

Περίληψη

Το πρότυπο στρατολόγησης και ανάπτυξης των ωοκυττάρων σε γονάδες πολλαπλών ωοποθετών με ακαθόριστο πρότυπο γονιμότητας έχει σπανίως μελετηθεί εις βάθος. Στην παρούσα εργασία, ένας συνδυασμός μεθόδων, τεχνικών και θεωριών της αναπαραγωγικής βιολογίας ιχθύων εφαρμόστηκαν σε δείγματα ωοθηκών της ευρωπαϊκή σαρδέλας *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), έναν πολλαπλό ωοαποθέτη με ακαθόριστο πρότυπο γονιμότητας, ώστε να υπολογισθεί ο αριθμός των ωοκυττάρων διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης σε διάφορες γονάδες φάσεις του κύκλου ωορρηξίας. Στη συνέχεια, με τη χρήση γενικών γραμμικών μοντέλων (GLMs) μελετήθηκαν οι διακυμάνσεις των αριθμών αυτών ανάμεσα στα γοναδικά στάδια και τους μήνες της αναπαραγωγής περιόδου με τελικό στόχο τη λεπτομερή περιγραφή της πορείας ωογένεσης των ομάδων αυγών. Κατά τη διάρκεια των κύκλων ωορρηξίας, οι αριθμοί των ωοκυττάρων παραμένουν σε μια κατάσταση δυναμικής ισορροπίας. Σε κάθε κύκλο ωορρηξίας, με την είσοδο της προηγμένης ομάδας ωοκυττάρων στην τελική ωρίμανση, ξεκινάει ένα κύμα στρατολόγησης από την πρωτογενή στην δευτερογενή φάση ανάπτυξης το οποίο ολοκληρώνεται δυο μέρες μετά την ωοτοκία. Απόθεση λεκίθου συμβαίνει σε όλο τον κύκλο ωορρηξίας τόσο σε λεκιθικά ωοκύτταρα όσο και *de novo* ενώ κατά την φάση τελικής ωρίμανσής παρατηρείται αύξηση της έντασης της. Ο αριθμός των ωοκυττάρων σε δευτερογενή ανάπτυξη και τελική ωρίμανση ισοδύναμη με 2-3 ομάδες ωοτοκίας, ανάλογα το στάδιο ανάπτυξης κάθε γονάδας. Η πορεία στρατολόγησης και ανάπτυξης των ωοκυττάρων παραμένει σταθερή καθ’ όλη την περίοδο αναπαραγωγής.

