

Εισαγωγή

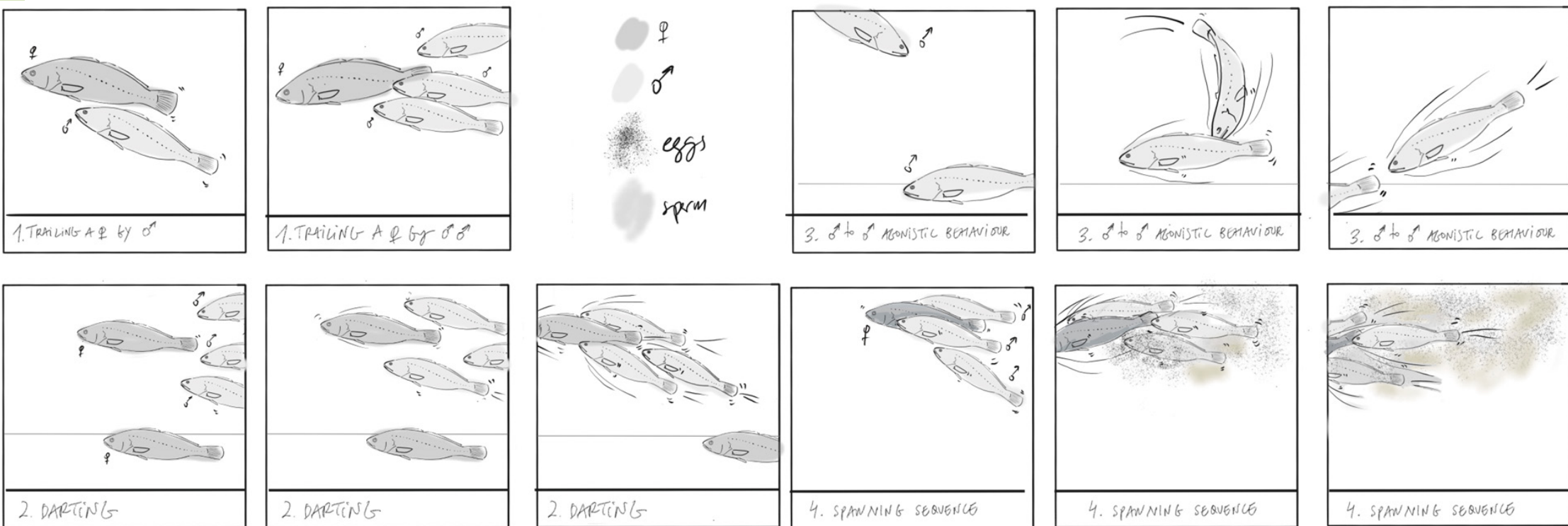
Ο κρανιός (*Argyrosomus regius*) είναι ένα είδος με σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον για τη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Ωστόσο, το είδος παρουσιάζει αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες σε συνθήκες εκτροφής. Οι αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες έχουν επιλυθεί με την χρήση πρωτοκόλλων επαγωγής γαμετοτοκίας με βάση την χορήγηση εξωγενούς γοναδοεκλυτίνης (Gonadotropin Releasing Hormone agonist – GnRHα). Ταυτόχρονα γίνεται χρήση πρωτοκόλλων με βάση την GnRHα για την ενίσχυση της σπερμιάσης στους αρσενικούς γεννήτορες κρανιού (Fakriadis, 2020). Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί η συμμετοχή των διαφορετικών γεννητόρων σε κάθε αναπαραγωγικό γεγονός αλλά και η αναπαραγωγική συμπεριφορά των γεννητόρων και οι σχέσεις κυριαρχίας που αναπτύσσονται σε κάθε ομάδα γεννητόρων. Έτσι, δεν είναι γνωστό πόσο αντιπροσωπευτικός του αρχικού πληθυσμού γεννητόρων είναι ο πληθυσμός απογόνων που δημιουργείται μετά από την επαγωγή της γαμετοτοκίας, με κίνδυνο την σταδιακή μείωση της γενετικής ποικιλότητας και την ομομιξία στις επόμενες γενιές. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση της γονικής συμμετοχής σε κάθε γέννα σε συνδυασμό με την αναπαραγωγική συμπεριφορά των γεννητόρων.

