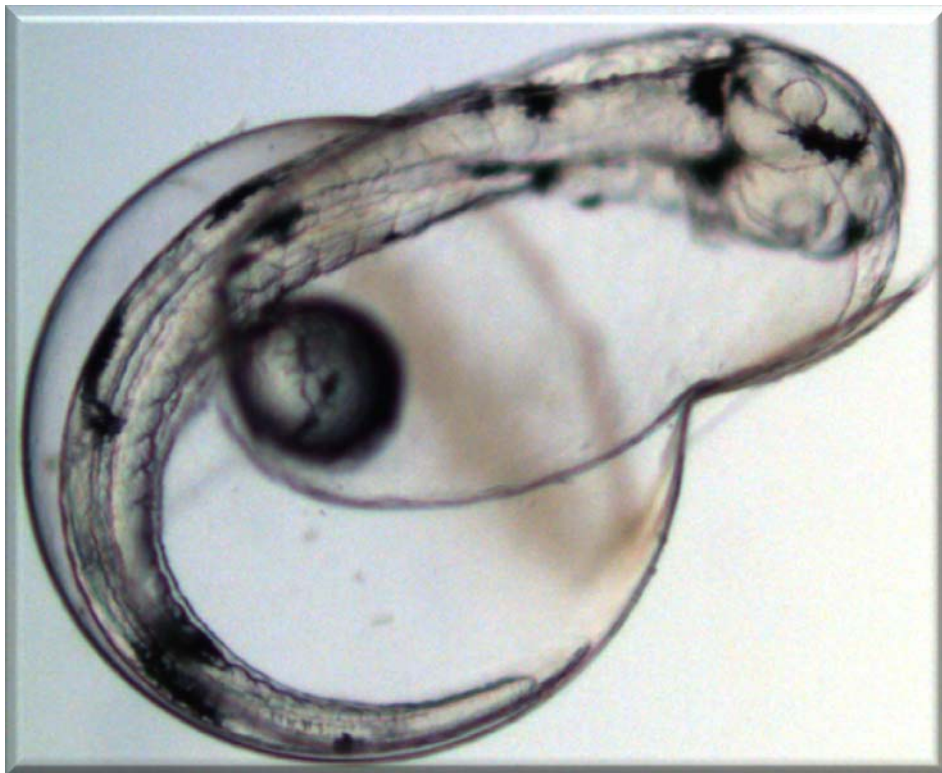


ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ & ΑΛΙΕΥΤΙΚΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Μελέτη της Οντογένεσης στο Κοινό Μυτάκι *Diplodus puntazzo* και  
Επίδραση της Θερμοκρασίας στο  
Εμβρυακό Στάδιο



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ:  
ΖΟΥΛΙΩΤΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ  
ΚΑΛΑΝΖΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ:  
Δρ ΚΛΗΜΟΓΙΑΝΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2010

αφιερώνεται

στους γονείς μας Παναγιώτη & Δήμητρα  
Γιώργο & Αναστασία,  
στα αδέρφια μας Δημήτρη & Βασίλη,  
στην καθηγήτριά μας κα Κλημογιάννη,  
στους φίλους μας,  
στο τμήμα Υδατοκαλλιεργειών και Αλιευτικής διαχείρισης  
Τ.Ε.Ι Μεσολογγίου

Η μελέτη αυτή ξεκίνησε το 2009 όταν η φοίτησή μας στον κλάδο των Ιχθυοκαλλιεργειών ήταν στον τέταρτο έτος. Το επιστημονικό και ερευνητικό ενδιαφέρον για τα πεδία της επαγγελματικής μας απασχόλησης, αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη πραγμάτωσης του αποτελέσματος αυτού. Η επιλογή του αντικειμένου, έγινε με κύριο μέλημα την κάλυψη της επικαιρότητας και του γενικότερου βιολογικού ενδιαφέροντος. Η παρούσα μελέτη σε συνδυασμό με τη μεθοδολογία που είχαμε αποκομίσει κατά τη διάρκεια της φοίτησής μας, μας έδωσαν την δυνατότητα συλλογής βαθύτερης γνώσης της Ιχθυολογίας, των Ιχθυοκαλλιεργειών και της Αλιευτικής έρευνας γενικότερα.