Εισαγωγή

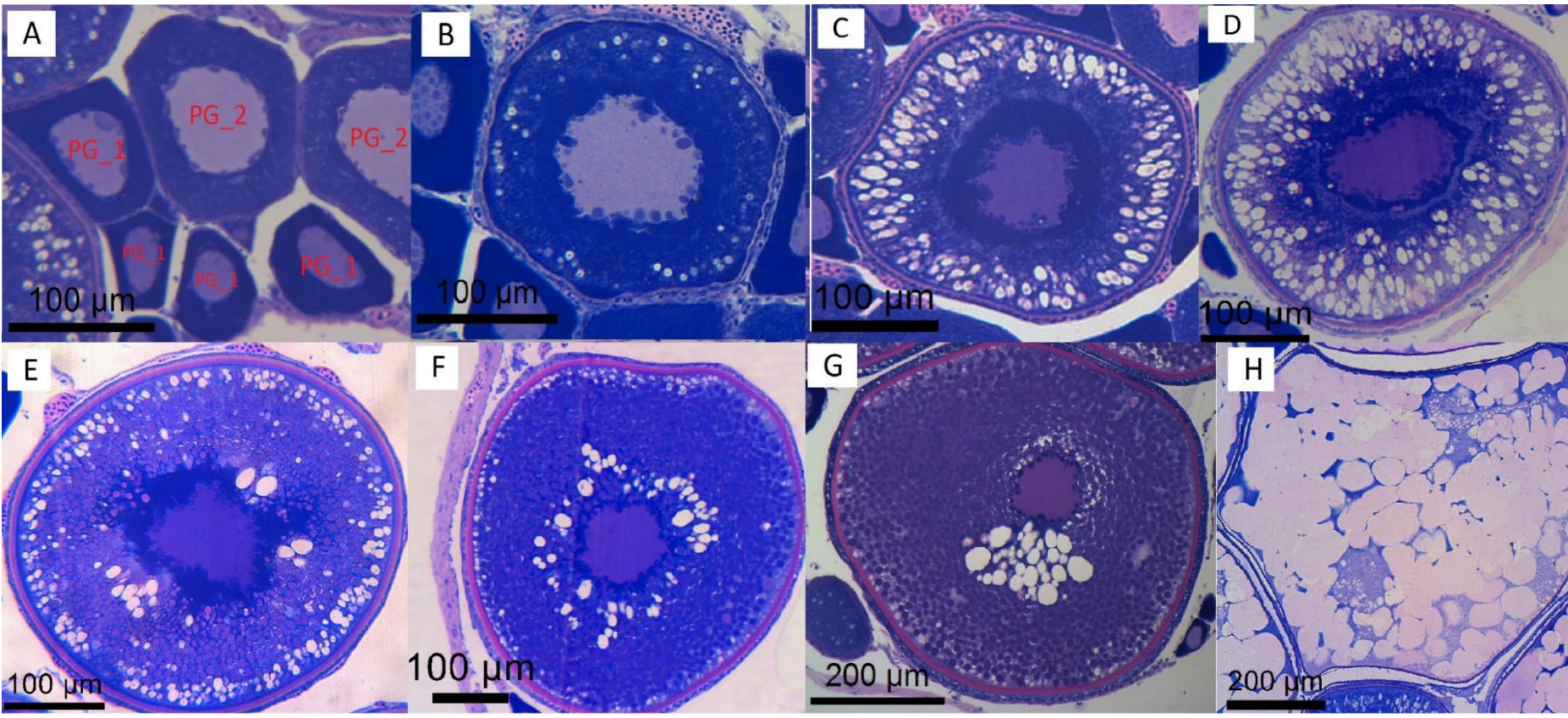
Η πορεία ωογένεσης ακολουθεί σε όλα τα είδη ιχθύων το ίδιο γενικό πρότυπο. Διαφοροποιημένα προμειωτικά κύτταρα, τα ωογόνια, στρατολογούνται προς την πρωτογενή (PG) και στη συνέχεια τη δευτερογενή (SG) φάση ανάπτυξης, η οποία αποτελείται από το στάδιο κυστιδίων λεκίθου (CA) και τα στάδια της λεκιθογένεσης (Vtg). Η τελική ωρίμανση (FM) των ωοκυττάρων ξεκινάει με την μετανάστευση του πυρήνα (GVM) προς το ζωικό πόλο και ολοκληρώνεται με την ενυδάτωση (HYD), η οποία σύντομα ακολουθείται από την ωορρηξία [1]. Αναγνωρίζονται δύο πρότυπα ανάλογα τον τρόπο που συμβαίνει η στρατολόγηση των ωοκυττάρων από την πρωτογενή προς τη δευτερογενή ανάπτυξη. Στην καθορισμένη γονιμότητα η στρατολόγηση των ωοκυττάρων ολοκληρώνεται πριν την έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου ενώ στην ακαθόριστη γονιμότητα η στρατολόγηση συνεχίζει να συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου [2]. Τα είδη με ακαθόριστο πρότυπο γονιμότητας είναι και πολλαπλοί ωοαποθέτες (batch spawners) και συνεπώς η περιγραφή της πορείας δημιουργίας κάθε ομάδας αυγών είναι πολυεπίπεδη αφού πρέπει να περιλαμβάνει όλες τις μεταβάσεις από το ένα αναπτυξιακό στάδιο στο επόμενο τόσο χρονικά όσο και ποσοτικά ενώ παράλληλα οι πολλαπλές, διαδοχικές ωοτοκίες θέτουν τις γονάδες σε μια συνεχή δυναμική κατάσταση. Τέτοιες εις βάθος ωοτοκαφές της ωογένεσης έχουν πραγματοποιηθεί σε ελάχιστες περιπτώσεις παρά την σημαντική γνώση που μπορούν να προσφέρουν για τον τρόπο με τον οποίο καθορίζετε η ατομική γονιμότητα [3]. Στόχος της παρούσας εργασίας αποτελεί η λεπτομερής περιγραφή του προτύπου ανάπτυξης και στρατολόγησης των ομάδων αυγών στην ευρωπαϊκή σαρδέλα, ανάμεσα στα διαδοχικά γεγονότα ωοτοκίας και κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης χειμερινής αναπαραγωγικής του περιόδου.