Υλικά και Μέθοδοι

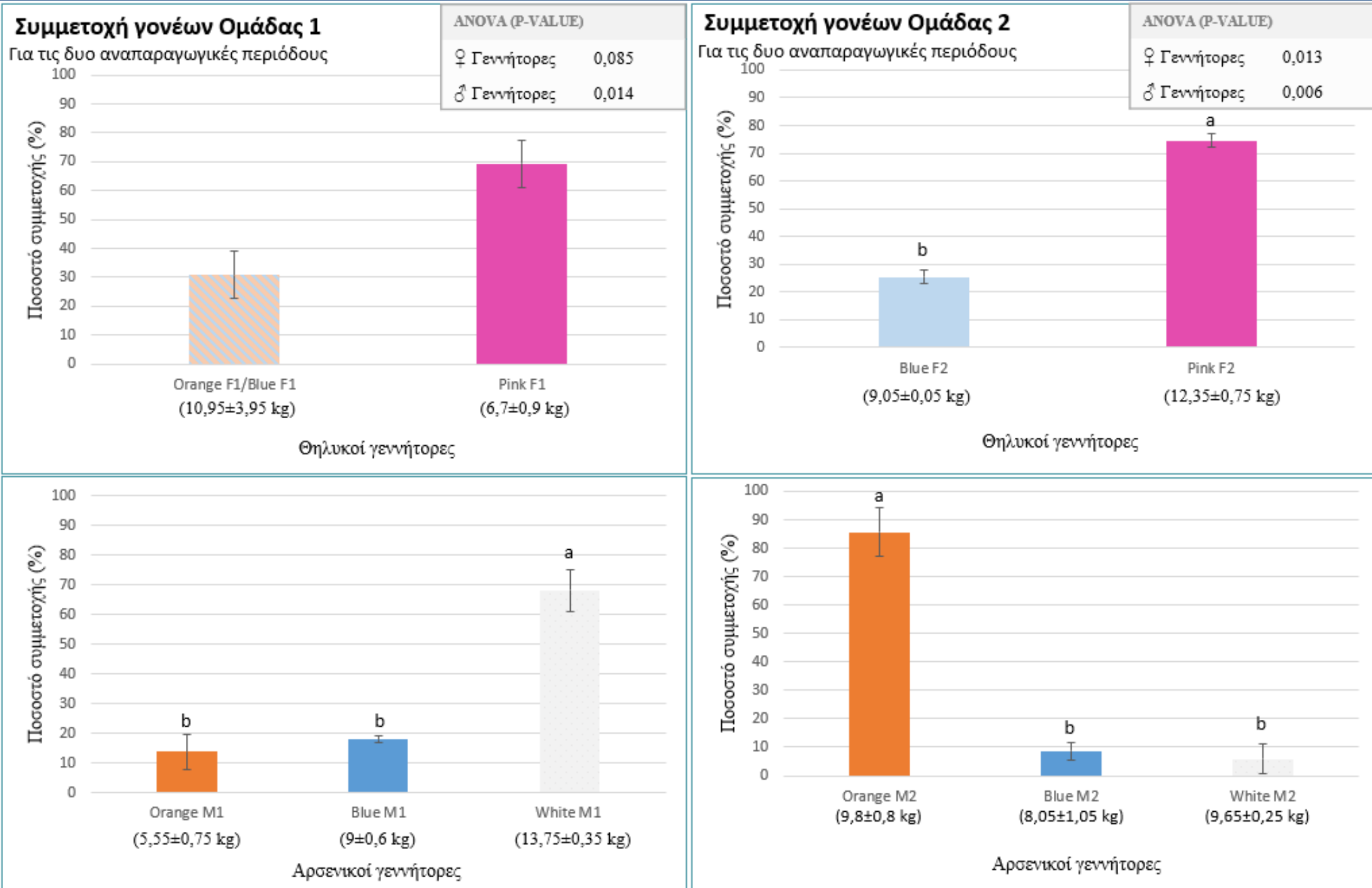
Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 10 αναπαραγωγικά ώριμοι εκτρεφόμενοι κρανιοί για δυο διαδοχικές αναπαραγωγικές περιόδους. Οι γεννήτορες χωρίστηκαν σε δυο αναπαραγωγικές ομάδες (αναλογία φύλου, 2 ♀:3♂) και έφεραν εξωτερικές μάρκες γνωστού χρώματος. Οι αρσενικοί γεννήτορες έφεραν μάρκες τετράγωνου σχήματος, ενώ οι θηλυκοί γεννήτορες έφεραν μάρκες κυκλικού σχήματος. Κατά την εκτιμώμενη έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και επαγωγή της γαμετοτοκίας με GnRHα (Duncan et al., 2012; Mylonas and Zohar, 2000).

