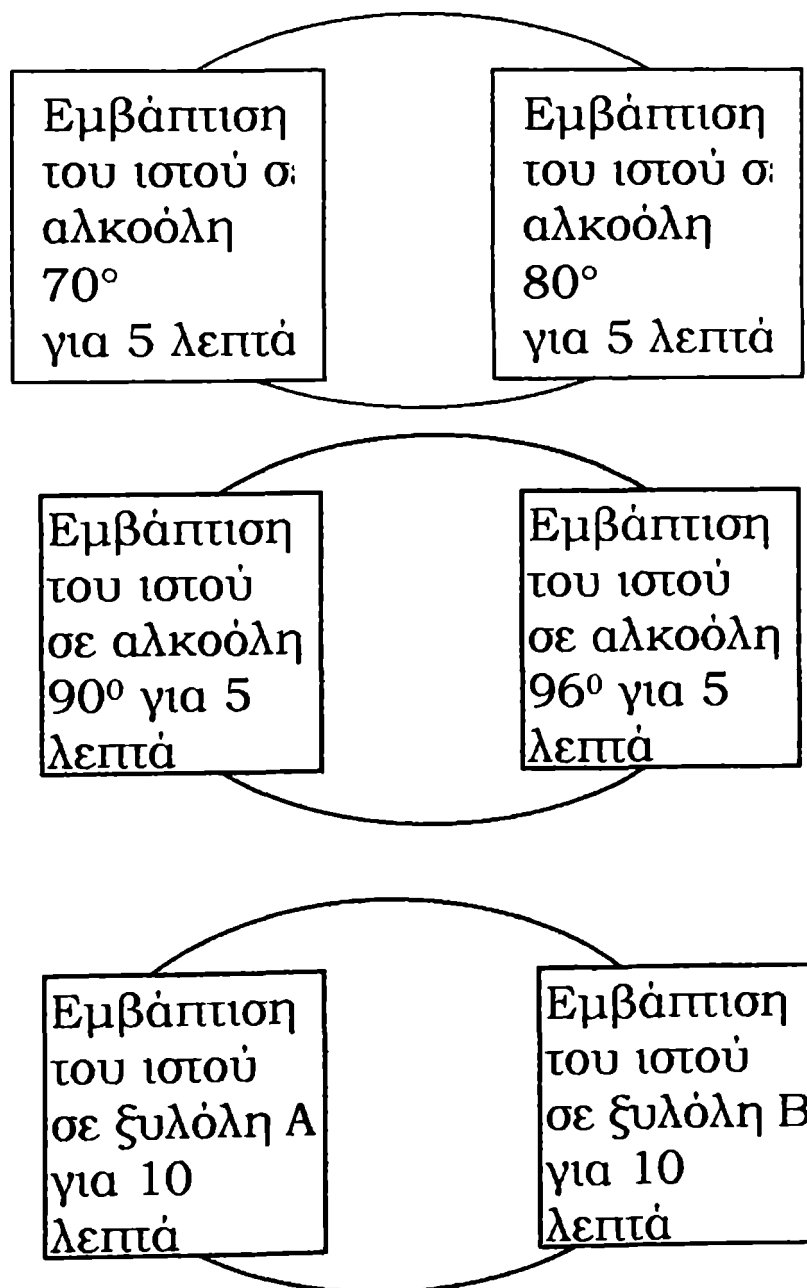






Μετά το τέλος των χρώσεων εφαρμόστηκε αποπαραφίνωση ανιούσα με σκοπό την αφυδάτωση και διαύγαση των τομών πριν φτάσουν στο τελικό στάδιο της παρατήρησης στο μικροσκόπιο.

Τα στάδια της αποπαραφίνωσης ανιούσας είναι τα εξής:











0,8	5	3	5	3	3,6	3,5	1,1	6,2		0,9	0,6	0,9	1,1				0,4
1,5	4,4	4	9	4	3,8	2,9	2,2	7		1,3	1	0,9	0,9				0,8
1	4,8	3,2	2,1	2	3,2	1,5	3	7,3		1,8	0,9	1	1				0,9
0,7	4,5	1,2	2,4	1,9	3,5	1,2	3,2	8,2		1,5	1,5	0,4	0,8				1
1,5	4	2	2	1,1	3,6	0,9	1,1	6,6		1,5	1,6	0,9	1				1
1,1	6,2	2,9	3,9	1,5	3,2	1,9	1,5	3		1,3	1,7	0,8	0,7				1
1	3,7	1,3	2,5	2	2,2	3,4	1,5	3,2		1	1,5	1	0,9				0,9
0,8	3,2	1,5	1,4	2	3,5	6,5	1,9	3,2		1	1,1	0,9	0,9				0,9
1	4,5	1	2,2	1,9	3	7	2	1,1		1	0,9	0,5	0,8				0,9
2	4	1,6	2,2	2,2	3,5	7	0,6	3,3		1,7	0,8	0,9	0,7				0,8
1	3,6	1,1	1,5	2,2	2	5,5	0,8	2,9		0,9	1,3	1,4	0,5				0,8
0,5	2,5	1,4	4,5	2,5	2,5	8	4,1	0,9		0,9	1,1	0,9	0,6				0,6
1,4	2,5	1,6	3,5	2,6	2	7	2,3	2,6		1	1,1	0,7	0,3				0,4
1,7	2	2	2	2,9	2	3,9	7	4		1,2	1	1,2	0,2				1
2	3,4	1,9	2,1	1,6	2	4,5	8	0,9		1,4	0,8	1,4	1				0,8
1,3	1,5	2,5	4	6,9	2,2	5	7,5	1,5		1,3	1,9	1,2	1,2				0,9
1,2	1,5	1,7	1,9	4	0,9	5,5	5,8	1		1,2	2	x <sup>2</sup> <sub>5</sub>	0,5				0,7
1	1	1,6	3	2,6	2	7,5	7,4	0,9		1,1	0,5		0,4				0,6
1	1,2	2	2,1	3	2		7,6	x <sup>2</sup> <sub>5</sub>		1,2	0,4		0,3				0,5
1,4	1,1	1,6	2,5	1	1,7	4,5	6,5			1,4	0,3		0,8				x <sup>2</sup> <sub>5</sub>
6,5	1,5	1,4	4,5	3	2,2	3	1,4			1,4	0,2		0,9				
3,2	1,3	1,2	1,8	2,4	1,5	3,5	1,2			0,9	0,8		0,7				
4	0,7	1	5,5	3	2,2	4	2,5			1,3	0,6		0,5				
3,8	1	1,5	2,9	2,6	1,7	2,5	2			1,5	0,6		0,4				
5,2	1	4,6	6	2,3	2	6,7	1,1			1,3	0,5		0,3				
4	1,4	2,8	3,5	2,4	4,5	6,5	2			0,8	0,4		0,2				
5	1,2	1	3,5	2,8	3	6	1,1			0,4	0,3		0,9				
2,6	1,3	2,5	3,6	3,4	1	3	1,5			1,5	1,6		0,8				









1	3, 9	6, 2																		
0, 7	5, 9	4, 6																		
1, 4	3, 5	1, 7																		
1, 7	5, 8	1, 4																		
0, 5	4, 7	1, 3																		
0, 4	3, 2	1, 2																		
0, 3	3, 4	1, 6																		
0, 4	4, 5	1, 5																		
0, 4	3, 2	1																		
0, 3	0, 4	1, 6																		
1	0, 5	1, 2																		
0, 1	0, 3	x2 5																		
0, 1	0, 6																			
0, 7	0, 8																			
x2 5	1, 1																			
	0, 7																			
	0, 6																			
	0, 9																			
	0, 8																			
	0, 7																			
	0, 6																			
	1, 1																			
	0, 4																			
	1, 5																			
	0, 9																			
	0, 2																			
	0, 9																			
	2																			
	0,																			









## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



### 3. Αποτελέσματα

Στον πίνακα 3.A φαίνονται τα βάρη, η ηλικία και το φύλο των ατόμων που εξετάστηκαν καθώς και το νωπό βάρος των γονάδων. Η αναλογία των φύλων στα δείγματα ήταν περίπου 50% αρσενικά και 50% θηλυκά σε κάθε ηλικία δηλαδή τόσο σε ώριμα όσο και σε ανώριμα.

**Πίνακας 3.A:** Ηλικία, φύλο, ολικό, καθαρό βάρος ψαριού και βάρος γονάδας (σε gr)

Δειγματοληψία	Δείγμα	Ηλικία	Φύλο	Βάρος ψαριού (gr)	Βάρος γονάδας (gr)
1	1(10/9)	2+	A	455,0	5,0
1	2(10/9)	2+	Θ	485,0	10,0
1	3(10/9)	1+	Θ	210,0	3,0
1	4(10/9)	1+	A	190,0	2,0
2	5(16/10)	3+	A	685,0	15,0
2	6(16/10)	3+	A	625,0	10,0
2	7(3/11)	3+	Θ	760,0	170,0
3	9(26/7)	4+	Θ	1279,0	18,0
3	10(26/7)	3+	Θ	636,0	3,4/25,0*
3	12(26/7)	2+	Θ	438,0	5,5
4	8(26/7)	4+	A	1063,5	1,5
4	11(26/7)	2+	A	409,5	<1,0

\* Βάρος παλιάς γονάδας.

Στον πίνακα 3.B φαίνεται ο γοναδοσωματικός δείκτης όπως υπολογίστηκε από τις μετρήσεις του πίνακα 3.A.

**Πίνακας 3.B:** Γοναδοσωματικός δείκτης

ΔΕΙΓΜΑ	GSI	ΔΕΙΓΜΑ	GSI
1	0,01	7	0,22
2	0,02	8	0,00141
3	0,014	9	0,014*
4	0,01	10	0,00535/0,039
5	0,022	11	>0,0024
6	0,016	12	0,016*

\* Οι τιμές αυτές δεν είναι αντιπροσωπευτικές γιατί παρατηρήθηκε παλιά και νέα γονάδα μαζί. Η παλιά γονάδα είχε κρατήσει ακόμα ιστό που ήταν ενεργός και είχε πρώιμα ωκύτταρα από την προηγούμενη χρονιά.

Στον πίνακα 3.Γ φαίνεται η διακύμανση του γοναδοσωματικού δείκτη ανάλογα με την ηλικία και την περίοδο δειγματοληψίας.





**Πίνακας 3.Γ: Διακύμανση γοναδοσωματικού δείκτη**

Ηλικία ψαριών	Περίοδος Ιουλίου	Περίοδος αναπαραγωγής
Ανώριμα (1+)	0,14-0,20	1,05-1,43
Ωριμα (2+ - 4+)	1,41-3,39	2,06-22,37

Με βάση τη διακύμανση του γοναδοσωματικού δείκτη το είδος φαίνεται να προσεγγίζει τα γονοχωριστικά είδη σε αντίθεση με το συνήθη ερμαφροδιτισμό διαφόρων τύπων που παρουσιάζει η οικογένεια Sparidae (Pankhurst 1998). Οι υψηλότερες τιμές του δείκτη εμφανίζονται το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Οκτωβρίου και το πρώτο του Νοεμβρίου, ενώ οι χαμηλότερες όπως ήταν αναμενόμενο εμφανίζονται στα δείγματα του Ιουλίου.

Τα στάδια των ωοκυττάρων καθορίστηκαν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Pankhurst 1998, Hibiya 1982). Έτσι, έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα με πυρήνα που περιέχει πυρηνίσκους χρωματίνης σε όλο το χώρο του (πρώιμο στάδιο) ή στην περιφέρεια του (μεταγενέστερο) (εικ.3.1) είναι τα χαρακτηριστικά ανώριμων ωοκυττάρων. Τα μικρότερα ωοκύτταρα είναι σφαιρικά με μεγάλο πυρήνα και κυτταρόπλασμα πυκνά χρωματισμένο. Τα μεγαλύτερα ωοκύτταρα είναι ωσειδή, το κυτταρόπλασμα βάφεται αραιότερα απ'ότι στο πρώιμο στάδιο και ο πυρήνας όπως προαναφέρθηκε έχει τους πυρηνίσκους χρωματίνης τοποθετημένους στην περιφέρεια του. (Εικ.3.2). Ανάμεσα στα ωοκύτταρα και στην φολίδα, σε αυτό το στάδιο εμφανίζεται μια λεπτή εωζονοφιλική μεμβράνη (πρόδρομος της ακτινωτής ζώνης- zona radiata). (Εικ.3.3).

Στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα (στάδιο 1) αρχίζει η αποθήκευση λεκίθου στο αβγό (βιτελογέννεση). Η συσσώρευση ξεκινά από την περιφέρεια του κυτταροπλάσματος με μικρά εωζονοφιλικά κοκκία που απλώνονται σταδιακά έως τον πυρήνα. (Εικ. 3.4). Το φολιδικό στρώμα μεγαλώνει καθώς αυξάνονται τα λεκιθικά κοκκία. Τα κύτταρα θήκης δεν αλλάζουν αλλά σχηματίζουν σιβάδα περιφερειακά της φολίδας. Το κυτταρόπλασμα σε αυτό το στάδιο είναι εωζονοφιλικό. (Εικ.3.5). Στο επόμενο στάδιο (2) η βιτελογέννεση συνεχίζεται. Πληθώρα εωζονοφιλικών κοκκίων γεμίζουν το κυτταρόπλασμα. (Εικ.3.6,3.7,3.8).

Στο τρίτο στάδιο σχηματισμοί όπως σταγονίδια ελαίου συνενώνονται σε κάποιο βαθμό. (Εικ. 3.8).

Επιπλέον στα δείγματα παρατηρήθηκε πληθώρα αιρητικών ωοθυλακίων, τα οποία όμως δεν φαίνεται ότι επηρέασαν την αναπαραγωγή. (Εικ.3.9,3.10,3.11,3.12).

Στα θηλυκά άτομα της τρίτης δειγματοληψίας βρέθηκε μαζί με τη νέα γονάδα και ιστός από τη γονάδα της προηγούμενης αναπαραγωγικής περιόδου. (Εικ.3.13,3.14). Προφανώς τα άτομα αυτά δεν κατάφεραν να απελευθερώσουν τα γεννητικά τους προϊόντα με αποτέλεσμα να προσπαθήσουν να τα επαναπορροφήσουν. Άτομα αυτής της κατηγορίας συχνά οδηγούνται στο θάνατο (προσωπικές παρατηρήσεις).



### 3.1 Μεγέθη και κατανομή των κυττάρων

Στον πίνακα 3.Δ φαίνεται το μέσο μέγεθος των διαφόρων σταδίων των ωοκυττάρων καθώς και οι αποκλίσεις που παρουσιάζουν από αυτό. Σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) που εφαρμόστηκε, κάθε στάδιο εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα (κριτήριο Tukey).

**Πίνακας 3.Δ:** Μέσοι διάμετροι σταδίων ωοκυττάρων.

ΣΤΑΔΙΟ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ	ΜΕΣΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ( $\mu\text{m}$ ) **	ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΟΡΙΟ *	ΑΝΩΤΕΡΟ ΟΡΙΟ *	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΣΩΝ
ανώριμα	68,060 a	62,166	73,955	4,244
Αναπτυσσόμε-να στάδιο 1	121,981 b	116,087	127,875	4,244
Αναπτυσσόμε-να στάδιο2	351,225 d	345,331	357,120	4,244
Αναπτυσσόμε-να στάδιο 3	410,090 e	404,195	415,984	4,244
ατρητικά	199,732 c	193,838	205,627	4,244

\* Τα όρια αυτά βασίζονται στη διαδικασία της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher (LSD).

\*\* Οι τιμές στη στήλη οι οποίες ακολουθούνται από διαφορετικό γράμμα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P < 0.05$ ) σύμφωνα με το κριτήριο Tukey.

Η κατανομή των ωοκυττάρων στα δείγματα που εξετάστηκαν φαίνεται στα ιστογράμματα της εικόνας 3.15.