Υλικά και Μέθοδοι

Δείγματα σαρδέλας συλλέχθηκαν από την περιοχή του Β. Αιγαίου για την περίοδο Νοέμβριος 2018-Οκτώβριος 2019 σε μηνιαία βάση και οι γονάδες θηλυκών ατόμων αφαιρέθηκαν και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Παρασκευή ιστολογικών παρασκευασμάτων (έγκληση σε ρητίνη, τομές ~4μm, χρώση με κυανό του μεθυλίου- βασική φουξίνη)
- Αξιολόγηση γοναδικών ιστολογικών παρασκευασμάτων ως προς το αναπτυξιακό στάδιο της πιο προηγμένης ομάδας ωοκυττάρων (Εικόνα 1), την φάση/ένταση της ατρησίας και την παρουσία /ηλικία POFs.
- Επιλογή 59 γονάδων επιλεγμένων γοναδικών σταδίων (Vtg2,POF-1; Vtg2,POF-2; Vtg3 και GVM) ώστε να καλύπτουν διαδοχικές γοναδικές φάσεις του κύκλου ωορρηξίας σε όλη την περίοδο αναπαραγωγής (Νοέμβριος-Μάρτιος)
- Εφαρμογή της εξίσωσης «πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων (OPD)» [4] στις επιλεγμένες γονάδες για την εκτίμηση του απόλυτου αριθμού των ωοκυττάρων κάθε σταδίου σε κάθε γονάδα.
- Χρήση γενικών γραμμικών μοντέλων (GLMs) για τη μελέτη της επίδρασης του γοναδικού σταδίου και του μήνα της αναπαραγωγικής περιόδου στους σχετικούς αριθμούς των ωοκυττάρων κάθε σταδίου i (N_i/N_{total})

Οι δειγματοληψίες, η επεξεργασία των δειγμάτων και η ιστολογική επεξεργασία των γονάδων πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος CLIMAFISH.