Οι κινήσεις των γεννητόρων καταγράφηκαν με χρήση υποβρύχιου εξοπλισμού επί 24-ώρου βάσεως για 5 συνεχόμενες ημέρες μετά την πρόκληση της γαμετοτοκίας. Με την ανάλυση των καταγραφών εντοπίστηκαν τα κυρίαρχα πρότυπα της συμπεριφοράς τα οποία στην συνέχεια αναλύθηκαν σε βάθος (**Εικόνα 1**).

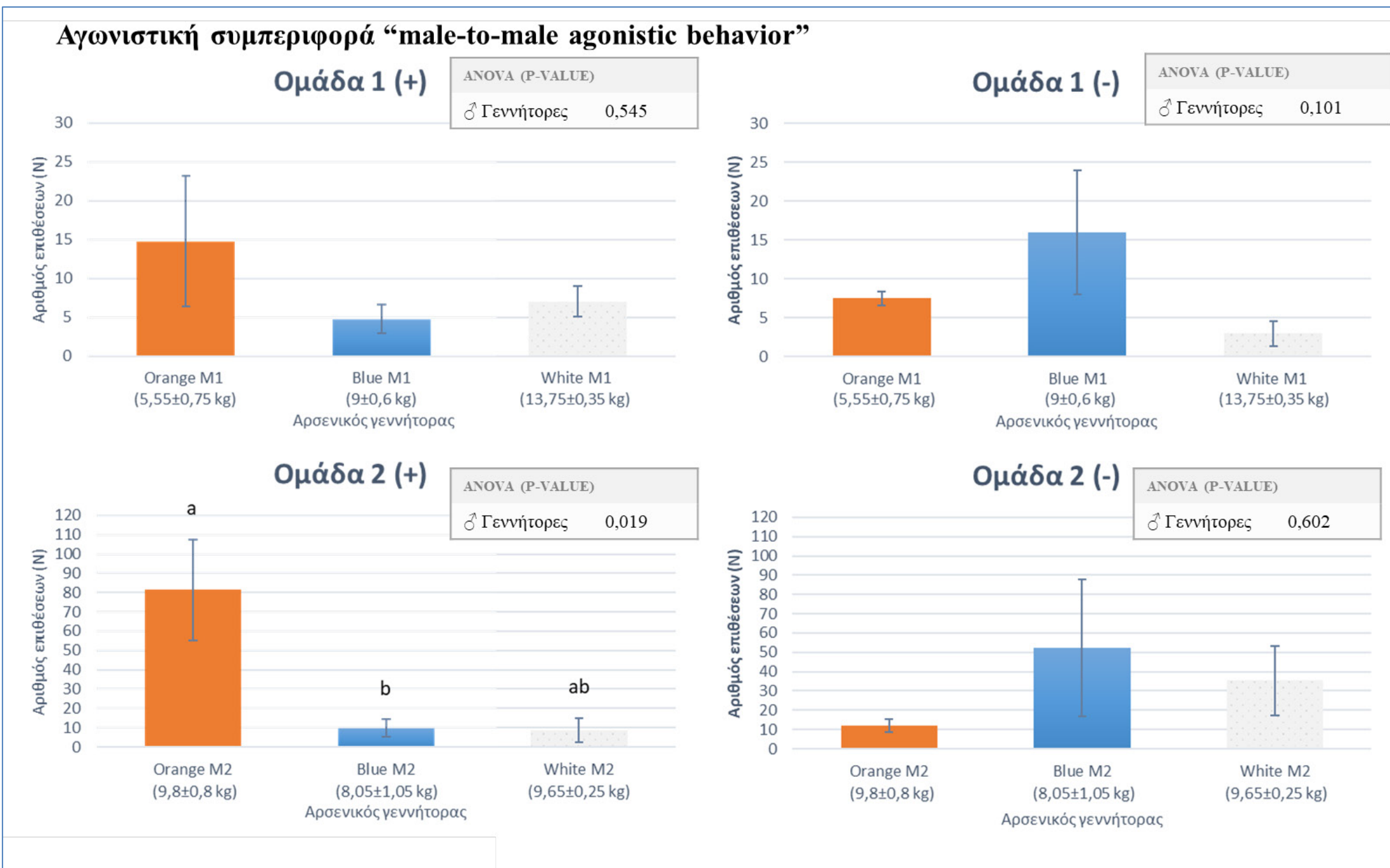
Για τις αναλύσεις γονικής συμμετοχής το γενετικό υλικό λήφθηκε από μεμονωμένα αυγά και από ένα κομμάτι πτερυγίου, για τους απογόνους και τους γεννήτορες αντίστοιχα. Η ενίσχυση του DNA πραγματοποιήθηκε σε 12 μικροδορυφορικούς τόπους με την χρήση Multiplex PCR ενώ η ανάθεση των απογόνων στους γονείς έγινε με την μέθοδο του αποκλεισμού με το πρόγραμμα Vitassign (Nousias et al., 2020, 2021).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των συμπεριφορών που σχετίζονται με την αναπαραγωγή. 1. Ακολουθία (“trailing”). 2. Απότομη ακολουθία ενός θηλυκού από το σύνολο των αρσενικών γεννητόρων (“darting”). 3. Επιθετική συμπεριφορά αρσενικών (“male-to-male agonistic behavior”) 4. Αναπαραγωγική διαδικασία, απελευθέρωση γαμετών (“spawning sequence”) (Σχέδιο: Clara Cerviño, Ilustración científica) .



