

Βελτίωση της σπερμίας στον κρανιό *Argyrosomus regius* με εμφυτεύματα GnRHα και αξιολόγηση της ποιότητας σπέρματος με χρήση Αυτοματοποιημένης Ανάλυσης Σπέρματος (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)

Ιωάννης Φακριάδης¹, Eugenio Maria Zanatta^{1,2}, Κωνσταντίνος Μυλωνάς¹

¹ Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιέργειών, Ηράκλειο,

Κρήτη 71500 – fakriadis@hcmr.gr

²Department of Biology, University of Padova, Italy

ABSTRACT

Ioannis Fakriadis¹, Eugenio Maria Zanatta¹, Constantinos Mylonas¹: Enhancement of spermiation in meagre *Argyrosomus regius* using GnRHα implants and evaluation of sperm quality using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

The present study tested a spermiation enhancement hormonal therapy with GnRHα implants on meagre (*Argyrosomus regius*), an emerging species for the European aquaculture. Evaluation of spermiation and sperm quality was done using two different protocols: a) the «subjective» and b) the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA). Sperm production was increased significantly and sperm quality remained almost unchanged throughout the spawning period of 2.5 months.

Keywords: meagre, GnRHα implants, spermiation, sperm quality, CASA, aquaculture

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κρανιός είναι ένα από τα αναδυόμενα είδη της ιχθυοκαλλιέργειας, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που εμφανίζει, όπως η εύκολη διαχείριση των γεννητόρων, η εύκολη εκτροφή των νυμφών και η αργή αναπαραγωγική ωρίμανση (Mylonas et al., 2013). Επιπλέον αυτών, ο ρυθμός ανάπτυξης του είδους είναι πολύ ικανοποιητικός, αφού μπορεί να φθάσει το 1 κιλό τον πρώτο χρόνο, με ιδιαίτερα αποδοτική μετατρεψιμότητα τροφής (FCR) $0,9 \pm 0,1$ (Chatzifotis et al., 2012).

Ο κρανιός είναι ένα γονοχωριστικό είδος που ωριμάζει αναπαραγωγικά σε ηλικία δύο ετών για τα αρσενικά και στα τρία χρόνια για τα θηλυκά. Η ανάπτυξη των ωοθηκών είναι ασύγχρονη φέροντας ωοκύτταρα σε διαφορετική φάση λεκιθογένεσης (Mylonas et al., 2013). Σε συνθήκες αιχμαλωσίας ο κρανιός συνήθως δεν φθάνει στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων του (Duncan et al., 2012) με αποτέλεσμα να χρειάζεται η χορήγηση ορμονικών θεραπειών για την ολοκλήρωση του αναπαραγωγικού κύκλου. Ωστόσο, ένας από τους καθοριστικούς παράγοντες της αναπαραγωγικής επιτυχίας, εκτός από την ποιότητα των θηλυκών γαμετών, είναι και η ποιότητα των αρσενικών γαμετών (Bobe and Labbé, 2010). Στον κρανιό, αν και η ωρίμανση των αρσενικών ολοκληρώνεται επιτυχώς σε συνθήκες αιχμαλωσίας φαίνεται ότι η παραγόμενη ποσότητα σπέρματος είναι περιορισμένη (Mylonas et al., 2016), και γι' αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό να αναπτυχθούν μέθοδοι για την αποτελεσματική λειτουργία των αρσενικών.