### 3.2 Ωρίμανση της γονάδας σε θηλυκά και αρσενικά δείγματα.

Στα δείγματα που εξετάστηκαν βρέθηκαν αποκλειστικά αρσενικά ή θηλυκά κύτταρα . Αξίζει να σημειωθεί πως αυτά προσδιορίστηκαν τόσο σε άτομα ώριμα, μικρού και μεγάλου σωματικού βάρους όσο και σε άτομα ανώριμα.

Η ωρίμανση στη γονάδα φαίνεται να είναι ασύγχρονη με το μπροστινό τμήμα να έχει τη μεγαλύτερη ωρίμανση (Εικ.3.5,3.6) αλλά και την παρουσία ανώριμων κυττάρων ανάμεσα στα ώριμα (Εικ.3.6) γεγονός που διακρίνεται κυρίως σε άτομα με γεννητική ωρίμανση και όχι στα ανώριμα.

Στις εικόνες 3.6&3.9 επίσης φαίνεται η διαφορά των κυττάρων ώριμων θηλυκών Σεπτεμβρίου (γεννητική ωρίμανση) και Νοεμβρίου (παρουσία και ατρητικών ωοθυλακίων).

Σε ώριμα αρσενικά άτομα περιόδου Σεπτεμβρίου, παρατηρήθηκε τόσο σπέρμα όσο και σπερματογόνα κύτταρα. (Εικ.3.15B,3.15Γ). Επίσης η παρουσία σπερματογονίων ήταν έντονη κυρίως στο οπίσθιο τμήμα της γονάδας. (Εικ.3.16<sup>A</sup>,3.16B,3.16Γ).

Σε άτομα που πήραμε στα μέσα Οκτωβρίου βρέθηκε κυρίως σπέρμα. (Εικ. 3.18A1,3.18A2,3.18A3,3.18B,3.18Γ). Ήταν έντονη σε όλο το μήκος του όρχι η ασύγχρονη ωρίμανση της γονάδας, καθώς ήταν έντονη η διαφοροποίηση ανάμεσα στο πρόσθιο, μεσαίο και οπίσθιο τμήμα της γονάδας. (Εικ.3.17A,3.17B,3.17Γ).

Κατά την δειγματοληψία του Ιουλίου παρατηρήθηκαν μόνο ανώριμα σπερματογόνα. (Εικ.3.19A.& 3.20A,3.20Γ).

Στα θηλυκά άτομα της τρίτης δειγματοληψίας (δείγμα 10) βρέθηκε μαζί με τη νέα γονάδα και ιστός από τη γονάδα της προηγούμενης αναπαραγωγικής περιόδου. (Εικ.3.10,3.13).

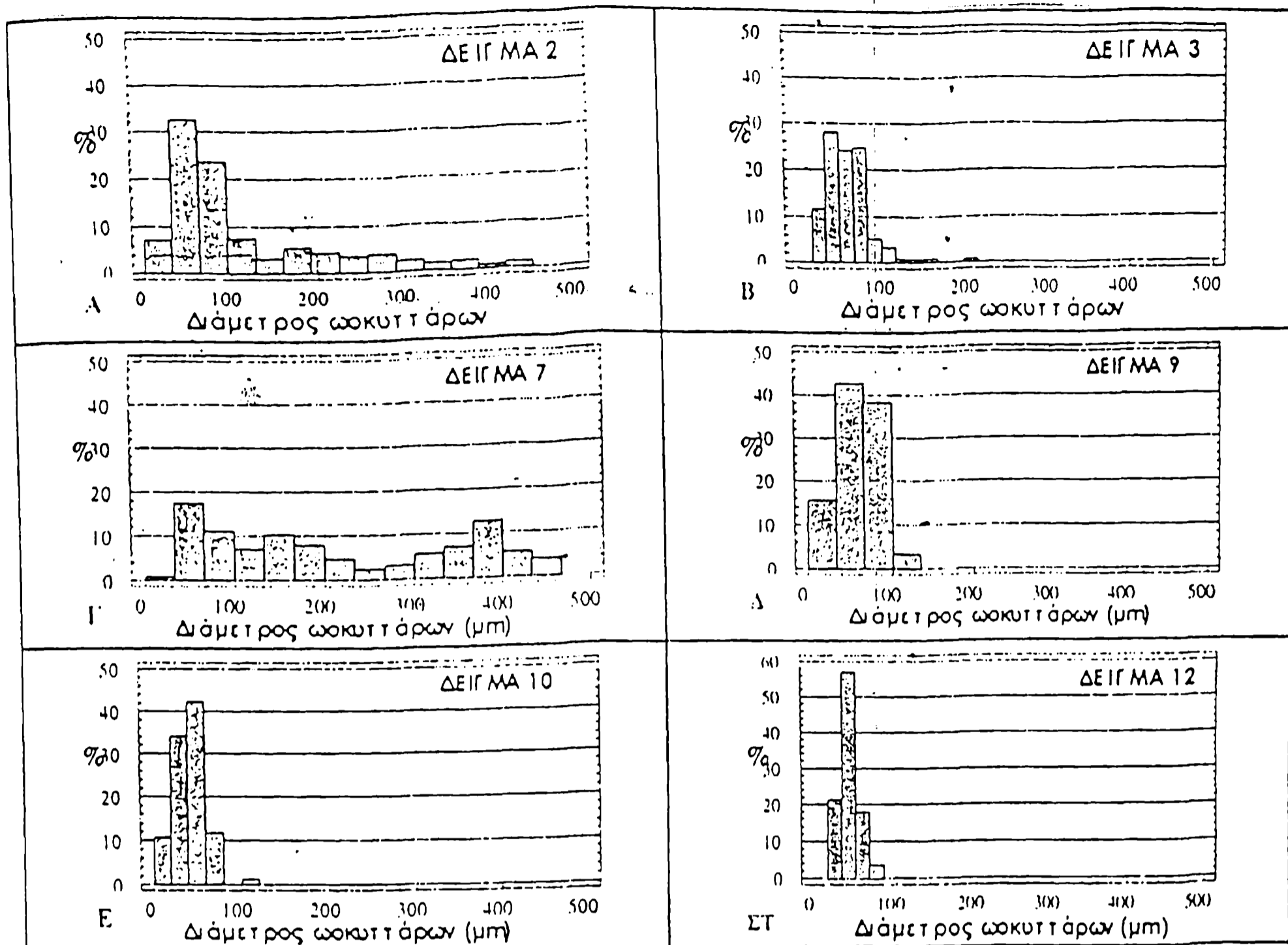
Προφανώς τα άτομα αυτά δεν κατάφεραν να απελευθερώσουν τα γεννητικά τους προϊόντα με αποτέλεσμα να τα επαναπορροφήσουν. Στη περίπτωση αυτή της μη απελευθέρωσης όλων των κυττάρων τα υπόλοιπα αβγα μετατρέπονται σε ατρητικά και απορροφώνται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τα ατρητικά ωοθηλάκια εμφανίζονται σε μικρό ποσοστό από το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου και φτάνουν να αποτελούν την κύρια μάζα της γονάδας τον Ιούλιο. Τα ατρητικά ωοθηλάκια των ψαριών δεν φαίνεται να επηρεάζουν την αναπαραγωγή. Αυτό σε συνδυασμό με τα κυτταροχημικά ευρήματα φαίνεται ότι τα ατρητικά ωοθηλάκια των ψαριών δεν έχουν καμιά ενδοκρινική δραστηριότητα και δεν μπορούν να συγκριθούν με τα *corpora lutea* των θηλαστικών.

Κατά την ανατομία στο δείγμα 9(26/7) παρατηρήθηκε ότι το συκώτι ήταν κόκκινο, η χολή μεγάλη και αρκετό λίπος. Ενώ στο δείγμα 12(26/7) παρατηρήθηκε μόνο ελάχιστο λίπος.

Στο δείγμα 10(26/7) παρατηρήθηκαν τα υπολείμματα της παλιάς γονάδας.





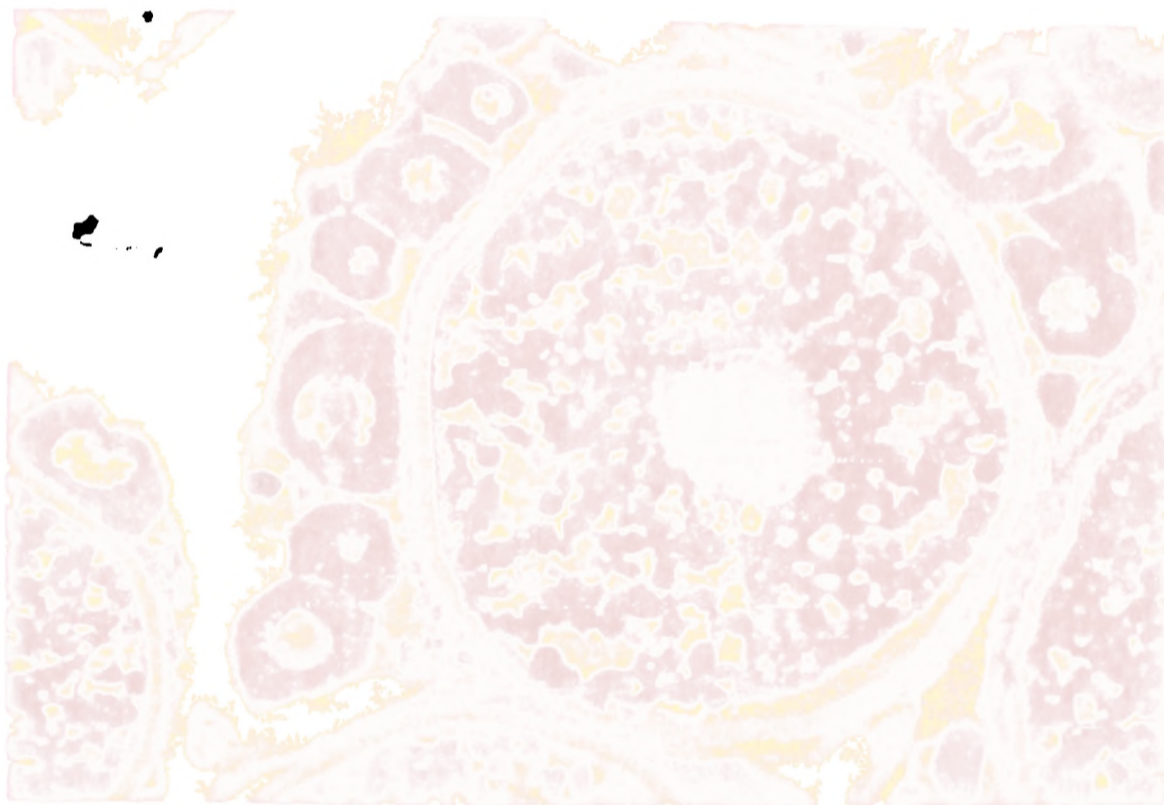
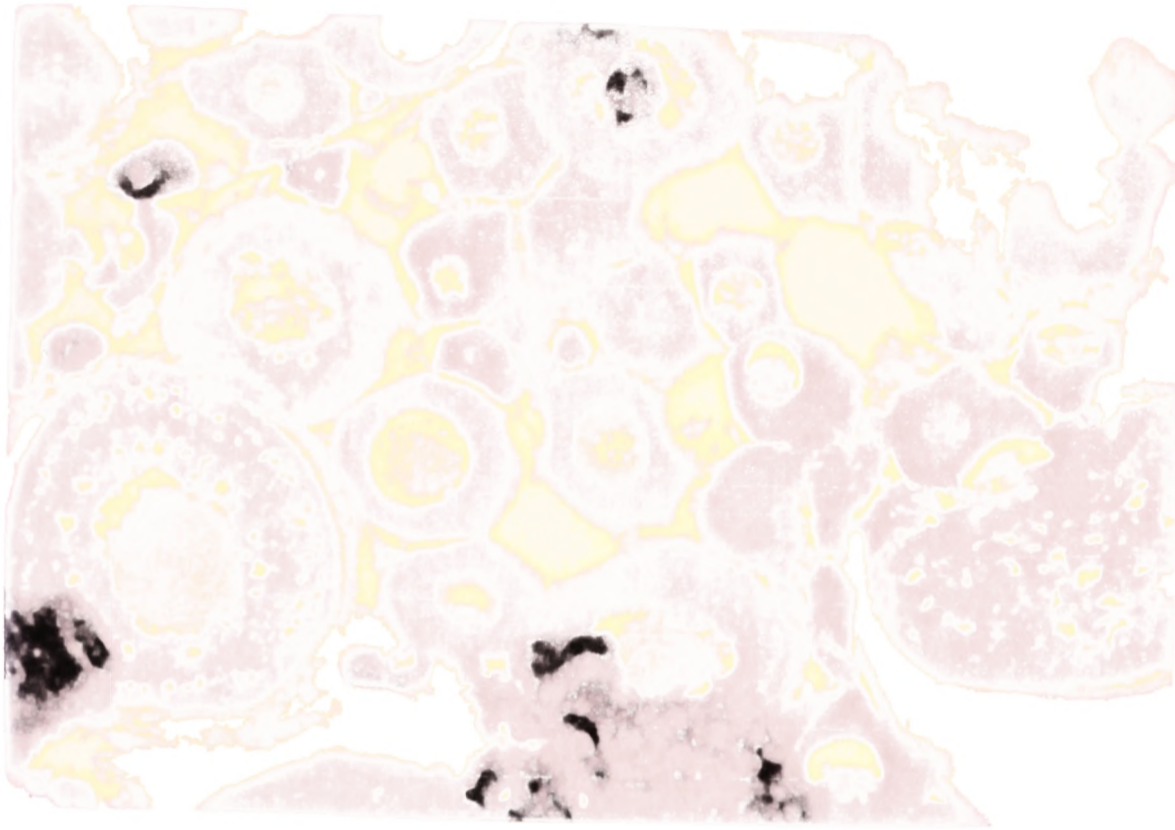


Εικόνα 3.14 Ιστογράμματα κατανομής των μεγεθών των ωοκυττάρων στις γονάδες θηλυκών ατόμων διαφόρων μεγεθών του είδους *Rivipazzo rivipazzo* στις περιόδους δειγματοληψίας.

Κατά την δειγματοληψία του Ιουλίου (Εικ. 3.15Δ, 3.15Ε, 3.15ΣΤ) ποσοστό αθροιστικής συχνότητας μεγαλύτερο του 90% ανήκει στο στάδιο των ανώριμων ωοκυττάρων, ανεξάρτητα από τα μέγεθος του ψαριού (0.3-1.3 Kg). Εντούτοις τα μεγαλύτερα ψάρια (1.3 Kg) εμφανίζουν υψηλότερη διασπορά προς μεγαλύτερα μεγέθη (Εικ. 3.15Δ) που πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα τα ωοκύτταρα αυτά να φτάσουν νωρίτερα στην ωριμότητα ή να δώσουν μεγαλύτερα ώριμα ωοκύτταρα. Η κατανόμη στο δείγμα 3 (Εικ. 3.15Β) εμφανίζεται παρόμοια με αυτή της περιόδου Ιουλίου, αν και πρόκειται για δείγμα στην αρχή της αναπαραγωγικής περιόδου (Σεπτέμβριος), γεγονός που αποδίδεται στο μικρό μέγεθος των ψαριών (ανώριμα άτομα) τα οποία δεν πρόκειται να αναπαραχθούν στην ίδια περίοδο.

Στις εικόνες 3.15Α και 3.15Γ φαίνεται η εξέλιξη της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, με εμφάνιση και μεγαλύτερων μεγεθών αβγών στο δείγμα, κατανομή που έχει παρατηρηθεί και σε άλλα θαλάσσια είδη (Macer, 1974).