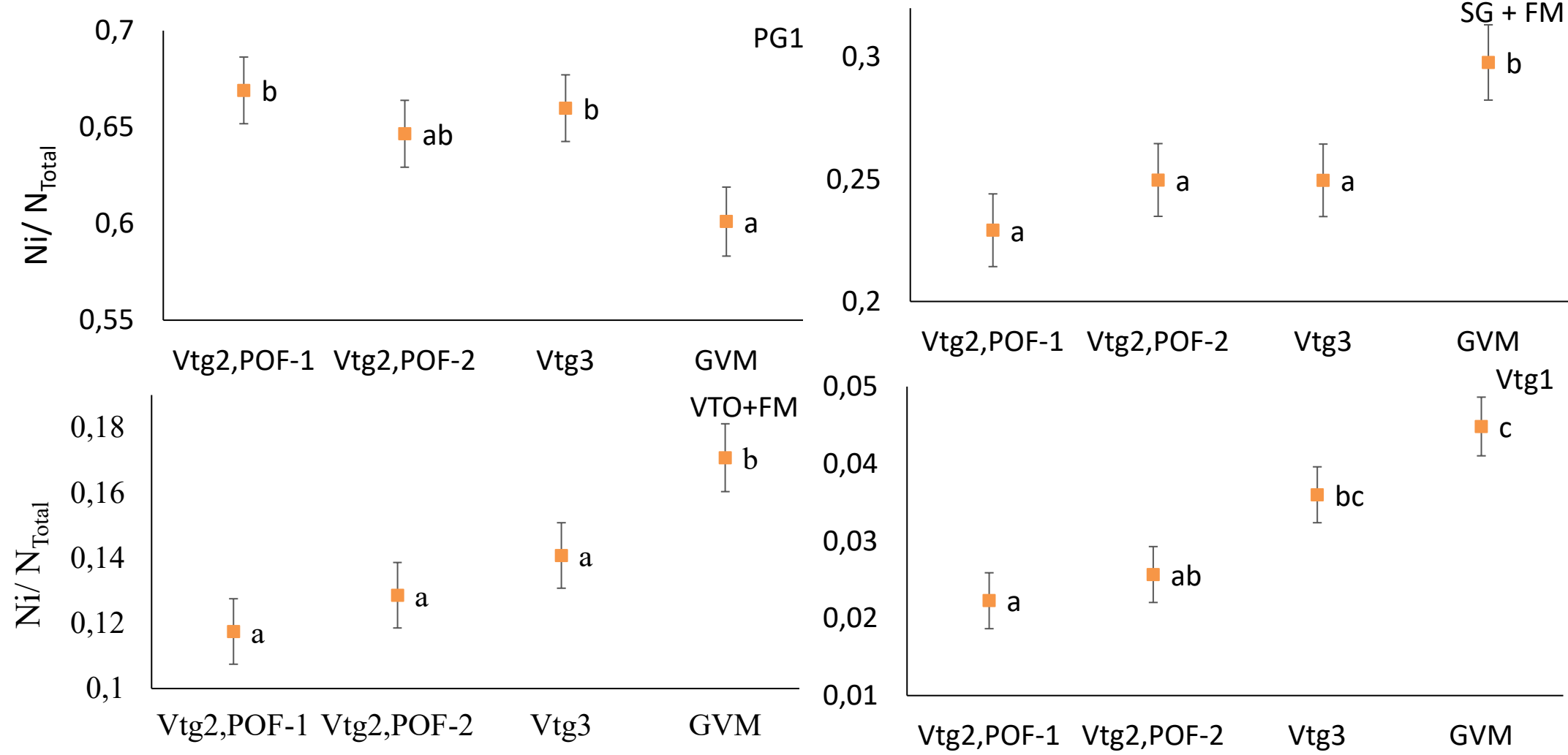


Εικόνα 1. Οκύτταρα του είδους *Sardina pilchardus* σε διαφορετικά στάδια και υποστάδια ανάπτυξης. (Α) πρωτογενή ωοκύτταρα (PG) στα δύο υποστάδια PG1 και PG2, (Β) στάδιο κυστιδίων λεκίθου – αρχική ανάπτυξη (CA1), (C) στάδιο κυστιδίων λεκίθου – προχωρημένη ανάπτυξη (CA2), (D) πρωτογενής λεκιθογένεση (Vtg1), (Ε) δευτερογενής λεκιθογένεση (Vtg2), (F) τριτογενής λεκιθογένεση (Vtg3), (G) μετανάστευση πυρήνα (GVM), (H) ενυδατωμένα (HYD) ωοκύτταρα.

Αποτελέσματα

Ο αριθμός των συνολικών ωοκυττάρων ανά γραμμάριο γονάδας μειωνόταν σταθερά όσο αυξανόταν η μέση διάμετρος των ωοκυττάρων. Από την εφαρμογή των GLM μοντέλων φάνηκε ότι ο μήνας της αναπαραγωγικής περιόδου δεν επιδρά στους σχετικούς αριθμούς των ωοκυττάρων σε αντίθεση με το γοναδικό στάδιο. Από την μελέτη των σχετικών αριθμών των ωοκυττάρων διαφορετικών σταδίων στα διάφορα γοναδικά στάδια φάνηκε ότι όταν η γονάδα εισέρχεται στη φάση τελικής ωρίμανσης, ένα σημαντικό ποσοστό πρωτογενών ωοκυττάρων στρατολογείται προς τα επόμενα γοναδικά στάδια (Εικόνα 2). Απόθεση λεκίθου συμβαίνει διαρκώς καθ’όλη τη διάρκεια του κύκλου ωορρηξίας, τόσο σε είδη λεκιθικά κύτταρα όσο και *de novo* (αύξηση του λόγου των Vtg1 ωοκυττάρων) (Εικόνα 2) ενώ κατά την φάση τελικής

ωρίμανσης παρατηρείται αύξηση της ένταση της. Ο λόγος γονιμότητας (Fecundity ratio = SG+FM/Γονιμότητα ομάδας) υπολογίσθηκε σε 2-3 ανάλογα το γοναδικό στάδιο (Πίνακας 1). Δύο μέρες μετά την ωοτοκία (Vtg2,POF2) η στρατολόγηση των ωοκυττάρων προς τη δευτερογενή ανάπτυξη ολοκληρώνετε με το λόγος γονιμότητας να παραμένει σταθερός μέχρι το τέλος της λεκιθογένεσης.



Εικόνα 2. Εκτιμώμενες μέσες τιμές (±SE) των λόγων N_i/N_{total} για διαφορετικά ωοκυτταρικά στάδια σε διαφορετικά γοναδικά στάδια βάση των GLM μοντέλων . a<b: ομογενείς ομάδες.

		PG1/Total	PG2/Total	(SG+FM)/Total	Fecundity Ratio
Gonad stage	Vtg2,POF-1	0.669	0.102	0.229	2.275
	Vtg2,POF-2	0.646	0.104	0.25	2.479
	Vtg3	0.66	0.091	0.25	2.478
	GVM	0.601	0.101	0.298	2.957

Πίνακας 1. Λόγοι N_i/N_{total} για τα ωοκυτταρικά στάδια PG1, PG2 και το άθροισμα των κυττάρων έχει εισέλθει ή ολοκληρώσει το δευτερογενές στάδιο ανάπτυξης (SG+FM) ανά γοναδικό στάδιο όπως υπολογίσθηκαν από τα αντίστοιχα GLM μοντέλα. Παρουσιάζεται επίσης ο λόγος SG+ FM προς τη γονιμότητα ομάδας (Fecundity ratio).