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο τη δοκιμή μιας ορμονικής θεραπείας με χρήση gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHα) με σύστημα παρατεταμένης απελευθέρωσης (implant) στον κρανιό για την βελτίωση της παραγωγής και της ποιότητας του σπέρματος.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) στο Ηράκλειο Κρήτης (Αριθμός Πειραματικού Πρωτόκολλου 255356-29/11/2017 Διεύθυνση Κτηνιατρικής Κρήτης). Τα ψάρια προέρχονταν από αυγά που εκκολάφθηκαν στις εγκαταστάσεις του ΙΘΑΒΒΥΚ το 2010 και από την εταιρεία LPDS (Γαλλία) το 2012. Τα ψάρια διατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια του έτους σε δεξαμενές 10 m³, εκτέθηκαν σε συνθήκες φυσικής φωτοπεριόδου η ανανέωση του νερού ήταν 5 φορές την ημέρα και τρέφονταν 3 ημέρες την εβδομάδα μέχρι κορεσμού με τροφή γεννητόρων (Vitalis CAL 22mm, Skretting SA). Σε εβδομαδιαία

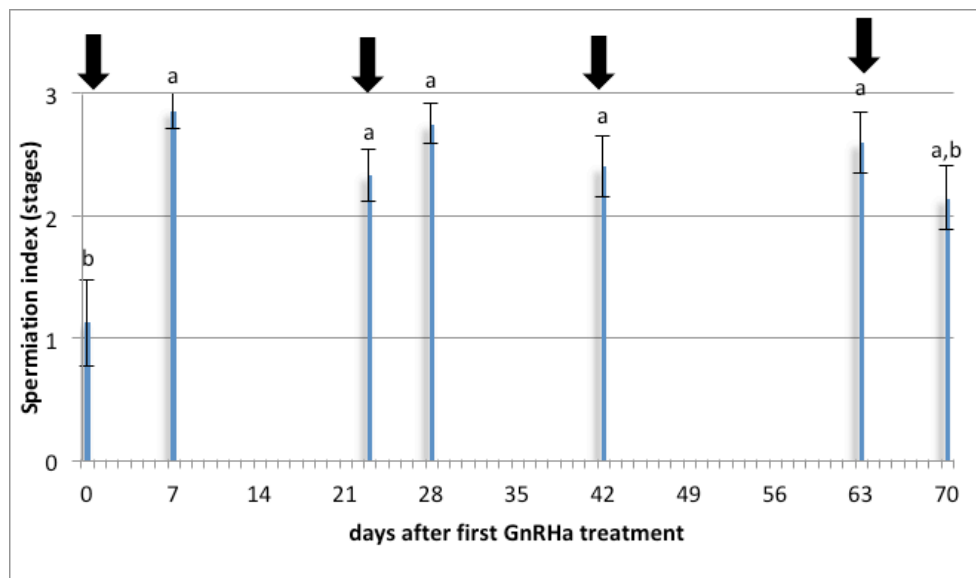
βάση γινόταν η μέτρηση των θερμοκρασιών και της ποιότητας του νερού (διαλυμένο οξυγόνο, νιτρώδη και αμμωνία). Για την πρόκληση ωοτοκίας και σπερμίας, δύο αρσενικά και ένα θηλυκό, μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή 5 m³ και εκτέθηκαν σε φυσική φωτοπερίοδο, αλλά σταθερή θερμοκρασία νερού (~ 19°C).

Στα θηλυκά (μέσο βάρος ± SD, 7,8 ± 1,6 kg) δόθηκε ένεση GnRHα 10 μg kg⁻¹ (H-4070, Bachem , Ελβετία) σε τυχαία διαστήματα για μιά περίοδο 70 ημερών, μεταξύ 23 Απριλίου - 02 Ιουλίου 2018 (Εικ. 1). Εμφυτεύματα GnRHα (50 μg kg⁻¹) χορηγήθηκαν στα αρσενικά ψάρια στην πρώτη πρόκληση ωοτοκίας των θηλυκών, και έπειτα περίπου ανά 3 εβδομάδες. Δείγματα σπέρματος λήφθηκαν κατά τις ημέρες 0 (23 Απριλίου 2018), 7, 23, 28, 42, 63 και 70, όταν γινόταν πρόκληση ωοτοκίας στα θηλυκά. Για την χρήση τους στο πείραμα, αρσενικά ψάρια θεωρήθηκαν επιλέξιμα εάν είχαν δείκτη σπερμίας S ≥ 1 κατά την ημέρα 0, όπου S0: όταν τα ψάρια δεν απελευθερώνουν σπέρμα μετά από ελαφρά κοιλιακή πίεση, S1: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν λίγες σταγόνες σπέρματος μετά από επαναλαμβανόμενες προσπάθειες, S2: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν κάποια ποσότητα σπέρματος μετά από την πρώτη εφαρμογή κοιλιακής πίεσης και S3: όταν τα ψάρια απελευθερώνουν σχεδόν χωρίς πίεση σπέρμα.