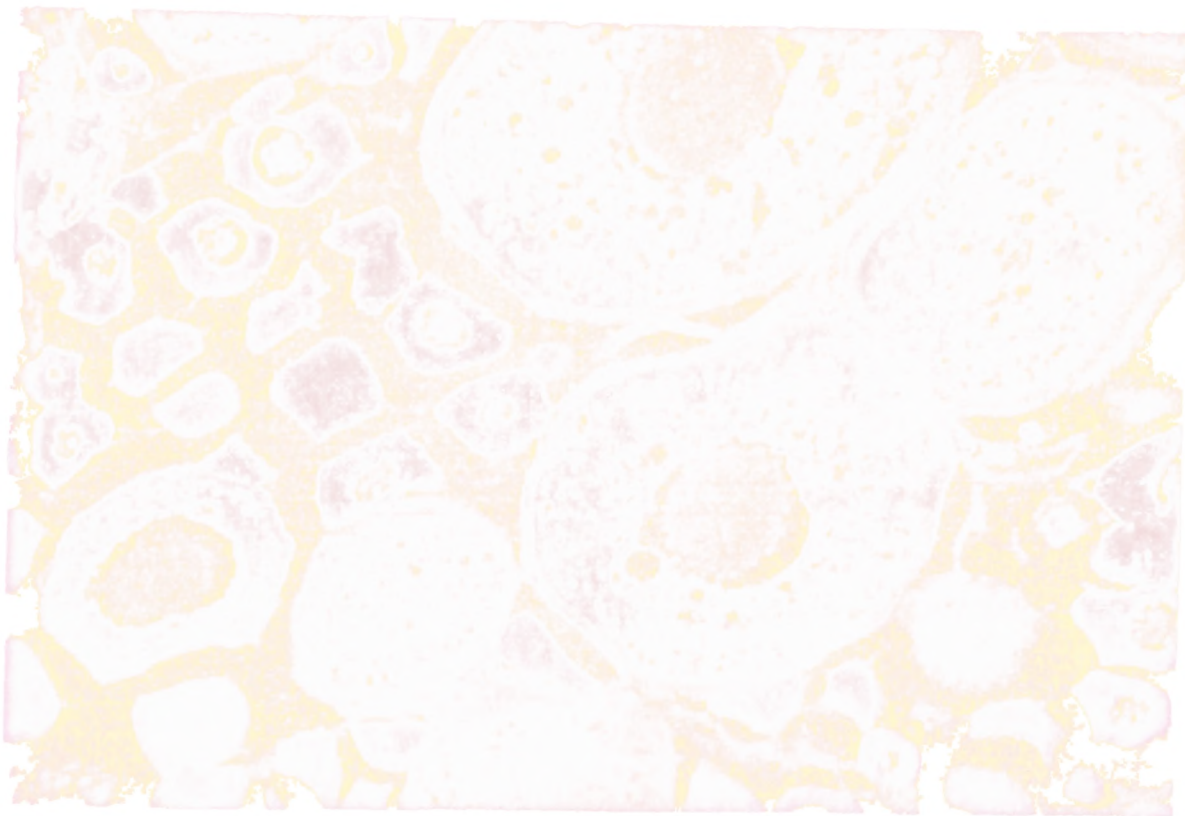
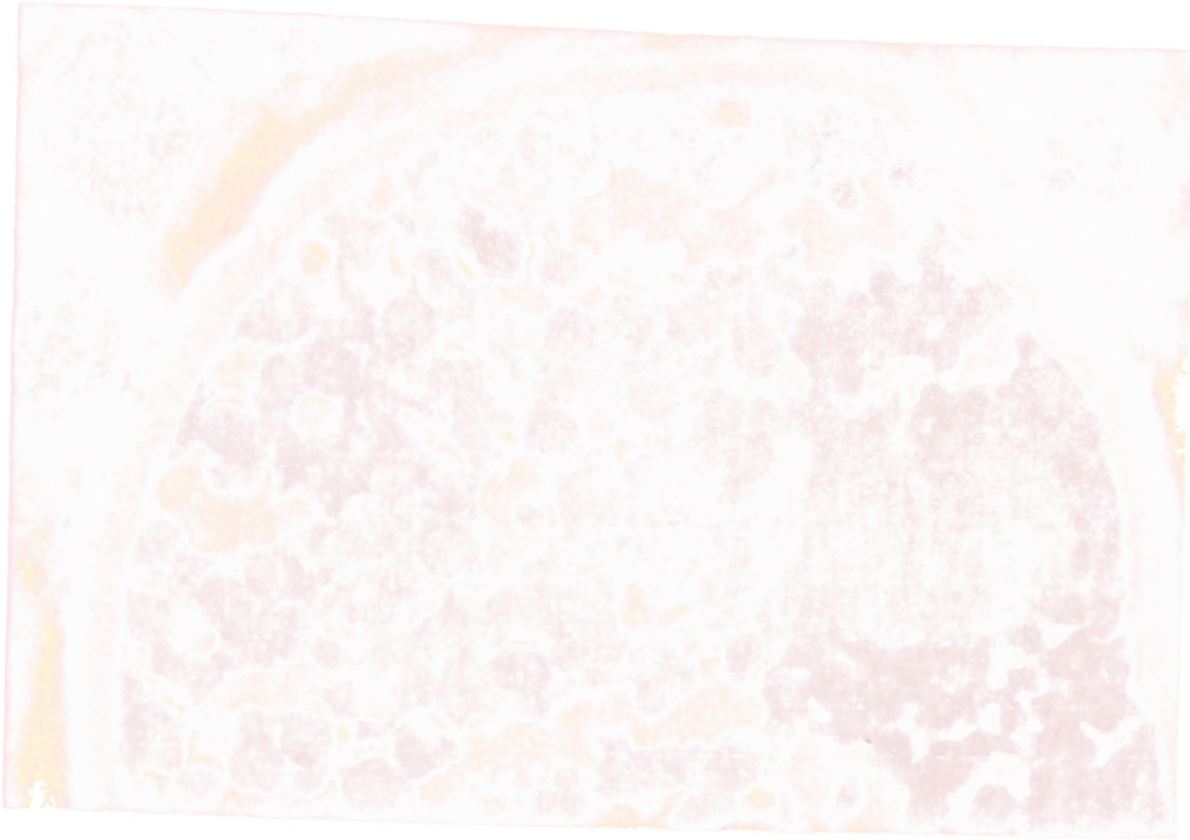


**Εικ. 3.1:** Θηλυκή γονάδα, κυρίως ωοκύτταρα σε πρώιμα στάδια τα οποία έχουν έντονο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα με πυρήνα που περιέχει πυρηνίσκους χρωματίνης σε όλο το χώρο του (πρώιμο στάδιο) ή στην περιφερειά του (μεταγενέστερο). Παρατηρείται η ασύγχρονη ανάπτυξη της γονάδας. (Μεγέθυνση  $\times 100$ ).

**Εικ. 3.2:** Θηλυκή γονάδα με ασύγχρονη ανάπτυξη. Γύρω από το ώριμο ωοκύτταρο υπάρχουν πολυγωνικά ωοκύτταρα με έντονα βαμμένο κυτταρόπλασμα καθώς και μεγαλύτερα ωοκύτταρα με λιγότερο έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και πυρηνίσκους χρωματίνης τοποθετημένους στην περιφέρεια του πυρήνα των ωοκυττάρων. (Μεγέθυνση ).





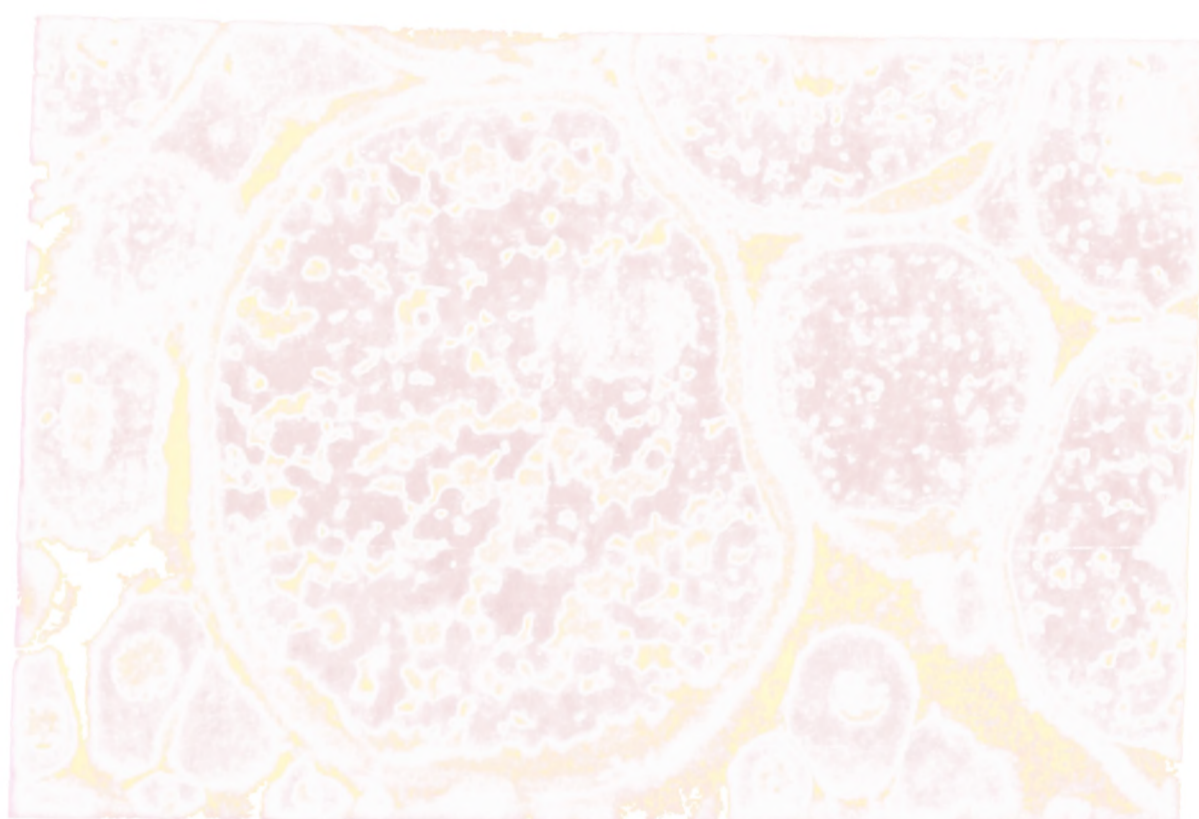
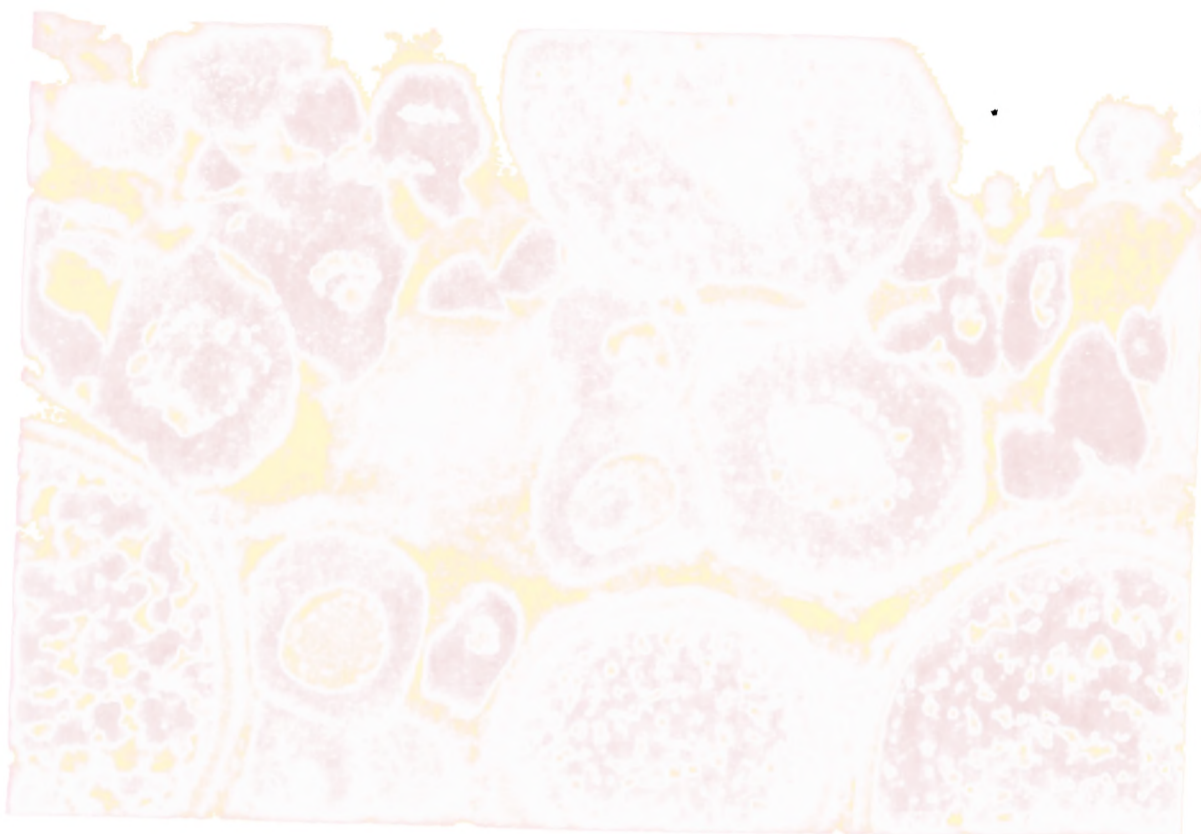


**Εικ.3.3:** Ιστολογικά χαρακτηριστικά ωοκυττάρου του *Puntazzo puntazzo* σε μεγέθυνση (?). Παρουσία της κυτταρικής μεμβράνης ως ακτινωτή ζώνη καθώς και συννεομένων σταγονιδίων λιπιδίων που φαίνονται σαν κενοί χώροι.

**Εικ.3.4:** Αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα *Puntazzo puntazzo* με παρουσία λιπιδικών σταγονιδίων γύρω από τον πυρήνα.(Μεγέθυνση ).