Η πραγματοποίηση της μελέτης δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την καθοδήγηση και την συμπαράσταση της καθηγήτριάς μας Dr. Κλημογιάννη. Την ευχαριστούμε για την εμπιστοσύνη, τη συνεχή επιστημονική και ψυχολογική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Η συνεργασία μαζί της αποτέλεσε για εμάς ένα διαρκές σχολείο ηθικής και ανιδιοτέλειας. Την ευχαριστούμε επίσης για τις παρατηρήσεις της και τη συμβολή της στην τελική διαμόρφωση του κειμένου. Οι εποικοδομητικές επιστημονικές συζητήσεις, οι συμβουλές της στην ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων και η στατιστική επεξεργασία των πρώτων πειραματικών αποτελεσμάτων ήταν ουσιαστική. Την ευχαριστούμε από τα βάθη της καρδιάς μας που μας έδωσε την ευκαιρία να αποκτήσουμε περισσότερες γνώσεις και τον πρώτο πολύτιμο λίθο στα αρχικά βήματα της σταδιοδρομίας μας.

Η αλήθεια είναι ότι κατά τη διάρκεια των σπουδών μας ο κλάδος της Ιχθυοκαλλιέργειας δεν αποτελούσε για μας ελκυστικό επιστημονικό πεδίο, όμως με αυτήν την πειραματική διαδικασία οι απόψεις μας άλλαξαν. Ο ενθουσιώδης τρόπος προσέγγισης του κλάδου, η συνεχής αναζήτηση της επιστημονικής αλήθειας με την ταυτόχρονη μετατροπή της σε παραγωγικούς χειρισμούς, ο αλληπάλληλος προσδιορισμός στόχων και οραματισμών και κυρίως η πεποίθηση ότι, το ενδιαφέρον μπορεί και προάγει την επιστημονική έρευνα ακόμη και μέσα στο χώρο της, συντέλεσαν στην αλλαγή των απόψεων μας. Και αυτό το οφείλουμε στην κα Κλημογιάννη. Την ευχαριστούμε θερμά!

Ευχαριστούμε επίσης και τους συμφοιτητές μας Γ. Πυρένη, Γ. Τράκο για την

συνεργασία στην πραγματοποίηση της μελέτης αυτής.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε το προσωπικό του ιχθυογεννητικού σταθμού της εταιρείας Νηρέα στην κοινότητα Μανάγουλη, Φωκίδας για την προσφορά των αυγών μυτακιού.

Επίσης, τον Dr. Χώτο και τον βοηθό του Msc Βλάχο, καθώς και τον Dr. Βιδάλη, καθηγητές και ερευνητές του Τ.Ε.Ι Μεσολογγίου, στο Τμήμα Υδατοκαλλιεργειών & Αλιευτικής Διαχείρισης, για την ανιδιοτελή προσφορά εργαστηριακού εξοπλισμού. Καθώς και όλους τους καθηγητές τους τμήματος Υδατοκαλλιεργειών & Αλιευτικής διαχείρισης που μας παρείχαν τις γνώσεις κατά τη διάρκεια της φοίτησής μας.

Ευχαριστούμε τις φίλες μας και συμφοιτήτριες μας Μ. Παγουλάτου και Μ. Τραγέλλη που στάθηκαν δίπλα μας σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Στους γονείς μας και στα αδέρφια μας οφείλουμε ένα μεγάλο ευχαριστώ για την συμπαράσταση και κατανόησή τους όλα αυτά τα χρόνια και που ήταν πάντα δίπλα μας, στα εύκολα και στα δύσκολα!



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κύρια προβλήματα εκτροφής θαλάσσιων ιχθύων κατά τα πρώτα αναπτυξιακά τους στάδια	1
1.2 Θερμοκρασία και ιχθυοκαλλιέργειες	8
1.3 Οντογένεση και η σημασία της μελέτης	13
1.4 Μυτάκι ( <i>Diplodus puntazzo</i> , Getti 1777): ένα νέο είδος για την ιχθυοκαλλιέργεια	18
1.5 Αντικείμενο και στόχοι της παρούσας μελέτης	20