Αμέσως μετά τις δειγματοληψίες σπέρματος, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος χρησιμοποιώντας δύο πρωτόκολλα: α) την «κλασική» αξιολόγηση του σπέρματος, όπου περιλάμβανε την εκτίμηση της διάρκειας της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (min), δηλαδή το χρονικό διάστημα που περίπου το 95% εμφάνιζαν πρόσθια κίνηση, του ποσοστού κινητικότητας (%) και του αριθμού των σπερματοζωαρίων μετά από αραιώση x2121 φορές (10⁹ σπερματοζωάρια ml⁻¹). Μετά από την αρχική αξιολόγηση, το σπέρμα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο (4 ° C) και έγινε εκτίμηση του ποσοστού κινητικότητας κάθε δεύτερη ημέρα, μέχρι μόνο το 5% των σπερματοζωαρίων να έχουν ικανότητα κίνησης και την Αυτοματοποιημένη Ανάλυση Σπέρματος (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA), η οποία περιλαμβάνει το ποσοστό κινητικότητας (%), καμπυλόγραμμη ταχύτητα σπερματοζωαρίων (Curvilinear Velocity - VCL - μm s⁻¹) και μέση ταχύτητα διαδρομής (Average Path Velocity - VAP - μm s⁻¹).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

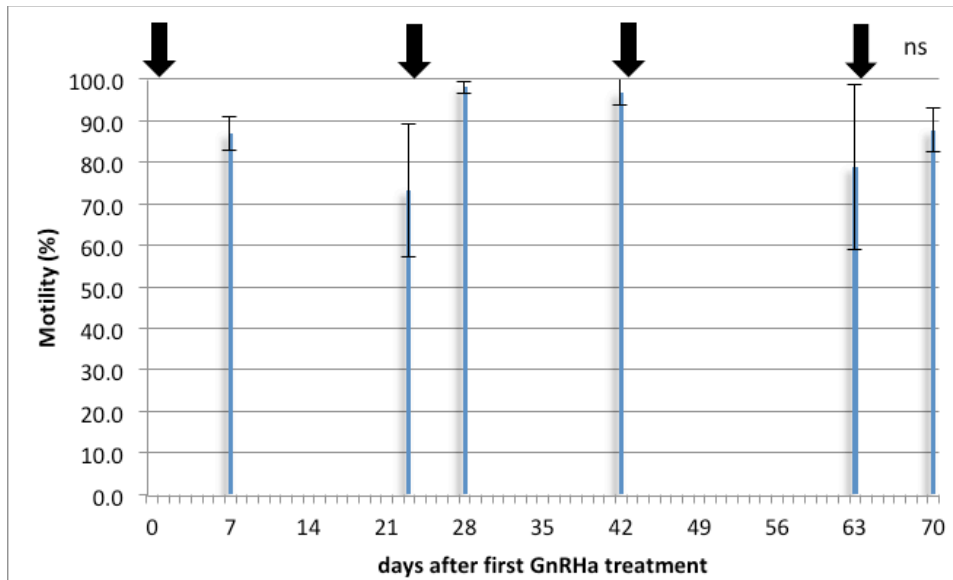
Ο δείκτης σπερμίας αυξήθηκε σημαντικά μετά την πρώτη δειγματοληψία μετά τη χορήγηση της θεραπείας με GnRHα (Εικ.1). Παρέμεινε σταθερός μέχρι και 63 ημέρες μετά την πρώτη θεραπεία, δείχνοντας πτωτική τάση στη συνέχεια.