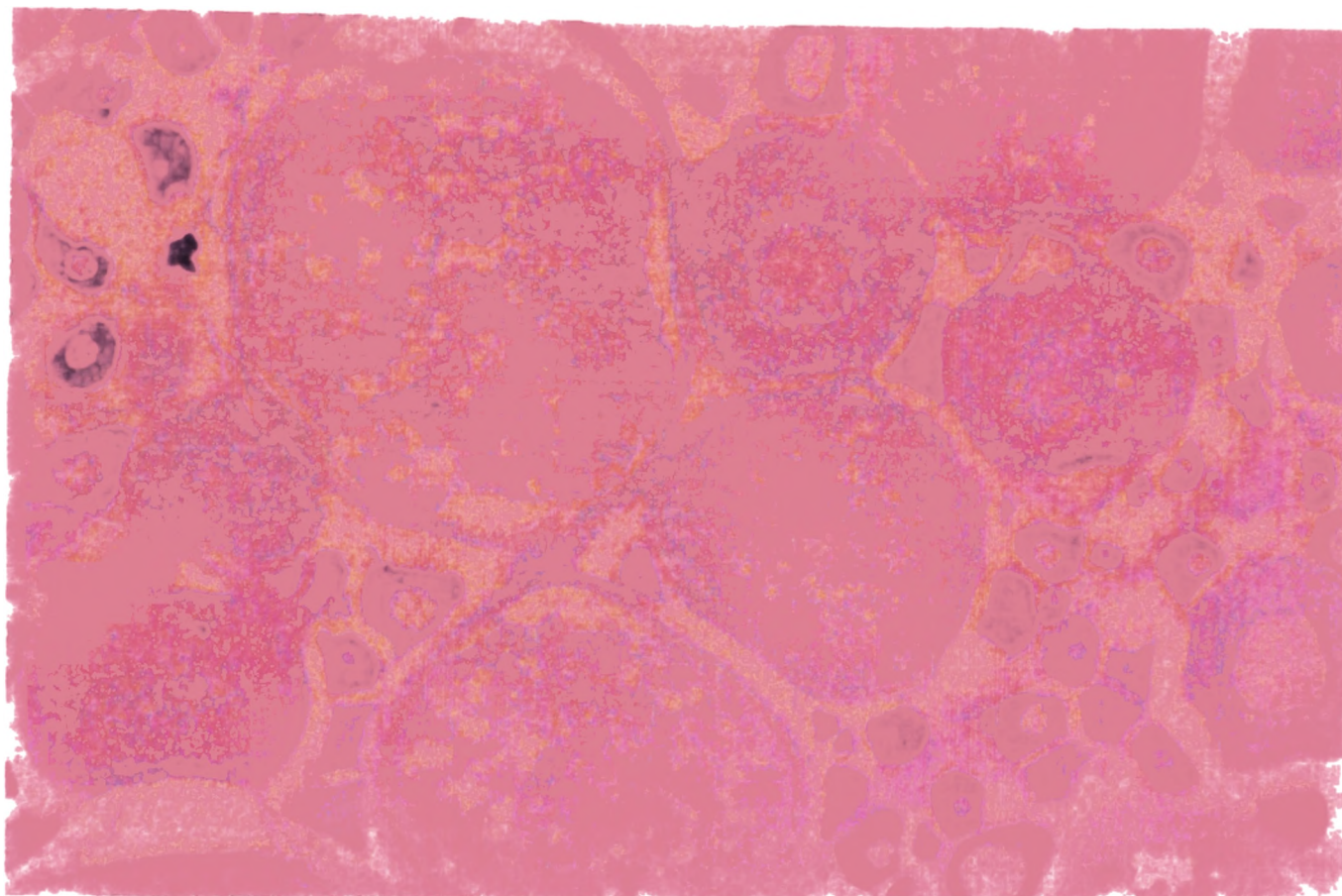
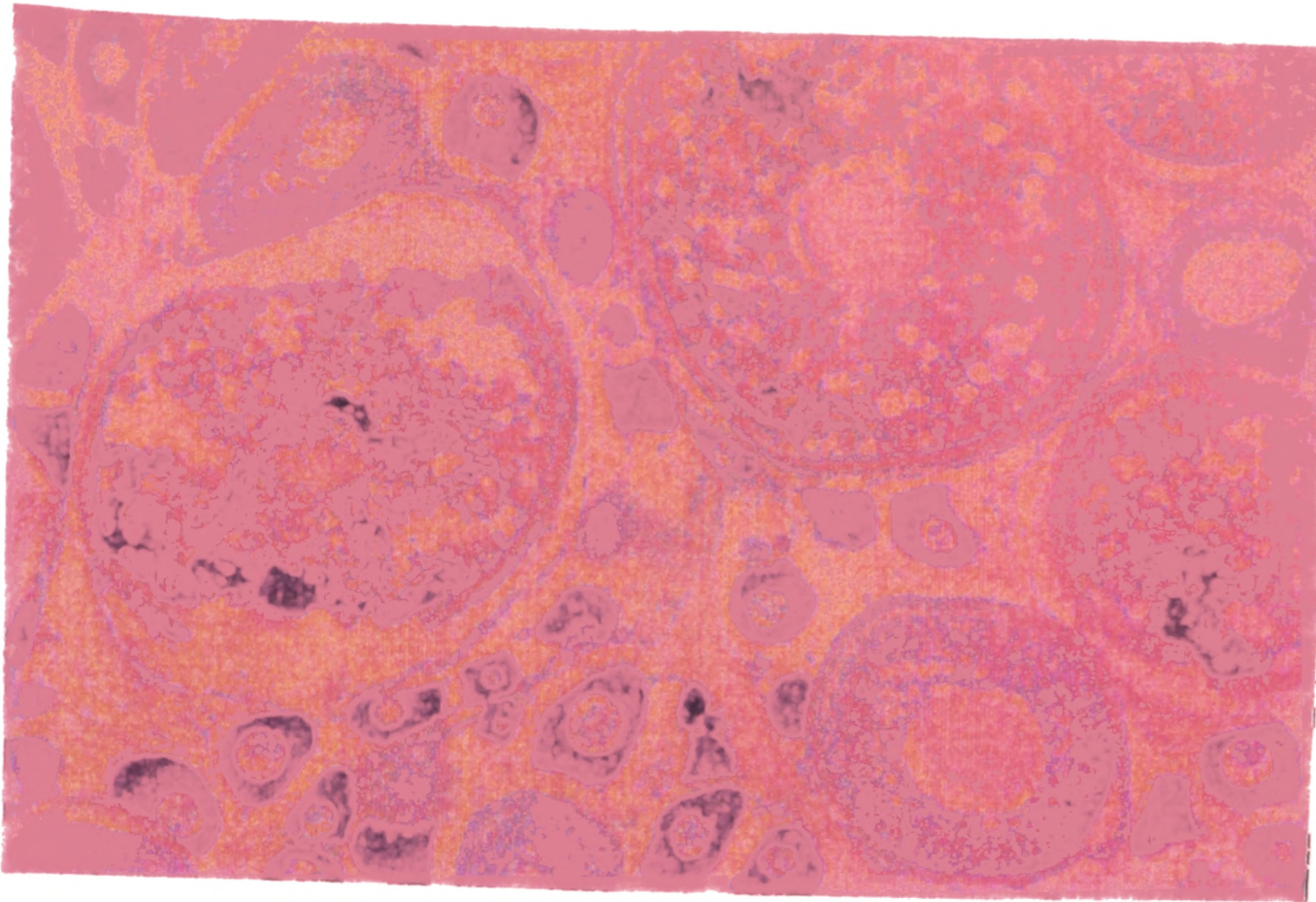


**Εικ.3.5:** Αναπτυσσόμενα ωκύτταρα *Puntazzo puntazzo* με κυτταρόπλασμα εοζινοφιλικό.

**Εικ.3.6:** Ωριμα ωκύτταρα *Puntazzo puntazzo* καθώς και ωκύτταρα σε διάφορα στάδια (ασύγχρονη ανάπτυξη γονάδας) x 100.







**Εικ.3.7,3.8:** Θηλυκή γονάδα Puntazzo puntazzo με κυρίως ώριμα ωκύτταρα όπου πληθώρα εωζονοφιλικών κοκκίων γεμίζουν το κυτταρόπλασμα. Παρατηρούνται σταγονίδια ελαίου όπου συνενώνονται σε κάποιο βαθμό.







**Εικ.3.9:** Θηλυκή γονάδα *Puntazzo puntazzo* με υπερώριμα ωοκύτταρα σε στάδιο αποικοδόμησης. (ατρητικά ωοθυλάκια). Μεγέθυνση x 100.

**Εικ.3.10:** Θηλυκή γονάδα *Puntazzo puntazzo*. Ύπαρξη ατρητικών ωοθυλακίων προηγούμενης αναπαραγωγικής περιόδου, δειγματοληψία Ιουλίου. Μεγέθυνση x 200.

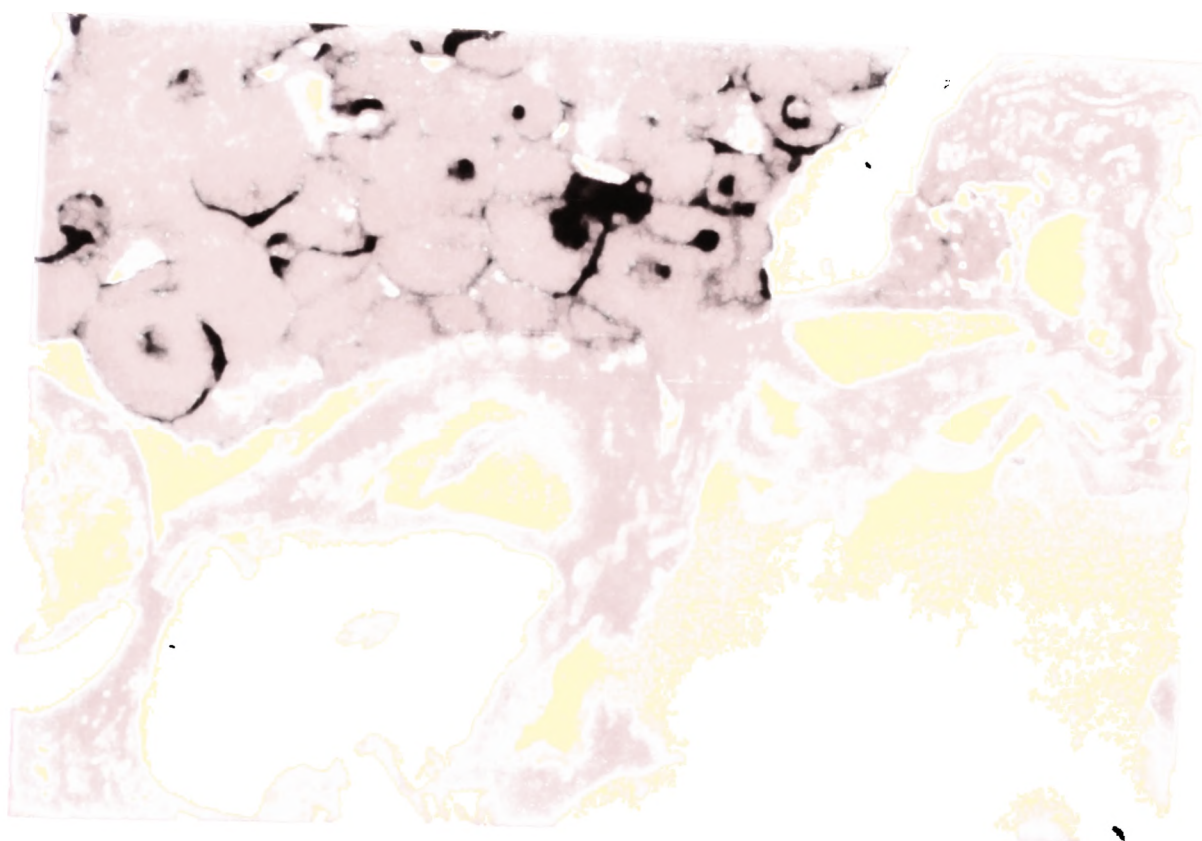
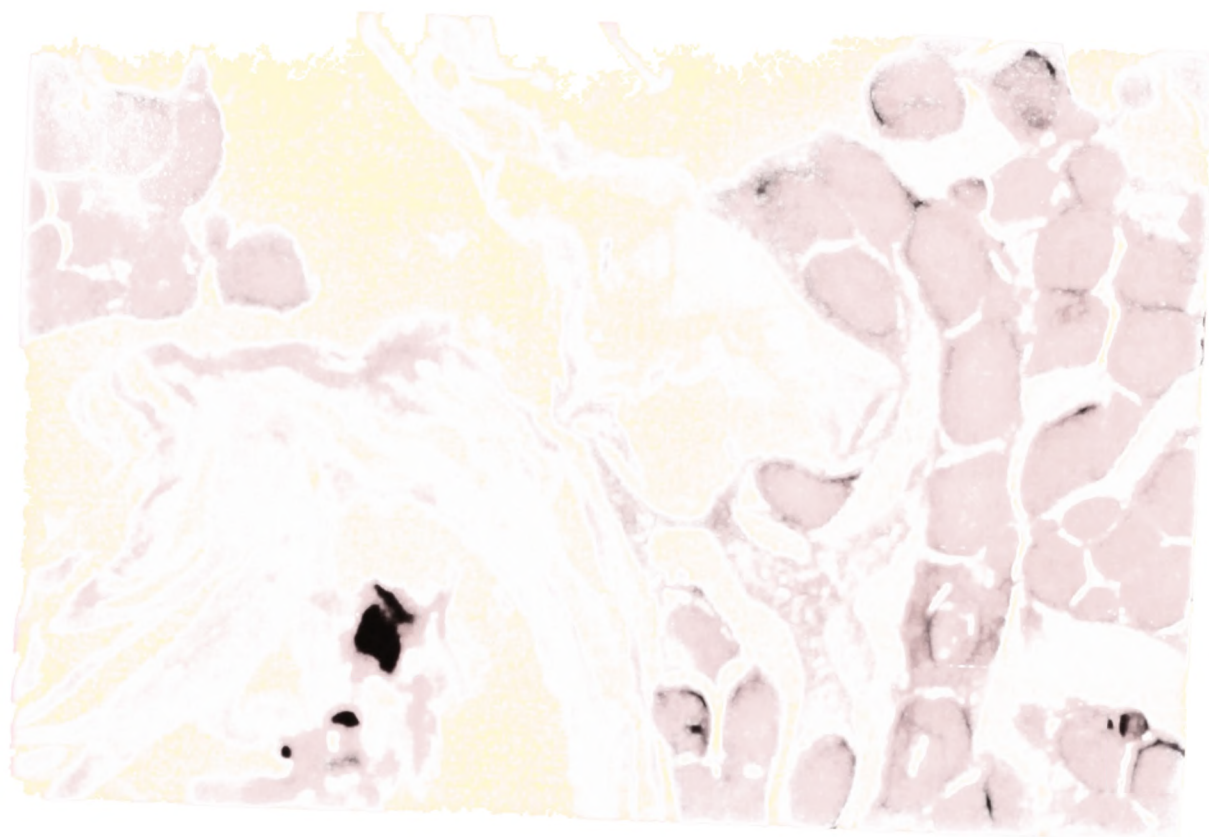






**Εικ.3.11,3.12:** Θηλυκή γονάδα *Puntazzo puntazzo* . Υπαρξη ατρητικών ωοθυλακίων προηγούμενης αναπαραγωγικής περιόδου,δειγματοληψία Ιουλίου. Μεγεθύνσεις x 100, x 100.

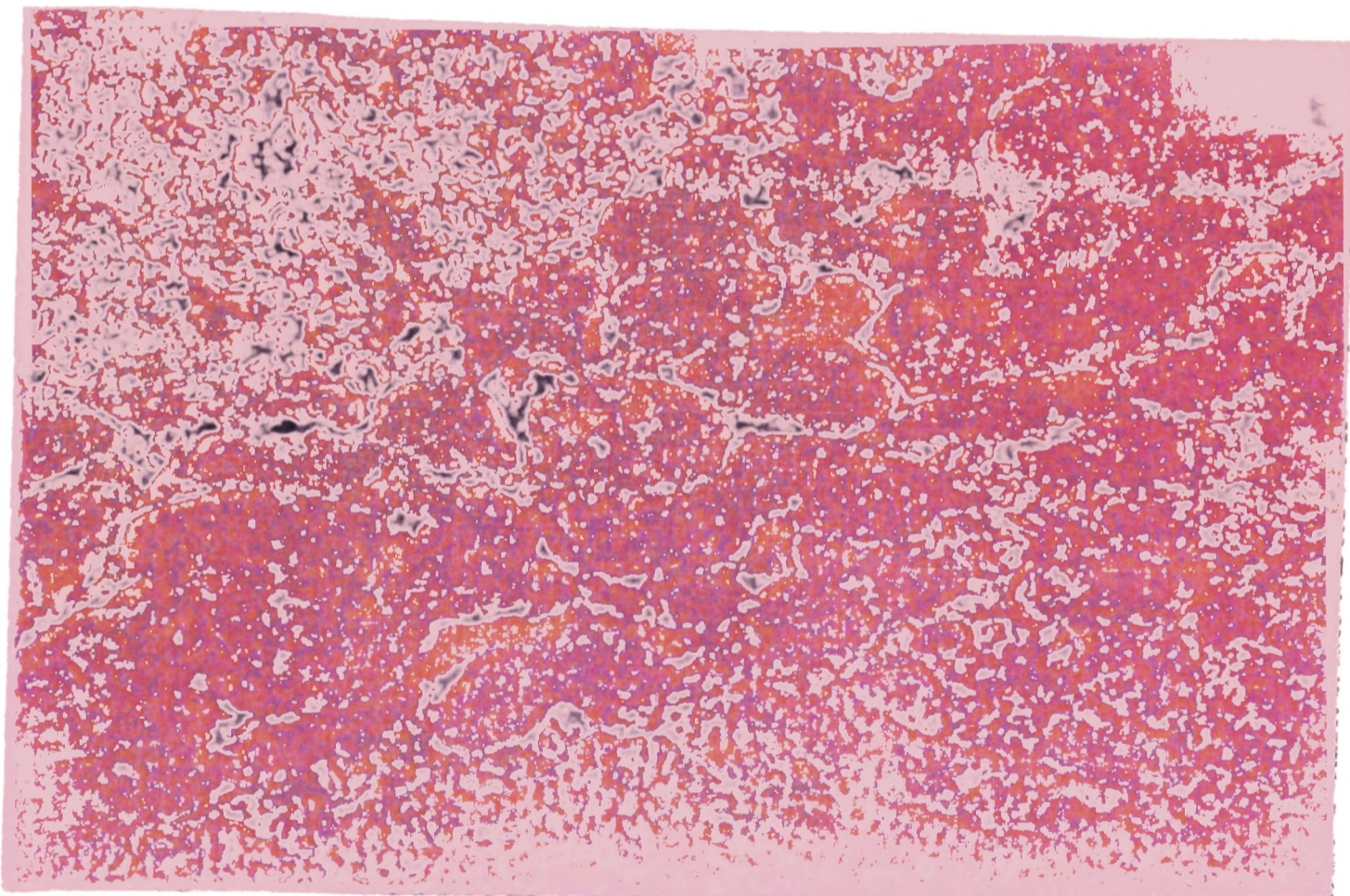




**Εικ.3.13,3.14:** Θηλυκή γονάδα *Puntazzo puntazzo*. Συνύπαρξη πρώιμων ωοκυττάρων με τμήμα γονάδας προηγούμενης αναπαραγωγικής περιόδου. Μεγεθύνσεις x 100, x 100.