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εισαγωγικά στοιχεία	23
2.2 Διαδικασίες και συνθήκες	25
2.2.1 Αποθεματοποίηση πειραματικών δεξαμενών	25
2.3 Παράμετροι που παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν	26
2.3.1 Ποσοστά γονιμοποίησης και εκκόλαψης	29
2.3.2 Χαρακτηριστικά αυγού	29
2.3.3 Αναπτυξιακοί χρόνοι	29
2.3.4 Αναπτυξιακή εξέλιξη	30

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηριστικά αυγού	35
3.2 Εμβρυακή ανάπτυξη στο μυτάκι	37
3.3 Ποσοστά επιβίωση	40

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Οντογένεση	61
4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας	63
4.2.1 Από την έρευνα στην εφαρμογή	66

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ABSTRACT / ΠΕΡΙΛΗΨΗ	73
---------------------	----

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

Ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

Άρθρο στο Journal of Fisheries and Aquatic Science

91

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

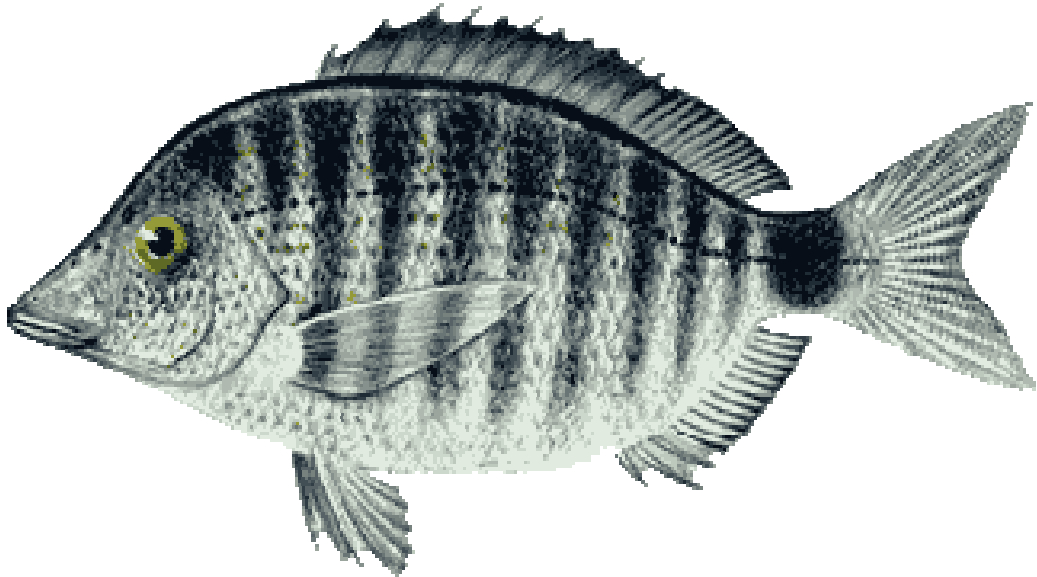
---





## Μυτάκι

*Diplodus puntazzo* (Getti, 1777)



Συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Φύλο: Χορδωτά (Chordata)

Κλάση: Οστειχθύες (Osteichthy)

Υποκλάση: Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

Τάξη: Περκόμορφα (Perciformes)

Οικογένεια: Σπαροειδή (Sparidae)

Γένος: *Diplodus*

Είδος: *Diplodus puntazzo*

Από πρόσφατες αρχαιολογικές ανασκαφές στην Μυτιλήνη, υπάρχουν μαρτυρίες ότι η ύπαρξη των υδατοκαλλιεργειών ξεκίνησε το 333 π.Χ. (ICAP, 1999). Τα τελευταία τριάντα χρόνια, οι υδατοκαλλιέργειες αναπτύσσονται με ετήσιο ρυθμό που υπερβαίνει το 10% κατά μέσο όρο, σε παγκόσμιο επίπεδο. Στον κλάδο δραστηριοποιούνται αφενός εταιρίες καθετοποιημένες, οι οποίες ασχολούνται τόσο με την παραγωγή γόνου, όσο και με την εκτροφή των ψαριών και αφετέρου εταιρίες οι οποίες ασχολούνται μόνο με την εκτροφή ψαριών ή με την παραγωγή γόνου. Οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν για τη χώρα μας, σημαντικό τομέα της πρωτογενούς παραγωγής. Για την οικονομική δραστηριότητα της χώρας μας, η ιχθυοκαλλιέργεια είναι ένας κλάδος σχετικά πρόσφατος. Έκανε την μαζική εμφάνιση της το 1983 και ενώ αρχικώς η ανάπτυξη του κλάδου ήταν αργή, η πρόοδος από το 1993 και μετά ήταν εντυπωσιακή. Σήμερα, η ιχθυοκαλλιέργεια στη χώρα μας σε τσιπούρα και λαβράκι αντιπροσωπεύει το 55% της πανευρωπαϊκής παραγωγής (FAO), ποσοστό αρκετά υψηλό (Πίνακας 1.1).

Τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας, τον χαρακτηρίζουν ως "γαλάζια επανάσταση" καθώς αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο παραγωγής τροφίμων, σε παγκόσμιο επίπεδο. Με συνολική παραγωγή ύψους 52 εκατομμυρίων τόνων το 2006, η υδατοκαλλιέργεια προβάλλει για πολλούς, ως η μόνη λύση για την αναπλήρωση του κενού που δημιουργείται σε ψάρια, λόγω της αύξησης της κατανάλωσης και της υπεραλίευσης. Η υδατοκαλλιέργεια είναι σημαντική γιατί προσφέρει μία εναλλακτική πηγή τροφίμων, από το να επιβαρύνονται και να εξαντλούνται τα αποθέματα της θαλάσσιας αλιείας. Αυτή τη στιγμή έχουμε υπεραλίευση, της τάξης του 88% των αποθεμάτων της ευρωπαϊκής αλιείας. Οι ιχθυοκαλλιέργειες στα θαλάσσια ύδατα είναι ένας τομέας δραστηριοτήτων, ο οποίος αποτελεί κλάδο των υδατοκαλλιεργειών. Οι υδατοκαλλιέργειες αφορούν στην εκτροφή των υδρόβιων ζώων και στη καλλιέργεια των υδρόβιων φυτών. Οι ιχθυοκαλλιέργειες καλύπτουν την εκτροφή των ψαριών σε θαλασσινό, αλμυρό και υφάλμυρο νερό. Οι εντατικές καλλιέργειες ψαριών σε θαλασσινό νερό αφορούν στις δραστηριότητες που ελέγχονται πλήρως απ' τον ανθρώπινο παράγοντα. Οι ιχθυοκαλλιέργειες θαλάσσιων υδάτων είναι ένας δυναμικά αναπτυσσόμενος κλάδος με σημαντικού μεγέθους επενδύσεις και με προοπτικές για περαιτέρω ανάπτυξη. Δεν πρέπει όμως να αγνοούνται τα προβλήματα και οι κίνδυνοι που μπορούν να ανατρέψουν την πορεία του, εφόσον δεν διαγνωστούν και αντιμετωπιστούν έγκαιρα και αποτελεσματικά (ICAP, 1999).

Ιδιαίτερα θετικές διαγράφονται οι προοπτικές για το κλάδο των ιχθυοκαλλιεργειών σύμφωνα με μελέτη του Ιδρύματος Οικονομικών και Βιομηχανικών Ερευνών (ΠΑΣΕΓΕΣ,

2010). Ο κλάδος παραγωγής ειδών ιχθυοκαλλιέργειας συνιστά έναν από τους σημαντικότερους κλάδους της πρωτογενούς παραγωγής στην Ελλάδα και αναμένεται να παρουσιάσει σημαντική βελτίωση μέσα στα επόμενα έτη. Οι προοπτικές του κλάδου ενισχύονται από την αυξανόμενη ζήτηση κυρίως από νεότερες ηλικίες, την απαγόρευση πώλησης μη απεντερωμένων αλιευμάτων σύμφωνα με τους ορισμούς της κοινοτικής νομοθεσίας (εξέλιξη που δημιουργεί εκτεταμένες δυνατότητες ανάπτυξης στον τομέα της μεταποίησης των νωπών αλιευμάτων) και την προσδοκώμενη αύξηση των πωλήσεων λόγω της ανάπτυξης νέων αγορών σε χώρες της Βαλκανικής, της Βόρειας Ευρώπης, της Αμερικανικής ηπείρου και της Ασίας.