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η πορεία δημιουργίας των ομάδων αυγών στις ωοθήκες της σαρδέλας περιεγράφηκε λεπτομερώς ανάμεσα στα διαδοχικά συμβάντα ωοτοκίας. Το πρότυπο στρατολόγησης και ανάπτυξης παρέμεινε σταθερό σε όλη την περίοδο αναπαραγωγής και παρουσιάζει κοινά στοιχεία με ότι ξέρουμε για άλλα είδη. Συγκεκριμένα, στον γαύρο έναν επίσης ακαθόριστος πολλαπλό ωοαποθέτη, η στρατολόγηση ομάδας πραγματοποιείται επίσης σε παλμούς μικρής διάρκειας, ενεργοποιούμενους από την ενυδάτωση [5] ενώ στο είδος *Alosa macedonica* η έναρξη της στρατολόγησης πρωτογενών ωοκυττάρων προς τη δευτερογενή ανάπτυξη σχετίζεται με την ωορρηξία [6]. Η αύξηση της λεκιθογένεσης κατά την τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων έχει παρατηρηθεί ξανά στο είδος *Etrumeus golanii* [7]. Η λεπτομερής περιγραφή της πορείας δημιουργίας ομάδων αυγών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της δυναμικής των ωοθηκών και η γνώση αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την μελέτη επιδράσεων περιβαλλοντικών παραγόντων στην γονιμότητα.

Αναφορές

1. Brown-Peterson, Nancy J., David M. Wyanski, Fran Saborido-Rey, Beverly J. Maciewicz, and Susan K. Lowerre-Barbieri. 2011. "A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes." *Marine and Coastal Fisheries* 3(1):52–70. doi: 10.1080/19425120.2011.555724
2. Hunter, J. Roe, Beverly J. Macewics, N. Chyan-huei Lo, and Carol A. Klimberli. 1992. "Fecundity, Spawning, and Maturity of Female Dove Sole *Microstomus Pacificus*, with an Evaluation of Assumptions and Precision." *Fishery Bulletin, U.S.* 90:101–28.
3. Charitonidou, Katerina, Olav Sigurd Kjesbu, Cristina Nunes, Maria Manuel Angelico, Rosario Dominguez-Petit, Dolores Garabana, and Konstantinos Ganiats. 2022a. "Linking the Dynamic Organization of the Ovary with Spawning Dynamics in Pelagic Fishes." *Marine Biology* 169(4). doi: 10.1007/s00227-022-04032
4. Kortá, Maria, Hilario Murua, Yutaka Kurita, and Olav S. Kjesbu. 2010. "How Are the Oocytes Recruited in an Indeterminate Fish? Applications of Stereological Techniques along with Advanced Packing Density Theory on European Hake (Merluccius Merluccius L.)." *Fisheries Research* 104(1–3):56–63. doi: 10.1016/j.fishres.2010.01.010.
5. Schismenou, Eudoxia, Stylianos Somarakis, Anders Thorsen, and Olav S. Kjesbu. 2012. "Dynamics of de Novo Vitellogenesis in Fish with Indeterminate Fecundity: An Application of Oocyte Packing Density Theory to European Anchovy, Engraulis Encrasicolus." *Marine Biology* 159(4):757–68. doi: 10.1007/s00227-011-1852-y.
6. Mouchlianitis, Foivos Alexandros, George Minos, and Kostas Ganiats. 2020. "Timing of Oocyte Recruitment within the Ovulatory Cycle of Macedonian Shad, Alosa Macedonica, a Batch Spawning Fish with Indeterminate Fecundity." *Theriogenology* 146:31–38. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.050.
7. Somarakis, Stylianos, Maria Giannoulaki, Konstantinos Markakis, Kostas Tsiaras, Eudoxia Schismenou, and Panagiota Peristeraki. 2021. "Ovarian Dynamics, Batch Fecundity and Spawning Phenology of the Lessepsian Migrant Etrumeus Golanii DiBattista, Randall & Bowen, 2012 (Clupeidae: Dussumieriinae)." *Mediterranean Marine Science* 22(3):466–79. doi: 10.12681/mms.27099.