**Εικ.3.15B:** Αρσενική γονάδα με περισσότερα σπερματογόνια από ότι σπερματοκύτταρα. Δειγματοληψία 10/9/95. Μεσαίο τμήμα γονάδας.

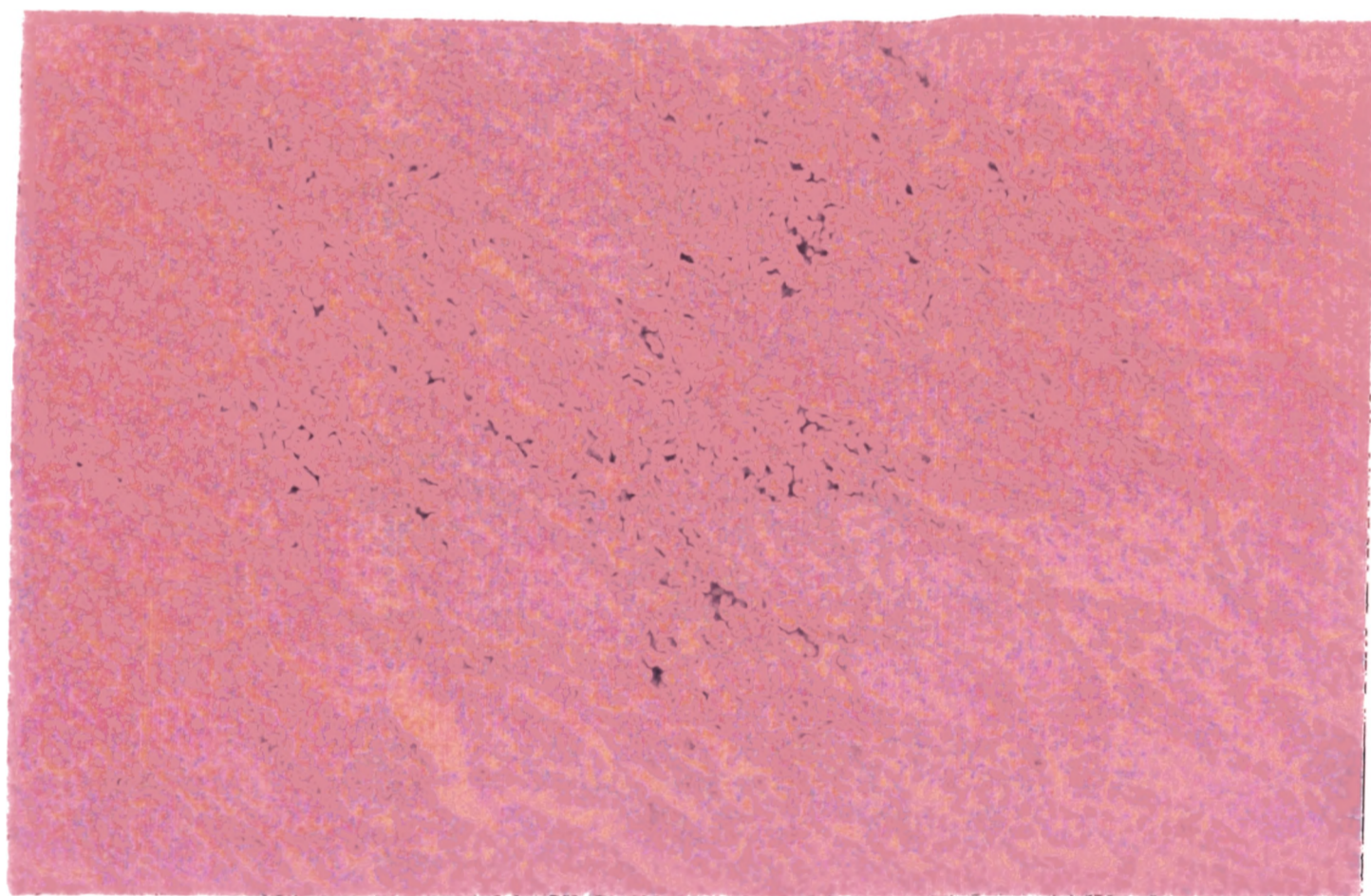
**Εικ.3.15Γ:** Παρατηρούνται ακόμα πιο πολλά πρώιμα σπερματογόνια. Οπίσθιο τμήμα γονάδας.







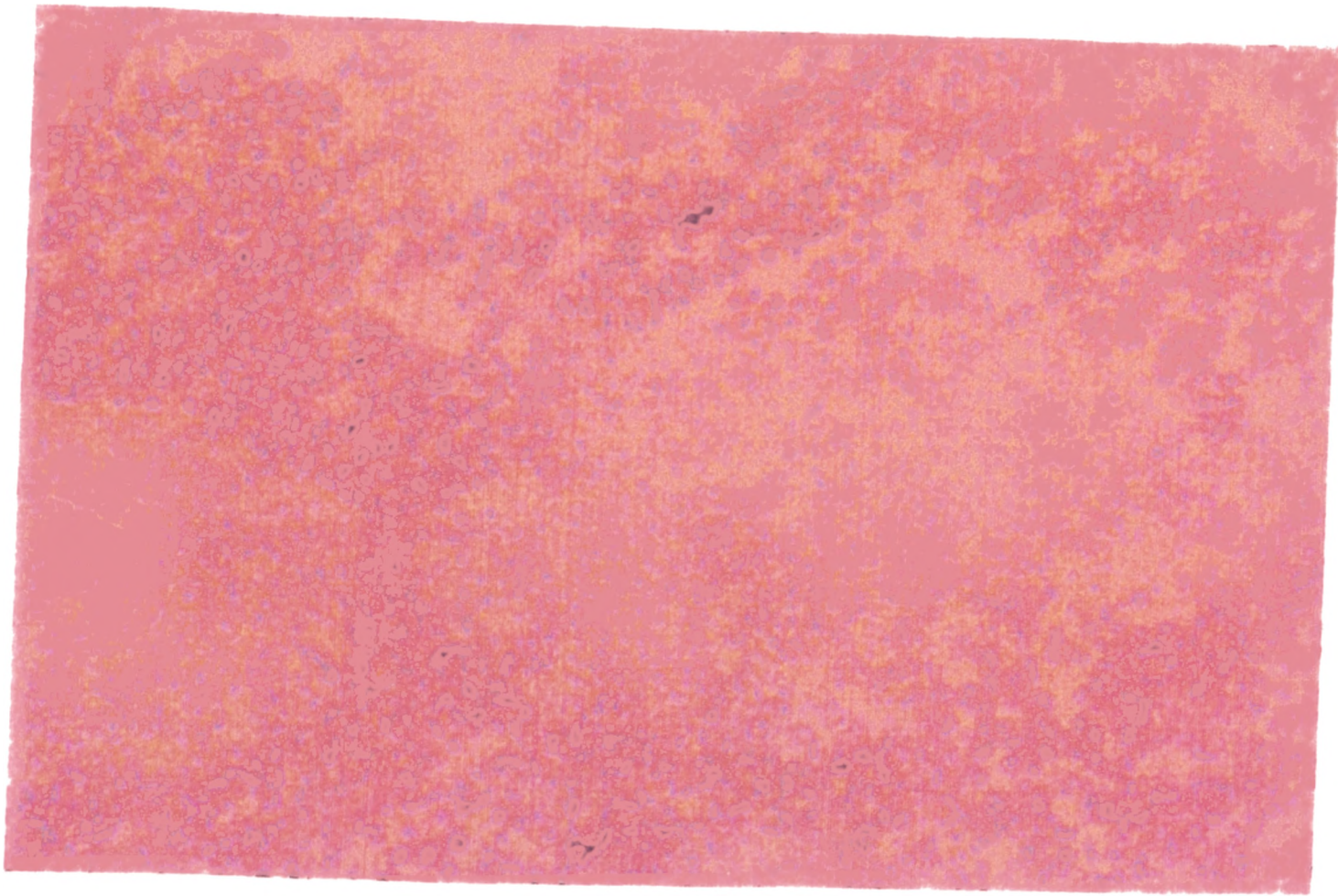
**Εικ.3.16A:** Αρσενική γονάδα. Πρόσθιο τμήμα γονάδας (κοντά στον γεννητικό πόρο). Δειγματοληψία 10/9/95.



**Εικ.3.16B :** Αρσενική γονάδα ίδιας περιόδου. Μεσαίο τμήμα γονάδας λιγότερο ώριμο.



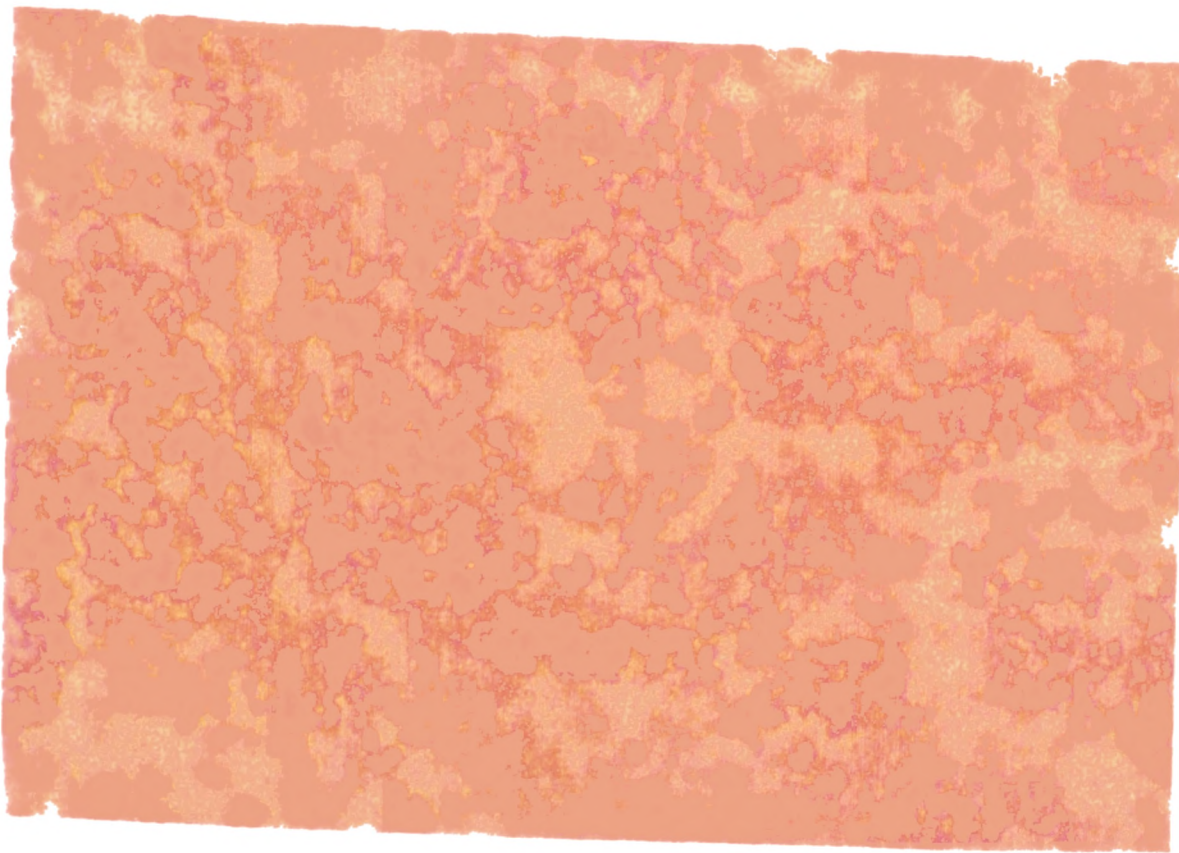




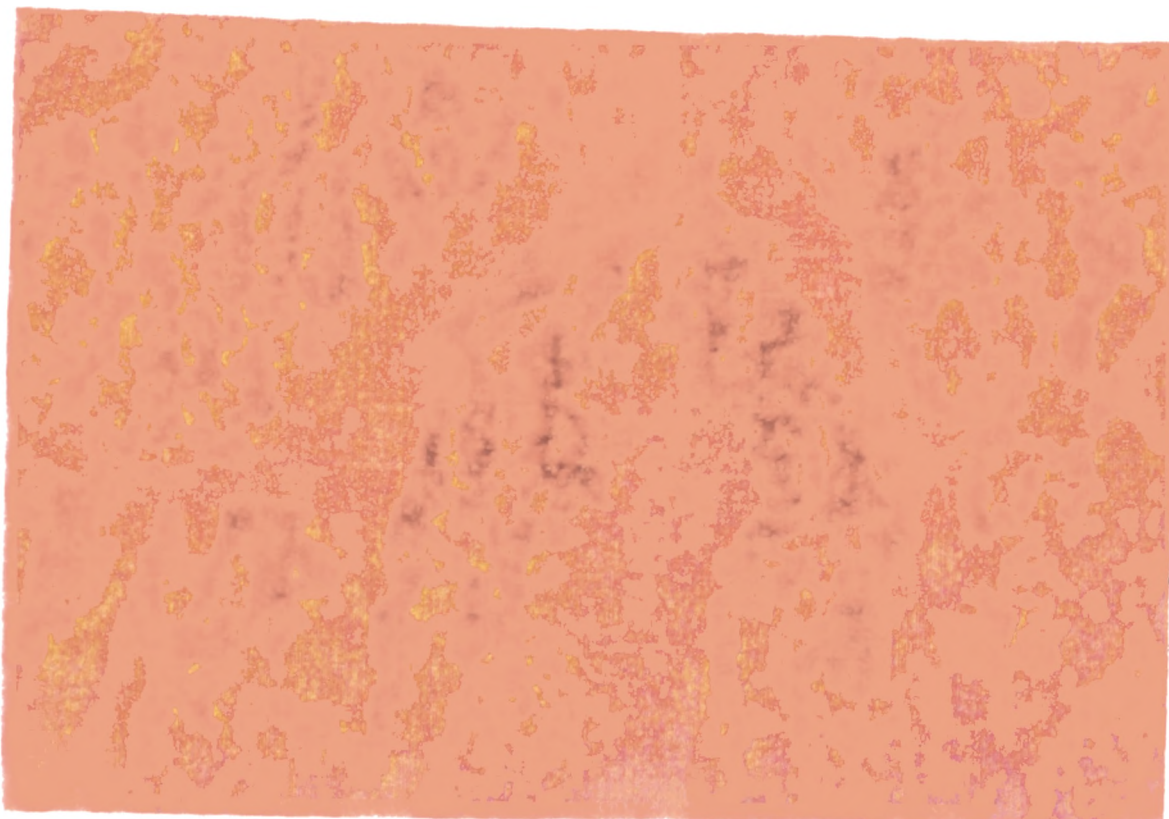
**Εικ.3.16Γ:** Αρσενική γονάδα,περιόδου Σεπτεμβρίου. Οπίσθιο τμήμα γονάδας όπου παρατηρείται ακόμη πιο ανώριμο. Υπάρχει διαφοροποίηση σε σπερματογόνια και πρώιμα σπερματοκύτταρα, αλλά τα σπερματογόνια κυριαρχούν.