**Πίνακας 1.1** Αλιευτική παραγωγή σε τόνους (Επίσημη έκδοση της Ε.Ε. έτους 2008).

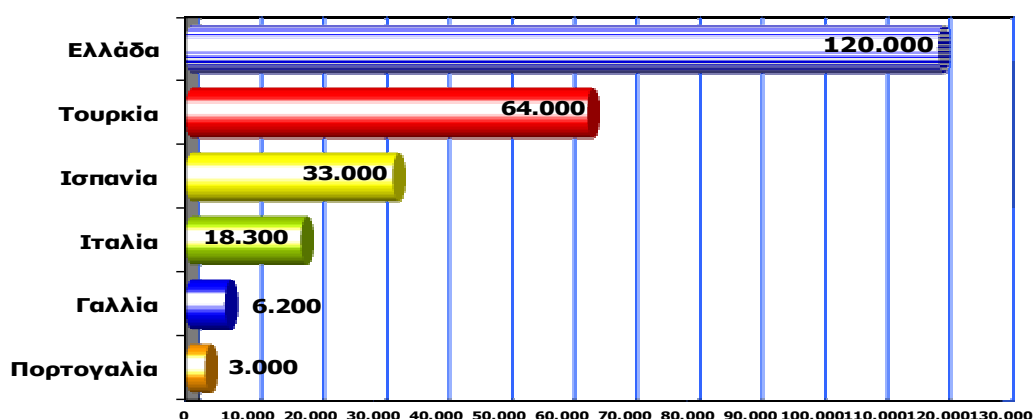
<b>Αλιευτική Παραγωγή στη Μεσόγειο - Μαύρη Θάλασσα</b>			
<b>(ποσότητα: τόνοι)</b>			
<b>Χώρες</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<b>ΕΕ(27)</b>	516089	563.519	532.786
<b>ΕΕ (25)</b>	510665	557.274	524.460
<b>ΕΕ ( 15)</b>	506444	552.895	520.095
<b>Βουλγαρία</b>	3.408	5.630	7.808
<b>Γαλλία</b>	30802	32.294	37.784
<b>Ελλάδα</b>	87.899	92.418	90.345
<b>Ιταλία</b>	279.866	297.427	273.256
<b>Ισπανία</b>	107.779	130.702	119.094
<b>Κύπρος</b>	1850	2.098	2.205
<b>Μάλτα</b>	1336	13.348	1.245
<b>Ρουμανία</b>	2026	615	518
<b>Σλοβενία</b>	1025	933	915
<b>Κροατία</b>	34650	37830	40145
<b>Τουρκία</b>	380.381	488.966	589.129

Σύμφωνα με το IOBE (ΠΑΣΕΓΕΣ, 2010), η εγχώρια κατανάλωση ειδών ιχθυοκαλλιέργειας αυξήθηκε από 59.593,8 τόνους το 2000 στους 83.749,1 τόνους το 2004, σημειώνοντας μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 8,9% και συνολική μεταβολή ίση με 40,5% την περίοδο 2000-2004. Το 2004 δραστηριοποιούνταν στη χώρα μας 1.059 μονάδες υδατοκαλλιέργειας (συμπεριλαμβανομένου των ιχθυογεννητικών σταθμών), εκ των οποίων η συντριπτική πλειοψηφία (930 μονάδες) δραστηριοποιούνται στον τομέα των θαλάσσιων ιχθυοκαλλιεργειών, ενώ οι υπόλοιπες 129 μονάδες δραστηριοποιούνται στις καλλιέργειες ειδών γλυκού νερού (πέστροφα, χέλια, κυπρίνος, σολομός κ.ά.). Το 57,1% των μονάδων βρίσκεται στην Μακεδονία, το 17,5% στη Στερεά Ελλάδα και το 8,9% στην Ήπειρο. Η συνολική παραγωγή ειδών ιχθυοκαλλιέργειας ανήλθε στους 97.066 τόνους το 2004 από 59.927 το 1998, καταγράφοντας μέση ετήσια αύξηση 8,4% και συνολική μεταβολή 62% την περίοδο 1998-2004. Από την άλλη πλευρά, η συνολική αξία της παραγωγής έφτασε σχεδόν τα 302.439 χιλιάδες ευρώ το 2004, αυξανόμενη κατά 3,7% ετησίως.