Σχήμα 1. Ποσοστό συνεισφοράς γεννητόρων ($\pm$ τυπικό σφάλμα) κρανιού *Argyrosomus regius* στις ωοτοκίες δυο αναπαραγωγικών περιόδων (n=2). **Αριστερά:** Ποσοστό συνεισφοράς θηλυκών γεννητόρων στις ωοτοκίες. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στην συνεισφορά των θηλυκών γεννητόρων της ομάδας 2 για τα δυο έτη του πειράματος (one-way ANOVA, P=0,006). **Δεξιά:** Ποσοστό γονιμοποίησης αυγών από τους αρσενικούς γεννήτορες στις δυο ομάδες γεννητόρων. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και στην ομάδα γεννητόρων 1 (one-way ANOVA, P=0,01) και στην ομάδα γεννητόρων 2 (one-way ANOVA, P=0,01). Με λατινικούς χαρακτήρες απεικονίζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που εντοπίστηκαν. Με δυο ονόματα παρουσιάζεται ένας από τους θηλυκούς γεννήτορες της ομάδας 1, το Blue F1 συμμετείχε κατά το πρώτο έτος του πειράματος (2021) και αντικαταστάθηκε μετά τον θάνατο του με το Orange F1 για το δεύτερο έτος του πειράματος (2022).



Σχήμα 2. Αριθμός επιθέσεων ($\pm$ τυπικό σφάλμα) αρσενικών-προς-αρσενικά (“agonistic behavior”) σε δύο ομάδες κρανιών *Argyrosomus regius* κατά τα δυο έτη του πειράματος. **Αριστερά:** Αριθμός επιθέσεων που προκάλεσαν (+), Στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν μόνο μεταξύ των αρσενικών της Ομάδας 2 (one-way ANOVA, P=0,018). **Δεξιά:** αριθμός επιθέσεων που δέχτηκαν (-) οι αρσενικοί γεννήτορες της Ομάδας γεννητόρων 1 και 2, αντίστοιχα (one-way ANOVA, P>0,05).

Αποτελέσματα

Η πρόκληση ωοτοκίας οδήγησε σε τρεις διαδοχικές ημερήσιες ωοτοκίες. Η μέση περίοδος ωρίμανσης από την χορήγηση GnRHα μέχρι και την πρώτη ωοτοκία ήταν 34,1 $\pm$ 0,9 ώρες. Η μέση ημερήσια σχετική γονιμότητα ήταν 159.743 $\pm$ 23.315 αυγά kg-1, ενώ η γονιμοποίηση ήταν 83 $\pm$ 0 % και 93 $\pm$ 0%, για το Έτος 1 και το Έτος 2, αντίστοιχα (P=0,036).

Η γενετική ανάλυση συνεισφοράς των γεννητόρων έδειξε ότι το 77 $\pm$ 3% των αυγών παρήχθησαν από το ίδιο θηλυκό, ενώ το 77 $\pm$ 9% των αυγών γονιμοποιήθηκαν από το ίδιο αρσενικό σε κάθε ομάδα και για τα δύο έτη (**Σχήμα 1**).

Ο μεγαλύτερος μεταξύ των αρσενικών γεννήτορας στην αναπαραγωγική Ομάδα 1 γονιμοποίησε το 68 $\pm$ 9% των αυγών κατά τα δύο έτη της μελέτης. Στην Ομάδα 2, το πιο επιθετικό αρσενικό γονιμοποίησε το 86 $\pm$ 8 % των αυγών και στα δυο έτη του πειράματος, ενώ στην άλλη ομάδα, η επιθετική συμπεριφορά μεταξύ των αρσενικών γεννητόρων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές (**Σχήμα 2**).