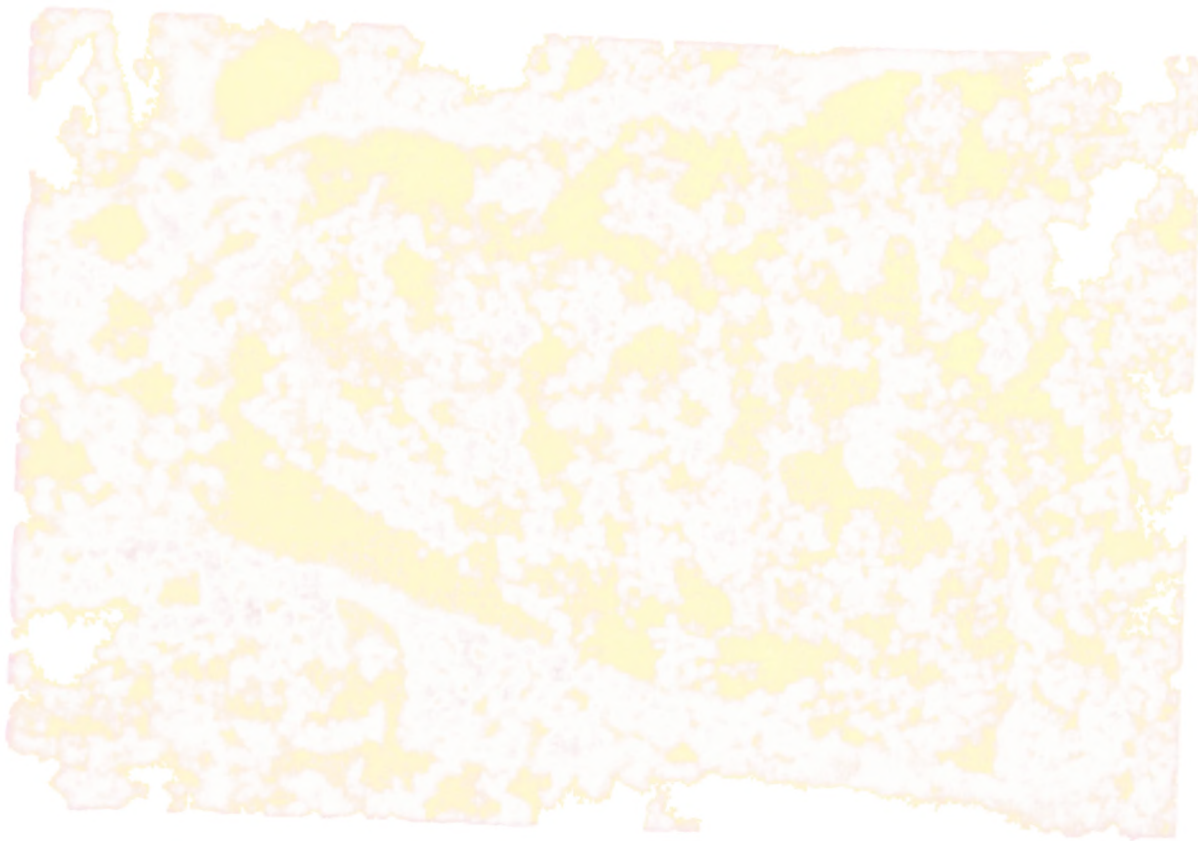
**Εικ.3.17Α:** Αρσενική γονάδα, περιόδου Οκτωβρίου. Παρατηρούνται πολλά σπερματογόνια. Μεγέθυνση x 400.



**Εικ.3.17Β:** Αρσενική γονάδα, περιόδου Οκτωβρίου. Μεσαίο τμήμα γονάδας. Παρατηρείται ώριμο και ανώριμο στάδιο με έντονη διαφορά. Μεγέθυνση x 400.







**Εικ.3.17Γ:** Αρσενική γονάδα περιόδου Οκτωβρίου. Στο κέντρο υπάρχει σπέρμα και τα σπερματογόνια που γεννούν τα σπερματοκύτταρα είναι στην περιφέρεια. Μεγέθυνση x 400.





**Εικ.3.18<sup>A1</sup>**: Αρσενικό άτομο περιόδου Οκτωβρίου. Πρόσθιο τμήμα γονάδας. Παρατηρείται σπέρμα. Υπερώριμο άτομο.

**Εικ.3.18<sup>A2</sup>**: Αρσενικό ώριμο άτομο περιόδου Οκτωβρίου. Υπάρχει κυρίως σπέρμα.







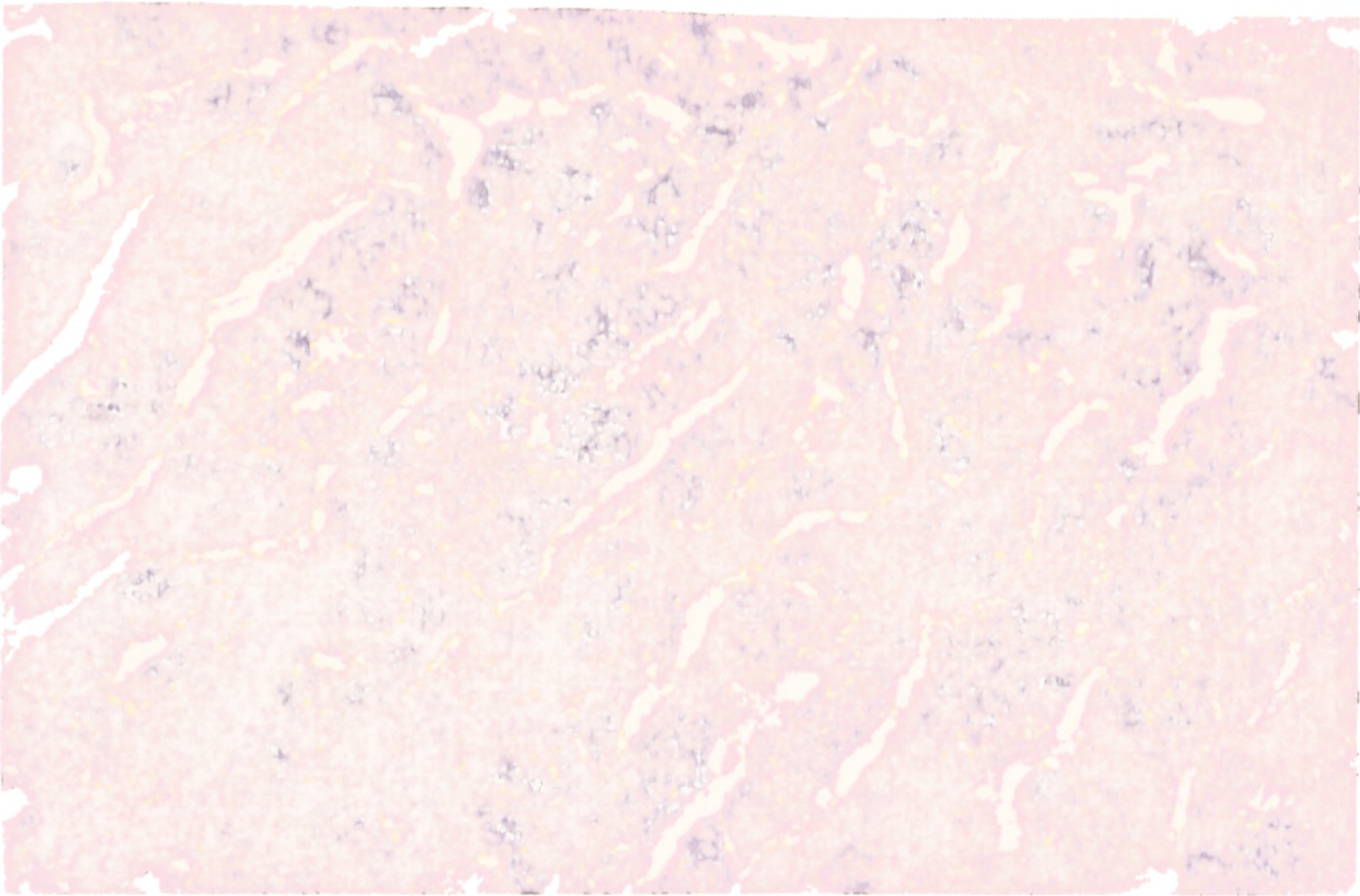
**Εικ.3.18B:** Μεσαίο τμήμα γονάδας αρσενικού ατόμου. Υπάρχουν ελάχιστα διάσπαρτα σπερματογόνια. Φαίνονται έντονα οι τομείς που διαιρούν τον όρχι. Δειγματοληψία 16/10/95.

**Εικ.3.18Γ:** Οπίσθιο τμήμα γονάδας αρσενικού ατόμου, δειγματοληψίας 16/10/95. Υπάρχουν πιο πολλά σπερματογόνια απ'ότι στο μεσαίο τμήμα.

♦ Στις τρεις παραπάνω εικόνες παρατηρείται η έντονη διαφοροποίηση, ανάμεσα στα τρία τμήματα της γονάδας που κόπηκαν, κατά μήκος του όρχι.



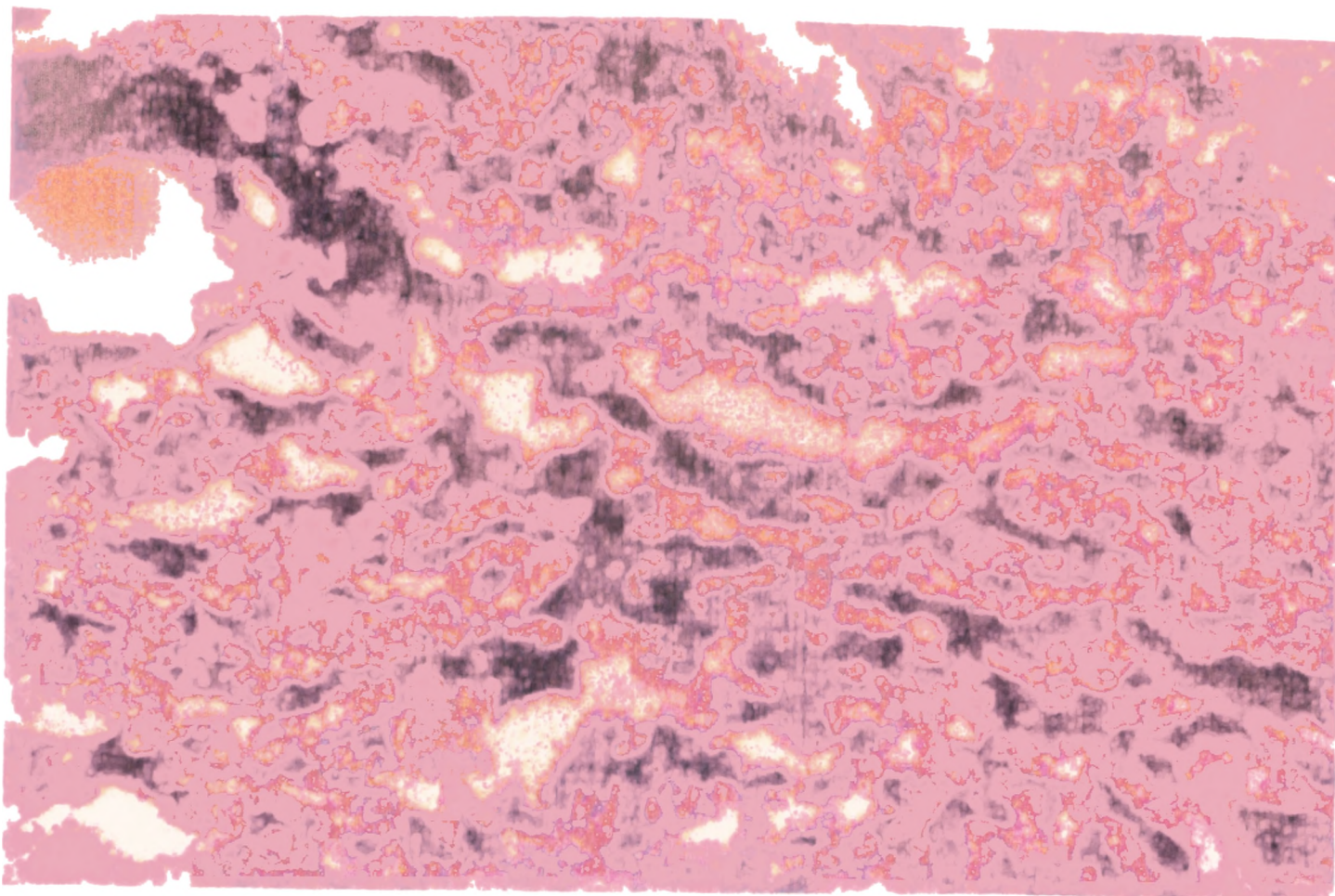




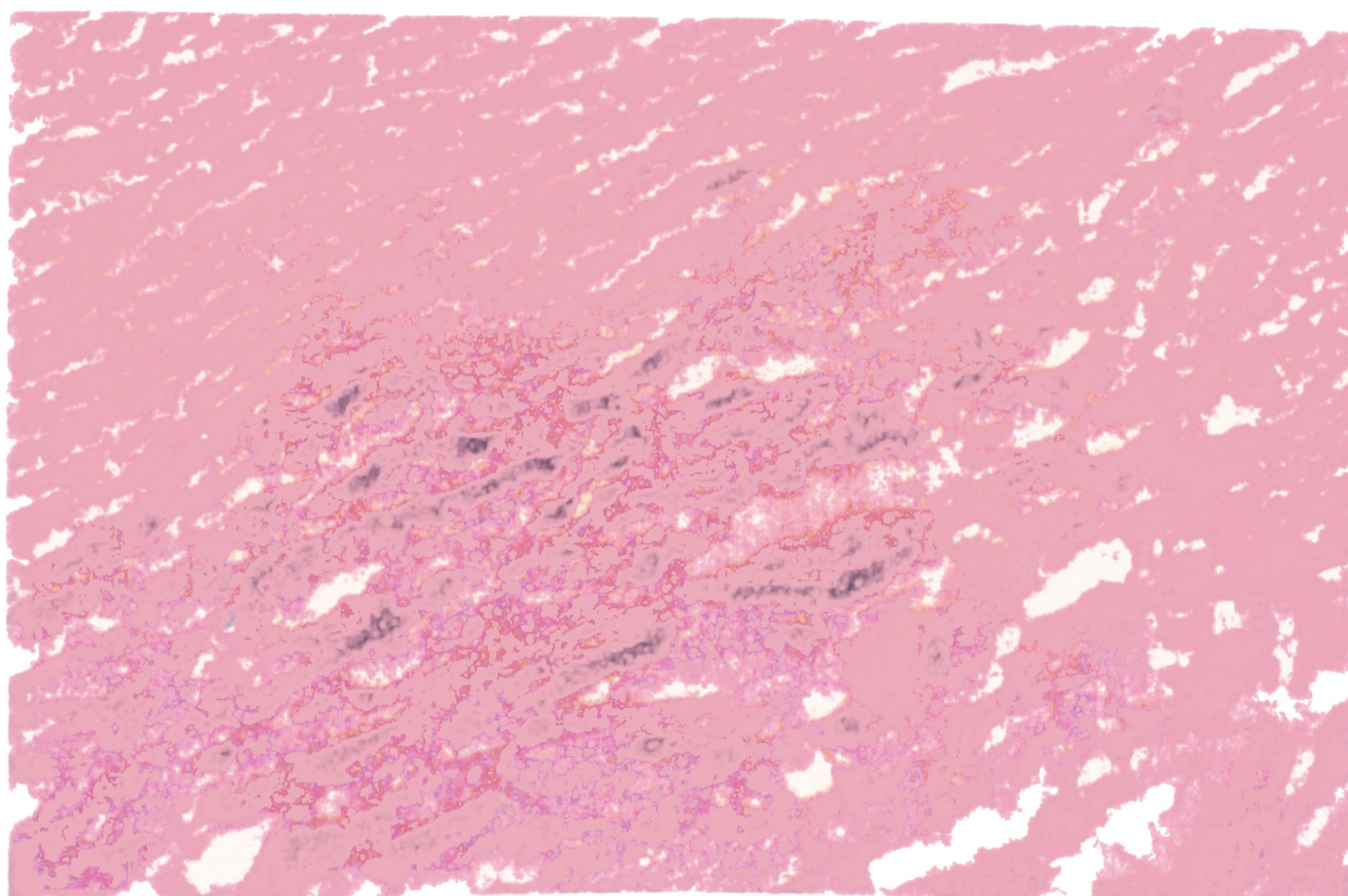
**Εικ.3.19Α:** Πρόσθιο τμήμα γονάδας αρσενικού ατόμου με τελείως ανώριμα κύτταρα. Περιόδου Ιουλίου.