Εικ.1: Μέση τιμή δείκτη σπερμίας (± SEM) κρανιού (n=8) μετά από θεραπεία με GnRHα (βέλη). Στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα λατινικού αλφαβήτου (a,b) (ANOVA, Tukey's HSD, P≤0.05).

Fig.1: Mean spermiation index (± SEM) of meagre (n=8) after GnRHα treatment (arrows). Statistical significant differences are indicated with lowercase letters (a,b) (ANOVA, Tukey's HSD, P≤0.05).

Το ποσοστό κινητικότητας του σπέρματος σύμφωνα με την «κλασσική» μέθοδο αξιολόγησης ήταν σε επίπεδα >70% για όλη τη διάρκεια του πειράματος χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικ.2). Η διάρκεια κινητικότητας μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος, εμφανίζοντας τις υψηλότερες τιμές σχεδόν πάντα 1 εβδομάδα μετά από τη κάθε εφαρμογή εμφυτεύματος GnRHα. Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων παρέμεινε σταθερός κατά τη διάρκεια του πειράματος, δείχνοντας αυξητικές τάσεις μία βδομάδα μετά από κάθε θεραπεία. Η επιβίωση του σπέρματος στους 4°C δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ το σπέρμα παρέμεινε ενεργό το πολύ για 3 ημέρες.

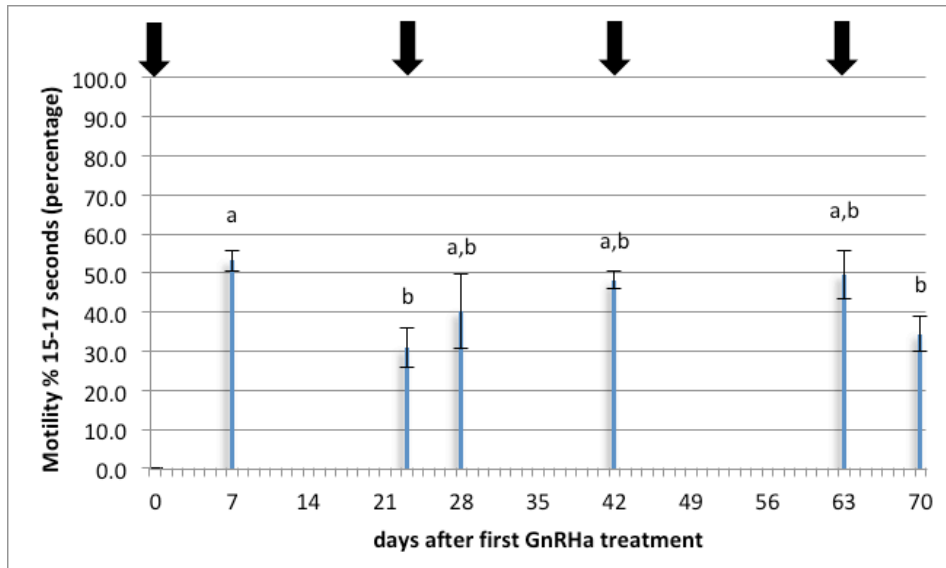


Εικ.2: Μέση τιμή κινητικότητας (%) (± SEM) σπέρματος κρانيού (n=8) μετά από θεραπεία με GnRHα (βέλη). Η αξιολόγηση έγινε με την «κλασσική» μέθοδο. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (ANOVA, Tukey's HSD, $P \leq 0.05$).

Fig.2: Mean motility % (± SEM) of meagre (n=8) after GnRHα treatment (arrows). No statistical significant differences were observed (ANOVA, Tukey's HSD, $P \leq 0.05$).