Το σύνολο των αναπαραγωγικών γεγονότων (ωοτοκία) βρέθηκε να συμβαίνει μετά την δύση του ηλίου, με μια εξαίρεση. Σε κάθε αναπαραγωγικό γεγονός βρέθηκε να συμμετέχει ένας θηλυκός γεννήτορας ενώ οι συμμετέχοντες αρσενικοί γεννήτορες ήταν ένας έως και το σύνολο των αρσενικών γεννητόρων της ομάδας. Η μέση διάρκεια του αναπαραγωγικού γεγονότος βρέθηκε να είναι ίση με 0,91 $\pm$ 0,06 λεπτά.

Συζήτηση και Συμπεράσματα

Σε κάθε ωοτοκία παρατηρήθηκε να συμμετέχει ένα μόνο θηλυκό, ενώ συμμετείχε από ένα έως και το σύνολο των αρσενικών γεννητόρων. Βάση των γενετικών δεδομένων για τις δυο αναπαραγωγικές περιόδους και για τις δυο ομάδες γεννητόρων πραγματοποιήθηκαν 23 ωοτοκίες. Αυτό δείχνει ότι τα θηλυκά γέννησαν με πολύ καλό συντονισμό, μετά την επαγωγή της ωρίμανσης με τη ένεση GnRHα.

Η συμπεριφορά της ερωτοτροπίας ήταν διακριτή στο σύνολο των καταγεγραμμένων ωοτοκιών. Κατά την έναρξη της ερωτοτροπίας οι αρσενικοί γεννήτορες που συμμετείχαν προσέγγιζαν τον θηλυκό γεννήτορα ενώ ταυτόχρονα αυξανόταν η ταχύτητα κολύμβησης. Παρόμοιο μοτίβο ερωτοτροπίας βρέθηκε να έχει το είδος *Atractoscion nobilis* (Aalbers and Drawbridge, 2008) και στο είδος *Epinephelus marginatus* (Zabala i Limousin et al., 1997).

Η επίδειξη κυριαρχίας μέσω έκφρασης επιθετικής συμπεριφοράς φάνηκε να εξαρτάται τόσο από τα μεγέθη των γεννητόρων αλλά και από τον αριθμό των επιθέσεων που προκαλούν στους άλλους γεννήτορες. Ταυτόχρονα το ποσοστό συμμετοχής φάνηκε να επηρεάζεται από τις παραπάνω παραμέτρους. Χαρακτηριστικά, στην πρώτη ομάδα, ο αριθμός επιθέσεων που προκλήθηκε από τον κάθε γεννήτορα δεν διέφερε μεταξύ των γεννητόρων. Παρόλα αυτά, μαζί με τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης των απογόνων παρατηρήθηκε πως ο γεννήτορας με την τάση για περισσότερες επιθέσεις προς τους άλλους γεννήτορες, δεν γονιμοποίησε την πλειονότητα των αυγών. Η εικόνα αυτή ήταν διαφορετική στην δεύτερη ομάδα γεννητόρων, όπου ο γεννήτορας που προκάλεσε τον μεγαλύτερο αριθμό επιθέσεων γονιμοποίησε τον μεγαλύτερο αριθμό αυγών σε σχέση με τους άλλους γεννήτορες. Σε αντίθεση με την ομάδα 1 το σωματικό βάρος των αρσενικών γεννητόρων δεν διαφοροποιούνταν. Αυτό παρατηρήθηκε στο σύνολο των ωοτοκιών και στις δυο αναπαραγωγικές περιόδους. Οι σχέσεις κυριαρχίας μεταξύ των αρσενικών γεννητόρων κρανιού είναι ένα θέμα το οποίο πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω κυρίως μεταξύ αρσενικών γεννητόρων όμοιου μεγέθους.

Μέσω της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται για πρώτη φορά η αναπαραγωγική συμπεριφορά του είδους σε συνθήκες εκτροφής. Περεταίρω έρευνα πρέπει να γίνει σχετικά με την αναπαραγωγή του είδους στο φυσικό περιβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο, η γνώση της συμπεριφοράς, της ηθολογίας και των αλληλεπιδράσεων που εμφανίζει το είδος στην αναπαραγωγή του μπορεί να οδηγήσει στην επιτυχημένη αναπαραγωγή του είδους σε συνθήκες υδατοκαλλιέργειας, δίχως την χρήση εξωγενών ορμονών.