**Εικ.3.20Α:** Ανώριμο αρσενικό άτομο περιόδου Ιουλίου, με ανώριμα  
ωογόνια. Πρόσθιο τμήμα γονάδας.



**Εικ.3.20Γ:** Ανώριμο αρσενικό άτομο περιόδου Ιουλίου, με πρώιμα  
ωογόνια. Οπίσθιο τμήμα γονάδας.





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-** **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



#### 4. Συμπεράσματα- συζήτηση

Η αναπαραγωγή του είδους *Puntazzo puntazzo* απασχόλησε τους ερευνητές τα τελευταία χρόνια απ' τη στιγμή που άρχισε να εισέρχεται στην ομάδα των καλλιεργούμενων ειδών, γι' αυτό και η σχετική βιβλιογραφία είναι περιορισμένη.

##### 4.1 Ερμαφροδιτισμός

Οι Sadovy & Shapiro (1987) επιχειρώντας να παρουσιάσουν τα κριτήρια διάγνωσης ερμαφροδιτισμού στα ψάρια παρουσιάζουν τέσσερις τύπους ανάλυσης της φυλετικής δομής ενός πληθυσμού και πιο ειδικά: την αναγνώριση «ερμαφρόδιτων ατόμων», της δομής της γονάδας, τις συχνότητες κατανομής του φύλου καθώς και την τεχνητή του αλλαγή. Εξετάζοντας τα ψάρια μεμονωμένα (σε επίπεδο ατόμου), το πλέον αναμφίβολο επιχείρημα διάγνωσης ερμαφροδιτισμού αποτελεί η δομή που έχει η γονάδα και οι ιστολογικές της μεταβολές κατά τη διάρκεια ενός σεναρίου αλλαγής φύλου (Atz 1964, Garnat 1986, Shadovy & Shapiro 1987). Τέτοιου είδους προσέγγιση είναι αναγκαία- αν και απαιτεί σημαντική επένδυση χρόνου- ιδιαίτερα όταν η μακροσκοπική εξέταση δίνει ανακριβή αποτελέσματα. Για παράδειγμα αν εξετάσουμε άτομα της οικογένειας Sparidae εκτός της περιόδου αναπαραγωγής, ο προσδιορισμός του φύλου αποτελεί εξαιρετικά δύσκολο εγχείρημα (Reinboth 1970). Ιδιαίτερα όταν ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός (όπως στη δική μας περίπτωση) ή όταν δεν υπάρχουν αντιπροσωπευτικά δείγματα από όλους τους μήνες του έτους, αυτός ο τύπος προσέγγισης μειονεκτεί.

Η αλλαγή του φύλου στα ερμαφρόδιτα είδη πραγματοποιείται με τους εξής δύο τρόπους:

Στα είδη *E. microdon* (Debas 1989), *Lates calcarifer* (Moore 1979), *Epinephelus mori* (Moê 1969) εξελίσσεται με την *in situ* αντικατάσταση του πρωτογενούς από το δευτερογενές φύλο. Στα πρωτόγυνα είδη αυτής της κατηγορίας, η παρουσία ωοκυττάρων είτε φυσικών είτε εκφυλιζόμενων καθώς και της ωθηκικής κοιλότητας στους όρχεις μαρτυρά προέλευση αρσενικών από θηλυκά (Shapiro 1981).

Σύμφωνα με το δεύτερο τρόπο που αποτελεί και τον τυπικό για τα Sparidae (D' Ancona 1950, Atz 1964, Chan 1970), η αλλαγή φύλου εξελίσσεται με την ανάπτυξη του δευτερογενούς φύλου και τον εκφυλισμό του πρωτογενούς, σε γονάδες στις οποίες οι δύο ιστοί συνυπάρχουν, τοπογραφικά διαχωριζόμενοι ορίζοντας δύο



διαφορετικές φυλετικές ζώνες. Στα Sparidae οι δύο ιστοί συνυπάρχουν για μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι την απόκτηση του οριστικού λειτουργικού φύλου (Atz 1964, Sadovy & Shapiro 1987).

Έτσι για τη διάγνωση ερμαφροδιτισμού η συνύπαρξη των δύο ιστών δεν αποτελεί κριτήριο. Κριτήριο διάγνωσης ερμαφροδιτισμού στα Sparidae παρέχουν οι ιστολογικές ενδείξεις εκφυλισμού του πρωτογενούς λειτουργικού φύλου (Sadovy & Shapiro 1983).

Όσον αφορά τη διάγνωση ερμαφροδιτισμού σε επίπεδο πληθυσμού μπορεί να γίνει με την ανάλυση των συχνοτήτων κατανομής του φύλου σε σχέση με το μήκος, το βάρος και την ηλικία. Αυτός ο τύπος ανάλυσης έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση ερμαφροδιτισμού από πολλούς ερευνητές είτε μεμονωμένα, είτε ως συμπληρωματικός τρόπος της ιστολογικής διάγνωσης (Moore 1982). Αν και η αξιολόγηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων γίνεται γρήγορα, θεωρείται γενικά ανακριβής τρόπος όταν η διαφορική κατανομή του φύλου επηρεάζεται από παράγοντες όπως η διαφορική θνησιμότητα, αύξηση ή συνάθροιση των ατόμων στο χώρο (Sadovy & Shapiro 1987).

Όπως προαναφέρθηκε στα δείγματα που εξετάσαμε στην παρούσα εργασία βρέθηκαν αποκλειστικά αρσενικά ή θηλυκά κύτταρα τόσο σε άτομα ώριμα, μικρού και μεγάλου σωματικού βάρους, όσο και σε άτομα ανώριμα. Ο D' Ancona (1956) χαρακτηρίζει το εξεταζόμενο είδος ως υποτυπωδώς ερμαφρόδιτο χωρίς διευκρινιστικές λεπτομέρειες, ενώ στην ίδια κατηγορία κατατάσσει και τα είδη *Diplodus annularis*, *Boops boops*, *Oblada melanura* και *Dentex dentex*. Οι δικές μας παρατηρήσεις δεν επιβεβαιώνουν τα παραπάνω στοιχεία. Πιθανόν σε περίπτωση ερμαφροδιτισμού ο διαχωρισμός να γίνεται πολύ νωρίς, σε ανώριμα άτομα, κάτι το οποίο δεν θα μπορούσε να φανεί με τον αριθμό των δικών μας ανώριμων δειγμάτων. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να γίνουν συμπληρωματικές ιστολογικές τομές σε άτομα ηλικίας 0+ ώστε να ελεγχθεί αν φέρουν υπολείμματα γονάδας αντίθετου φύλου.

#### 4.2 Ωοκύτταρα

Σε πολλά είδη ψαριών της εύκρατης και τροπικής ζώνης η ωρίμανση και απελευθέρωση ωοκυττάρων είναι ασύγχρονη, δηλαδή τα ωοκύτταρα δεν ωριμάζουν ταυτόχρονα και οι ωοθήκες περιλαμβάνουν σειρά ωοκυττάρων διαφόρων μεγεθών σε διαδοχικά στάδια ανάπτυξης (Wallace & Selman 1981, Hunter et al. 1982)





Η κατανομή των μεγεθών, παρουσιάζει συνήθως την εικόνα των συνεχών επικαλυπτόμενων ομάδων και μόνο κατά τις στιγμές της ωοτοκίας απομονώνεται η ομάδα των ενυδατωμένων (hydrated) ωοκυττάρων (Hunter et al. 1985). Η εικόνα αυτή όταν είναι συνεχής υποδηλώνει πως η ασύγχρονη ωογένεση χαρακτηρίζεται από μια συνεχή είσοδο ανώριμων ωοκυττάρων στην αναπαραγωγική διαδικασία (de novo vitellogenesis).

Ο προσδιορισμός της αναπαραγωγικής κατάστασης ενός πληθυσμού αντιμετωπίζεται συνήθως με τους εξής τρόπους:

- Ταξινόμηση των ατόμων σε αναπαραγωγικά στάδια με μικροσκοπικά γνωρίσματα
- Εκτίμηση του γοναδοσωματικού δείκτη
- Εκτίμηση της μέσης τιμής του μεγέθους των περισσότερο εξελιγμένων ωοκυττάρων
- Ταξινόμηση των ατόμων σε αναπαραγωγικά στάδια με ιστολογικά κριτήρια.

Η ιστολογία των ωοθηκών αποτελεί το κλειδί για την ανάπτυξη μεθόδων εκτίμησης της αναπαραγωγικής συχνότητας (spawning frequency) και γενικά της μελέτης του αναπαραγωγικού κύκλου (Hunter & Macewicz 1985)

Επιπλέον αναφέρονται ενυδατωμένα ωοκύτταρα του είδους *Trachurus trachurus* 700 -1200  $\mu\text{m}$  και ωοκύτταρα που θα ενυδατωθούν εντός ολίγων ωρών. Επιπλέον στις ωοθήκες του *Pagrus pagrus* αναφέρθηκαν ωοκύτταρα προλεκιθογόνα, λεκιθογόνα και λεκιθικά με διάμετρο που καλύπτει το φάσμα των 150-750  $\mu\text{m}$ . Το μέγεθος των λεκιθογόνων ωοκυττάρων έφτανε τα 280 $\mu\text{m}$  ενώ των λεκιθικών κυμαινόταν από 300 έως 750  $\mu\text{m}$ . Η κατανομή τους ήταν συνεχής και αποτελούνταν από ένα μεγάλο πληθυσμό λεκιθογόνων ωοκυττάρων από τον οποίο εμφανιζόταν ένας κανονικός πληθυσμός λεκιθικών ωοκυττάρων. Σε καμιά από τις κατανομές δεν παρατηρήθηκε διαχωριστικό χάσμα που να ορίζει τα λεκιθικά ωοκύτταρα που θα ωριμάσουν (σε αυγά) στην τρέχουσα αναπαραγωγική περίοδο. Σε φάσεις ωορρηξίας παρατηρήθηκαν στις ωοθήκες αυγά με διάμετρο > 750 $\mu\text{m}$  τα οποία και διαχωρίζονταν εμφανώς από τον πληθυσμό των λεκιθικών ωοκυττάρων, μετά από τη διάμετρο των 750 $\mu\text{m}$ . Τα αυγά αντιπροσώπευαν ποσοστό < 0,1% των ωοκυττάρων.

Οι διαμέτροι των ωοκυττάρων του *Cheimarius nufar* (Ehrenberg, 1980) κυμαίνονται από 10,9 στο στάδιο 0 της ωογονίας έως και 500  $\mu\text{m}$  στο στάδιο 8 (ripe oocytes). Για το ίδιο είδος είχε αναφερθεί παλαιότερα στο τελευταίο στάδιο και διάμετρος >750  $\mu\text{m}$  (Ranzi 1969) Ενδεικτικά αναφέρουμε πως στο 5<sup>ο</sup> στάδιο (tertiary yolk



oocytes) η διάμετρος είναι 410,1 (339,1-435,7) και στο 7<sup>ο</sup> στάδιο (ώριμα ωοκύτταρα) 488,6 μm).

Οι O.S Kjesbu et al (1991) έχουν καταγράψει διάμετρο ωοκυττάρων που κυμαίνεται από ≈500 έως και 800 μm ενώ οι O.F.Sakun και V.G Svirskiy (1993) στη *Sardinops sagax melanosticta* αναφέρουν μεγέθη της τάξης 90- 200μm σε εκφυλισμένα ωοκύτταρα περιόδου Νοεμβρίου.

Όσον αφορά το μυτάκι, σε πειράματα τεχνητής αναπαραγωγής, το μέγεθος των ωαρίων κατά την ωορρηξία και την γονιμοποίηση ήταν 845μm (Faranda, Cavaliere, Loparo, Manganaro and Mazzola, 1985) μέγεθος που δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη στα κύτταρα που ήταν ακόμη συνδεδεμένα με τη γονάδα. Σε ελεύθερα όμως αυγά των ωαγωγών, τα οποία είχαν ενυδατωθεί, το μέγεθος δεν διέφερε σημαντικά από το παραπάνω.

Στον πίνακα 3.2 φαίνονται αναλυτικά οι μέσοι διάμετροι των σταδίων των ωοκυττάρων για τα διάφορα στάδια ωρίμανσης.

Τα ιστογράμματα της εικόνας 3 δείχνουν την αλληλοεπικάλυψη των σταδίων αλλά με κυριαρχία του μεγέθους που αντιστοιχεί στο αναπαραγωγικό στάδιο.

### 4.3 Ατρησία

Ατρησία χαρακτηρίζεται το φαινόμενο της αποικοδόμησης των ωοκυττάρων κατά την περίοδο της λεκιθογένεσης και της αποικοδόμησης των άδειων ωοθυλακίων μετά την ωορρηξία.

Σύμφωνα με τους Bretschneider & Duyvene de Wit (1947) και Hunter & Macewicz (1985) η ατρησία χωρίζεται σε τέσσερα στάδια, (α-), (β-), (γ-) και (δ-). Με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των α-ατρησιακών ολικώς λεκιθοφόρων ωοκυττάρων και την παρουσία των μεταγενέστερων σταδίων ατρησίας οι ωοθήκες επομένως και τα θηλυκά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ατρησιακές καταστάσεις (atretic states) (Hunter & Macewicz 1985).

➤ **Ατρησιακή κατάσταση 0.** Ωοθήκες χωρίς ίχνος ατρησίας στα ολικώς λεκιθοφόρα ωοκύτταρα. Πιθανή παρουσία βήτα ατρησιακού σταδίου, μη ικανού όμως να πιστοποιήσει με βεβαιότητα προγενέστερη ωοτοκία.