Η κυριότερη κατηγορία των ειδών υδατοκαλλιέργειας είναι τα ψάρια στην Ελλάδα, τα οποία αποτελούν το 70,3% της συνολικής παραγωγής το 2004, προσεγγίζοντας τους 68.264 τόνους. Οι τσιπούρες και τα λαβράκια συμμετέχουν με μερίδιο υψηλότερο του 92% στη συνολική παραγωγή. Το εμπορικό ισοζύγιο του κλάδου εμφανίζεται έντονα πλεονασματικό για όλα τα έτη της περιόδου 1999-2004. Το πλεόνασμα του εμπορικού ισοζυγίου σε όρους αξίας ενισχύεται με μέσο ρυθμό μεταβολής 6,9% κατά την εξεταζόμενη περίοδο. Ο κυριότερος προορισμός των ελληνικών εξαγωγίμων προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας είναι η Ιταλία, στην οποία καταλήγει το 58,7% της συνολικής αξίας των εξαγωγών και ακολουθεί η Ισπανία με 21,8% και η Γαλλία με 5,8%.

Η παραγωγή ιχθύων στην Ελλάδα σε σχέση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες είναι πολύ ενισχυμένη (**Εικόνα 1.1**). Αντίθετα, η κυριότερη χώρα προέλευσης ειδών ιχθυοκαλλιέργειας, εκτός ΕΕ, είναι η Τουρκία, η οποία καλύπτει το 49,4% του συνόλου των ελληνικών εισαγωγών. Το ένα πέμπτο της ελληνικής κατανάλωσης ειδών ιχθυοκαλλιέργειας προέρχεται από εισαγωγές από την Τουρκία (η συνολική παραγόμενη ποσότητά της το 2004 προσέγγιζε τους 94.010 τόνους). Στη διεθνή αγορά, ο κλάδος υδατοκαλλιέργειας συνέχισε την ανοδική του πορεία σε όρους παραγωγής, καταγράφοντας μέσο ετήσιο ρυθμό μεταβολής 7,2% κατά την περίοδο 1998-2004. Η ασιατική αγορά (χωρίς την Κίνα) αποσπά το μεγαλύτερο μερίδιο της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής προϊόντων υδατοκαλλιέργειας (72,1%) το 2004. Στη δεύτερη θέση βρίσκονται οι ευρωπαίοι παραγωγοί υδατοκαλλιέργειας με 12,4% και ακολουθούν

η αγορά της Αμερικής και της Αφρικής με μερίδια 11,6% και 3% επί της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας αντίστοιχα. Από την ανάλυση του ΙΟΒΕ προέκυψε ότι ο κλάδος των ιχθυοκαλλιεργειών αντιμετωπίζει ορισμένα προβλήματα, τα οποία συνοψίζονται στο θεσμικό πλαίσιο, στην ανεπάρκεια χωροταξικού σχεδιασμού για εγκατάσταση των μονάδων πανελλαδικά, στην έλλειψη ενημέρωσης του καταναλωτή τόσο για τη σπουδαιότητα και την υψηλή θρεπτική και ποιοτική αξία του ψαριού ιχθυοκαλλιέργειας όσο και για περιβαλλοντικά ζητήματα που αφορούν την ιχθυοκαλλιέργεια, αλλά και στον εντεινόμενο ανταγωνισμό των ξένων υπεραγορών, οι οποίες έχουν ήδη αρχίσει να διεισδύουν στην ελληνική αγορά (ΠΑΣΕΓΕΣ, 2010). Είναι λοιπόν ολοφάνερο ότι, με τη ζήτηση των ιχθυηρών να αυξάνεται και την προσφορά από τις φυσικές πηγές να φθίνει, η ιχθυοκαλλιέργεια είναι η μόνη απάντηση για την κάλυψη των παγκοσμίων αναγκών σε ψάρια και άλλα συναφή προϊόντα για τον 21ο αιώνα (Villalon, 2008).