Το ποσοστό κινητικότητας σύμφωνα με τη μέθοδο CASA κυμάνθηκε σε επίπεδα <60% (Εικ.3). Στην ημέρα 7 το ποσοστό κινητικότητας ήταν αυξημένο σε σχέση με τις ημέρες 21 και 70, εμφανίζοντας ένα πρότυπο αύξησης του ποσοστού κινητικότητας 1 εβδομάδα μετά από κάθε θεραπεία. Η VCL δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών με μέση τιμή $169,6 \pm 8,8 \mu\text{m s}^{-1}$. Η VAP ήταν αυξημένη κατά την ημέρα 7 σε σχέση με την ημέρα 21, χωρίς ωστόσο να διαφοροποιείται σε σχέση με τις υπόλοιπες ημέρες δειγματοληψιών.

Από την σημαντική αύξηση του δείκτη σπερμίας μετά την πρώτη θεραπεία έγινε εμφανές ότι η χορήγηση θεραπείας με GnRHα αυξάνει την ποσότητα του παραγόμενου σπέρματος. Η χορήγηση τεσσάρων συνολικά θεραπειών έδειξε ότι είναι δυνατή η διατήρηση των ίδιων αρσενικών για περίοδο μεγαλύτερη των 2 μηνών σε αναπαραγωγική διαδικασία, παράγοντας σπέρμα υψηλής ποιότητας, ένα συμπέρασμα χρήσιμο για την βιομηχανία ιχθυοκαλλιέργειας. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ποιότητα του σπέρματος σύμφωνα με την «κλασσική» μέθοδο αξιολόγησης, όσον αφορά την κινητικότητα, τον αριθμό των σπερματοζωαρίων και την επιβίωση του σπέρματος. Αντίθετα, παρατηρήθηκαν διαφορές στην διάρκεια κινητικότητας του σπέρματος, δείχνοντας μία τάση αύξησης μία εβδομάδα μετά από κάθε θεραπεία. Επίσης, παρατηρήθηκαν διαφορές στο ποσοστό κινητικότητας με τη χρήση CASA, γεγονός φυσιολογικό αφού η μέθοδος αυτή προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια. Σε αντίστοιχη μελέτη με το ίδιο είδος παρατηρήθηκε μείωση του δείκτη σπερμίας τρεις εβδομάδες μετά από κάθε θεραπεία (Mylonas et al., 2016), ενώ σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στον αριθμό των σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια, χωρίς ωστόσο να μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.



Εικ.3: Μέση τιμή κινητικότητα (%) (± SEM) σπέρματος κρانيού (n=8) μετά από θεραπεία με GnRHα (βέλη). Η αξιολόγηση έγινε με την μέθοδο CASA. Στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με διαφορετικά γράμματα λατινικού αλφαβήτου (a,b) (ANOVA, Tukey's HSD, $P \leq 0.05$).

Fig.3: Mean motility % (± SEM) of meagre (n=8) after GnRHα treatment (arrows) evaluated with CASA. Statistical significant differences are indicated with lowercase letters (a,b) (ANOVA, Tukey's HSD, $P \leq 0.05$).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bobé, J., Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 535-548.
- Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Divanach, P. (2012). Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture International* 20, 91-98.
- Duncan, N.J., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Vallés, R., Mylonas, C.C. (2012). Reproductive development, GnRHα-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1273-1286.
- Mylonas, C.C., Mitrizakis, N., Papadaki, M., Sigelaki, I. (2013). Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. *Aquaculture* 414-415, 309-317.
- Mylonas, C.C., Salone, S., Biglino, T., de Mello, P.H., Fakriadis, I., Sigelaki, I., Duncan, N. (2016). Enhancement of oogenesis/spermatogenesis in meagre *Argyrosomus regius* using a combination of temperature control and GnRHα treatments. *Aquaculture* 464, 323-330.

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα MOUNT, σύμφωνα με την πρόσκληση «Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων».