➤ **Ατρησιακή κατάσταση 1.** Ωοθήκες όπου το <50% των ολικώς λεκιθοφόρων ωοκυττάρων βρίσκεται σε α- ατρησία





- **Ατρησιακή κατάσταση 2.** Ωοθήκες στις οποίες το  $\geq 50\%$  των ολικώς λεκιθοφόρων ωοκυττάρων βρίσκεται σε α- ατρησία
- **Ατρησιακή κατάσταση 3.** Ωοθήκες στις οποίες δεν υπάρχουν κύτταρα ωογενετικά δραστήρια. Παρουσία β- ή δ- σταδίων ατρησίας. Εφόσον αυτά τα στάδια υποδεικνύουν πιθανή προγενέστερη ωοτοκία, η ατρησιακή κατάσταση 3 χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τα ανώριμα θηλυκά από τα ώριμα που τελείωσαν την αναπαραγωγική τους δραστηριότητα (Hunter & Macewicz, 1985). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμη και αν τα ατρησιακά ωοθυλάκια σε μεταγενέστερα στάδια ατρησίας έχουν υποστεί τέτοια αποικοδόμηση, ώστε να μην είναι εύκολα αναγνωρίσιμα, η ωοθήκη σε προχωρημένο στάδιο ατρησιακής κατάστασης 3 χαρακτηρίζεται από αποδιοργάνωση των ωοφόρων ελασμάτων και υπόλοιπα αποικοδόμησης ωοθυλακίων (debris) άτακτα διαταγμένα (Macer, 1974)

Πρακτικά, τα όρια μεταξύ των τεσσάρων ατρησιακών καταστάσεων δεν είναι σαφή και ως εκ του τούτου οποιοδήποτε εγχείρημα ταξινόμησης των ωοκυττάρων των δειγμάτων της παρούσας εργασίας σε κάποια ή κάποιες από αυτές, θα ήταν άτοπο, ιδιαίτερα εφόσον ο αριθμός των δειγμάτων και δειγματοληψιών ήταν περιορισμένος. Μια τέτοια προσπάθεια απαιτεί αφενός λεπτομερέστατη μικροσκοπική εξέταση κάθε ωοκυττάρου κάθε δείγματος, αφετέρου πολύχρονη εμπειρία και γνώση.

Σε συνδυασμό με τα κυτταροχημικά ευρήματα, φαίνεται ότι τα ατρητικά ωοθυλάκια των ψαριών δεν έχουν καμιά ενδοκρινή δραστηριότητα και δεν μπορούν να συγκριθούν με τα corpora lutea των θηλαστικών.

Τα ατρητικά ωοθυλάκια αναπτύσσονται κυρίως όταν τα αυγά δεν έχουν απελευθερωθεί κατά τη διάρκεια της πρώτης εποχής της ωοτοκίας και η ωοθήκη προετοιμάζεται για τη δεύτερη ωοτοκία (Pankhurst, 1988). Προφανώς τα άτομα στα οποία παρατηρήθηκαν ατρητικά ωοθυλάκια δεν κατάφεραν να απελευθερώσουν τα γεννητικά τους προϊόντα με αποτέλεσμα να προσπαθήσουν να τα επαναπορροφήσουν. Άτομα αυτής της κατηγορίας συχνά οδηγούνται στο θάνατο (προσωπικές παρατηρήσεις)

Επιπλέον, τα ωοθυλάκια διαθέτουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και εισβάλουν στα ωοκύτταρα υγροποιώντας και επαναπορροφώντας τα σωματίδια της λεκίθου και το ωόπλασμα.

Λόγοι που αναφέρονται για την μη επιτυχή απελευθέρωση των γεννητικών προϊόντων θεωρούνται ο μη επαρκής χώρος σε συνθήκες αιχμαλωσίας (Amin, Morteuse and Poppe 1992), περιβαλλοντικοί παράγοντες (θερμοκρασία του νερού, φωτοπερίοδος, διαλυμένο οξυγόνο και αλατότητα) ή συνθήκες διατροφής (Pankurst, 1998). Οι παραπάνω λόγοι και κυρίως η



σημαντική ιχθυοφόρτιση καθώς και η έλλειψη κατάλληλων συνθηκών φαίνεται ότι επηρέασαν τα δείγματα και στη δική μας περίπτωση.

Με βάση τα στοιχεία της παρούσας μελέτης το μυτάκι εμφανίζει πολλαπλή, συγχρονισμένη κατά ομάδες ωρίμανση των γονάδων του κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου- Νοεμβρίου σε ηλικία τουλάχιστον 2+, γεγονός που βασίστηκε στην παρουσία ανώριμων και πρώιμων ωοκυττάρων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης.



## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ





## Γενικά συμπεράσματα

- 1) Με βάση τη διακύμανση του γοναδοσωματικού δείκτη το είδος φαίνεται να προσεγγίζει τα γονοχωριστικά είδη σε αντίθεση με τον συνήθη ερμαφροδιτισμό που παρουσιάζει η οικογένεια *Sparidae*.
- 2) Οι υψηλότερες τιμές του δείκτη εμφανίζονται το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Οκτωβρίου και το πρώτο του Νοεμβρίου.
- 3) Σε περίπτωση μη απελευθέρωσης όλων των ωοκυττάρων τα υπόλοιπα αβγά μετατρέπονται σε ατριτικά και απορροφώνται καθ'όλη τη διάρκεια του έτους.
- 4) Οι ασυνήθιστες δομές των ατριτικών ωοθυλακίων εμφανίζονται σε μικρό ποσοστό από το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου και φτάνουν να αποτελούν την κύρια μάζα της γονάδας τον Ιούλιο.
- 5) Σε όλα τα στάδια ήταν έντονη η παρουσία ανώριμων και πρώιμων ωοκυττάρων, γεγονός που υποστηρίζει τον αναπαραγωγικό τύπο της πολλαπλής συγχρονισμένης κατά ομάδες ωρίμανσης.
- 6) Και στα αρσενικά άτομα παρατηρήθηκε ο ίδιος τύπος ωρίμανσης (ανώριμα σπερματογόνα τον Ιούλιο, σπερματογόνα κύτταρα και σπέρμα τον Σεπτέμβριο, κυρίως σπέρμα τον Οκτώβριο), χωρίς την παρουσία ατριτικών ωοθυλακίων ή επαναπορροφημένων γεννητικών προϊόντων.
- 7) Η ωρίμανση στη γονάδα η οποία διακρίνεται μόνο στα άτομα με γεννητική ωρίμανση και όχι στα ανώριμα, φαίνεται να είναι ασύγχρονη με το μπροστινό τμήμα να έχει τη μεγαλύτερη ωρίμανση.



## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ- ABSTRACT**





## **Histological study of the sexual maturity of *Puntazzo puntazzo* (Gmelin 1789)**

### ***Abstract***

This project constitutes a histological study of the type of sexual maturity of sharp snout sea bream (*Puntazzo puntazzo*).

The samples came from a population kept under rearing conditions, in a farm of South Greece.

They were sampled in July, September, October and November, so that non mature as well as mature individuals could be examined.

Samples were weighed as well as their gonads, and gonadosomatic index was calculated.

In order to determine the synchronous or not, maturity of the gonads, sections were taken from the front, back and middle side of the gonads. The sections of the tissues were embaptized in dehydration and filtration liquids and finally in parfine of 54 to 56 °C during the histokinette process. Thereafter sections were taken in the microtome at 5 mm and colouring with the hematoxyline- eozine method took place. The eggs were treated in the same way. Moreover, samples were examined under the microscope.

In all samples either testicular or ovarian tissues were found, indicating separation of the genital organs, instead of hermaphroditism which is commonly observed in the Sparidae family. The maturation of the gonads appeared to bve multiple group synchronous, with the nearest part to the genital pore being recognized as the most mature and the gonad containing oocytes of different developmental stages during the period of maturity. Furthermore, several gonads possessed parts of immature oocytes as well as reabsorbed, atretic follicles ( the part of the gonad of the last period of reproduction). This was mostly observed in July samples and to a lesser extend in the immature part of gonads of September samples.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



## Βιβλιογραφία

- 01.Αθανασοπούλου, 1998
- 02.Amin A.B and Morteuse L., Poppe T., 1992 Histology Atlas. Normal structure of salmonids. Gonads p.160-171.
- 03.Atz J.W.,1964 Intersexuality in fishes. In : Intersexuality in vertebrates including man., Armstrong C.N. and Marshall A.J. (eds), Academic Press, London, pp 145-239
- 04.Cecares et al.
- 05.Chan S.T.H., 1970. Natural sexreversal in vertebrates. Phil. Trans.Roy. Soc. Lond., B.,259:59-71
- 06.Coetzee P.S. 1982. Seasonal histological and macroscopic changes in the gonads of <*Cheimius nufar*> (Ehrenberg, 1820) (Sparidae: Pisces), S. Afr. Zoology. 1983, 18 p.76-88. (Βιβλιοθήκη ΕΚΘΕ).
- 07.Γεωργιάδου Γ. Ελένη, Κασρίτη Ηλ. Παρασκευή, Λέγγας Ν. Μάρκος 1993. Ιστολογικές αλλοιώσεις νοσημάτων στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας του ΤΕΙ Μεσολογγίου κατά το χρονικό διάστημα 1990-1993. Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Μεσολογγίου, τμήμα Ιχθυοκομίας –Αλιείας.
- 08.De Martini, E.E & Fountain, R.K.,1981 Ovarian cycling frequency and batch fecundity in the queen fish, *Seriphus politus*: Attributes representative of serial spawning fishes, in Fish Bull., U.S., 79(3), 547-560. (Βιβλιοθήκη ΕΚΘΕ).
- 09.Faranda F., Cavaliere A., Coparo G., Manganaro A., and Mazzola A., 1985. Preliminary studies on reproduction of *Puntazzo puntazzo* (Gmelin, 1789) (Pisces, Sparidae) under controlled conditions, in Aquaculture, 49, 111-129.
- 10.Garratt P.A., 1986. Protogynous hermaphroditism in the slinger, *Chrysoblephus puniceus* (Glichrist & Thompson, 1908) (Teleostei: Sparidae). J. Fish. Biol., 28: 297-306.
- 11.Harder W. 1975 Anatomy of fishes (part I and II ), ed. Hans Richarz, Publication Service p.p 610.
- 12.HibiyaT., 1982. An atlas of fish histology. Normal and pathological features, p 104-11.
13. Hoar and Randal, 1969 , Fish physiology. Vol III. Sex differentiation 3 p. 118-127.





14. Hotos G. Avramidou D. & Ondrias I., 2000 Reproduction of *Liza Aurata* (Risso, 1810) (Pisces: Mugilidae) in the lagoon of Klisova (Messolonghi, W. Greece). Fisheries research (in press).
15. Hunter Roe J. And Macewicz Beverly J. 1985. Rates of atresia in the ovary of captive and wild Northern anchovy, *Engraulis Mordax*. Fish Bull.U.S. 83, 121-131 Βιβλιοθήκη ΕΚΘΕ.
16. Kaiser, E.C 1973 Gonadal maturation of horse mackerel *Trachurus murphyi* (Nichols) of the coast of Chile. Trans.Am.Fish Soc. 102(1) 101-108
17. Karlou-Riga Constantina & Economidis Panos S. 1996. Ovarian atretic rates and sexual maturity of European horse mackerel *Trachurus trachurus* (L.) in the Saronikos Gulf (Greece) in Fishery Bulletin 94(1) p. 73-74, p. 66-76 (Βιβλιοθήκη ΕΚΘΕ).
18. Kjesbu O.S. and Klungsøyr J., Kryvi H. And Nitthames P.R. and Nalker M., Greer M., 1991. Fecundity, Atresia and egg size of captive Atlantic Cod (*Gradus morhua*) in relation to proximate body composition. Can.J. Fish Aquat. Sci 48: 2333-2343. (Βιβλιοθήκη ΕΚΘΕ).
19. Κοκοκύρης Λάμπρος 1998. Ο αναπαραγωγικός κύκλος και η φύση του ερμαφροδιτισμού του φαγκριού *Pagrus pagrus*. Διδακτορική διατριβή Πανεπιστημίου Κρήτης τμήμα Βιολογίας.
20. Κριμπένη, Αικ., (1994). Στοιχεία Βιολογίας Ιχθύων Θαλάσσης, Οστειχθύες-Χονδριχθύες, Τμήμα Ιχθυοκομίας-Αλιείας, ΤΕΙ Μεσολογίου, Μεσολόγγι, 128 σελ.
21. Luther, Wand Fiedler, K. (1982). Guide de la fanne sous marine des cotes Mediterraneennes (Ed.). De la Chaux et Niestle, Neuchatel, Suisse et Paris, 270p. (όπως αναφέρεται στη Παρπούρα, 1998).
22. Macer T.C., 1974. The reproductive biology of the horse mackerel *Trachurus trachurus* (L) in the North Sea and English channel. J.Fish Biol. 6, 415-438.
23. Mayer I., Shackely S.E & Ryland J.S 1988, Aspects of the reproductive biology of the bass *D. Labrax* (L) I. An histological and histochemical study of oocyte development I. Fish Biol. 33, 609-622.
24. Moore. R., 1979 Natural sexinversion in the Glant Perch (*Lates calcarifer*). Aust. J. Mar. Freshwater Res., 30: 803-813.
25. Ondrias, J.C. (1971). A list of the fresh and sea water fishes of Greece, Practica of the Institute and Fishing Research, Period C, Vol.X, Athens, pp. 23-95.



- 26.Pankhurst N.W; 1998. Reproduction p.1-22 :in Biology of farmed fish p420(ed.) K.D. Black. And A.D. Pickering ; Sheffield Academic Press.
- 27.Papaconstantinou, C.(1988). Fauna. Graeciae IV Check-list of marine fishes of Greece,National Center For Marine Research,Hellenic Zoological Society,Athens,pp. 257.
- 28.Παρπούρα, Α.Χ.(1998). Διαιτητικές απαιτήσεις του είδους *Puntazzo puntazzo*, επίδραση των συνθηκών εκτροφής (σύσταση σιτηρεσίου και θερμοκρασία) στην ανάπτυξη του και τη σύσταση των ιστών του, Διδακτορική διατριβή Τμήμα Βιολογίας,Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,Αθήνα,354σελ.
- 29.Reinboth R., 1970. Intersexuality in fishes. Mem Soc. Endocr., 18: 515-543.
- 30.Roberts R.J. 1989. Fish pathology, 2<sup>nd</sup> edition. Ed R.J. Roberts, Balliere Tindall London U.K.
- 31.Sadovy Y. & Shapiro D.Y.,1987 Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fish. Copeia, 1: 136-156.
- 32.Santulli,A; Cusenza,L., Modica,A. Curatolo,A. and D'Amelio,V. (1991). Fish Plasma Lipoproteins-Comparative Observations in Serranides and Sparides,Biochem., Physiol., Vol.99B,No.2, pp.251-255.
- 33.Sakun O.F and Svirskiy V.G, 1993. Degeneration of previtelligenous and vitelligenus oocytes during the sexual cycle in the Pasific Sardine *Sardinops sagax melanosticta*, Journal of Ichthyology 33(1) Originally published in «Voprosy iahtiologii», 32(3), 1992, 52-58.( Βιβλιοθήκη ΕΚΘΕ).
- 34.Specker J.C., Berlinsky, D.L Bibb.H.D & O'Brien J.F., 1987. Oocyte development in striped bass: Factors influencing estimates of age at maturity. American fisheries Society Symposium 1 162-174.
- 35.Wallace R.A and Selmank, 1981 Celluar and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Am.Zool,21 325-343.
- 36.Wine V.L & Knaggs, E. H., 1975 Maturation and growth of jack mackerel *Trachurus symmetricus*. Calif. Dep. Fish Game Mar. Res. Tech. Rep. 21, 1-26
- 37.Χώτος Γ. 1999, Βιολογία πληθυσμών του μυξιναριού *Liza aurata* (Risso 1810) (Pisces: Mugilidae) της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου- Αιτωλικού. Διδακτορική διατριβή. Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Πατρών.
- 38.Χριστοδουλοπούλου,Ρ. και Αθανασόπουλος,Β. Ψάρια των Ελληνικών Υδάτων,Διπλωματική εργασία ,Τμήμα Ιχθυοκομίας-Αλιείας,ΤΕΙ Μεσολογίου,Μεσολόγγι ,222σελ .
- 39.Van de Horst
- 40.Wetzer