**Εικόνα 1.1** Αλιευτική παραγωγή σε τόνους (Villalon, 2008).

## **1.1 Κύρια προβλήματα εκτροφής θαλάσσιων ιχθύων κατά τα πρώτα αναπτυξιακά τους στάδια**

Η μαζική εκτροφή των ιχθυονυμφών, ιδιαίτερα κάτω από εντατικές συνθήκες καλλιέργειας παραμένει κρίσιμη και δύσκολη, παρά τη μεγάλη πρόοδο που παρουσιάζει ο κλάδος της ιχθυοκαλλιέργειας τα τελευταία χρόνια. Η δυσκολία αυτή των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων έχει επανειλημμένως αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών (Chatain and Ounais Guschemann, 1991 - Osse *et al.*, 1997). Τα σημαντικότερα προβλήματα που σκιάζουν την εκτροφή των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων είναι η θνησιμότητα (Bagarinao, 1986) από τη μία και η εμφάνιση μορφο-ανατομικών ανωμαλιών και γενικότερα η ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (Divanach *et al.*, 1996 - Κουμουνδούρος, 1998) από την άλλη.

### **Θνησιμότητα**

Κατά τη διάρκεια των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων είναι δυνατόν να εκδηλωθεί θνησιμότητα κάτω από την επίδραση πολλών αιτιών. Η μεγαλύτερη θνησιμότητα συνήθως παρατηρείται τις πρώτες 10-15 ημέρες μετά την εκκόλαψη (Bagarinao, 1986), ενώ σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας μπορούν να εμφανιστούν στις περιόδους αντικατάστασης της μιας τροφής από την άλλη και κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης. Οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στα ποσοστά επιβίωσης των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων των ιχθύων διακρίνονται σε βιοτικούς και αβιοτικούς. Αυτοί αφορούν βιολογικούς, διατροφικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τα ποσοστά επιβίωσης είτε έμμεσα με επίδραση στα αποθέματα των γεννητόρων καθορίζοντας την ποιότητα των αυγών, είτε άμεσα με επίδραση στα ίδια τα άτομα κατά την επώαση, εκκόλαψη, λεκιθοφόρο νυμφικό και νυμφικό στάδιο ανάπτυξης των ιχθύων (Κλημογιάννη, 2004).

Η ποιότητα και η ποσότητα της τροφής, επιδρά στην αναπαραγωγή, στην ποιότητα των παραγόμενων αυγών και στην επιβίωση των νυμφών (Watanabe *et al.*, 1984). Όσο αφορά τα ποσοστά για την επιβίωση, οι βιολογικοί παράγοντες είναι αυτοί που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των αυγών και τα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια των νυμφών. Για την ποιότητα των παραγόμενων νυμφών άμεση επίπτωση έχουν η ηλικία των γεννητόρων (Bromage, 1986), ο τύπος της ωοτοκίας (Blaxter, 1981), η προέλευση των γεννητόρων και η ποιότητα των αποθεμάτων τους. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των αυγών με συνέπεια και στην πορεία των παραγόμενων νυμφών είναι η επίδραση της φωτοπεριόδου και της θερμοκρασίας (Davies *et al.*, 1986), ενώ η

αλατότητα (Tandler *et al.*, 1995 – Oltra and Todoli, 2000), η ένταση του φωτός (Tandler and Mason, 1984), ο χρωματισμός των τοιχωμάτων των δεξαμενών (Blaxter, 1981), ο αερισμός (Barahona - Fernades, 1978), η θερμοκρασία (Blaxter, 1981 - Kjorsvik and Lonning, 1983) και τέλος η παρουσία μικροβιακού φορτίου αποτελούν περιβαλλοντικούς παράγοντες καθοριστικούς για την επιβίωση των νυμφών.

Μεγάλης έκτασης θνησιμότητες ακολουθούν επίσης την αναποτελεσματική εφαρμογή τεχνικών καλλιέργειας, όπως στις εξής περιπτώσεις (Κλαδάς, 2006):

- Η αδυναμία σχηματισμού νηκτικής κύστης (7<sup>η</sup> - 10<sup>η</sup> ημέρα στην τσιπούρα και 9<sup>η</sup> - 11<sup>η</sup> στο λαβράκι, ανάλογα με τη θερμοκρασία εκτροφής) από τμήμα του πληθυσμού των νυμφών συνεπάγεται τη δημιουργία ελαττωματικών ατόμων, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη δυσχέρεια στην κολύμβηση. Τα άτομα αυτά έχουν λίγες πιθανότητες επιβίωσης, καθώς δεν αντέχουν στον ανταγωνισμό με τα άλλα άτομα του πληθυσμού. Η θνησιμότητα των νυμφών που δεν κατάφεραν να σχηματίσουν νηκτική κύστη εκδηλώνεται σταδιακά τις επόμενες μέρες.
- Η υπερτροφία της νηκτικής κύστης, η οποία γενικά εκδηλώνεται μετά την 22<sup>η</sup> μέρα και για τα δυο είδη. Οι νύμφες αδυνατούν να κολυπήσουν και επιπλέουν στην επιφάνεια της δεξαμενής. Οι λόγοι εμφάνισης αυτού του φαινομένου δεν έχουν επαρκώς διευκρινιστεί. Συνήθως συνδέεται με καταστάσεις στρες π.χ. εξαιτίας της μεγάλης έντασης φωτισμού ή της απότομης αλλαγής της ποιότητας της τροφής. Η θνησιμότητα εκδηλώνεται λίγες ημέρες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων.
- Το πέρασμα σε διαφορετικού τύπου τροφής από τροχόζωα σε *Artemia* Instar I (A<sub>0</sub>) και από *Artemia* Instar II (A<sub>1</sub>) σε τεχνητή τροφή, προϋποθέτει το πέρασμα του οργανισμού της νύμφης σε μια φυσιολογική κατάσταση που να εγγυάται την καλή λειτουργία της πέψης. Αυτό συμβαίνει όταν τα άτομα του πληθυσμού έχουν αποκτήσει τέτοιο μέγεθος, ώστε η διαφοροποίηση του πεπτικού σωλήνα να ικανοποιεί αυτήν την προϋπόθεση. Αν, λοιπόν, η νύμφη τραφεί με θήραμα ή με τροφή που δεν μπορεί να χωνέψει, ακολουθούν επιπλοκές στο έντερο και τελικά ο θάνατός της. Γι' αυτό το λόγο τα πρωτόκολλα εξέλιξης της διατροφής δεν πρέπει να εφαρμόζονται χωρίς ενδιασμό, αλλά να επαληθεύεται προηγουμένως η αντιστοιχία τους με τα αναπτυξιακά στάδια του ψαριού, πριν αποφασιστεί ο επόμενος τύπος τροφής.

Η φυσιολογική θνησιμότητα στο στάδιο των ιχθυδίων συνήθως δεν υπερβαίνει το 25% ως το τέλος της εκτροφής. Οι σοβαρότερες θνησιμότητες έχουν σχέση με την εκδήλωση βακτηριώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται αρχικά από εκθετική φάση απωλειών με μέγιστες τιμές κατά την 4<sup>η</sup> έως 5<sup>η</sup> ημέρα της εκδήλωσής τους. Τέτοια περίπτωση είναι η εμφάνιση δονακίωσης (*Vibrio* sp.) στα νεαρά λαβράκια. Αντίθετα, προσβολή από μισοβακτήρια και παράσιτα έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση συνήθως μικρού, αλλά σταθερού ρυθμού θνησιμοτήτων, οι οποίες πρέπει να αντιμετωπιστούν με λουτρά σε θεραπευτικές ουσίες. Η υγιεινή των εκτροφών διασφαλίζεται με τον καθημερινό σιφωνισμό των δεξαμενών και γενικώς τη διατήρηση της καθαρότητας του χώρου (Κλαδάς, 2006). Ο κανιβαλισμός είναι επίσης παράγοντας που επιδρά κατά την ανάπτυξη των ιχθυδίων και εμφανίζεται κατά την 40<sup>η</sup>-50<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους. Εμφανίζει μεγάλη αύξηση νεκρών ιχθυδίων με σημάδια κανιβαλισμού (χωρίς μάτια, φαγωμένα μέρη του σώματος).

#### **Ποιότητα παραγόμενων προϊόντων**

Η εμφάνιση μορφο-ανατομικών παραμορφώσεων αποτέλεσε ουσιαστικό πρόβλημα για τη Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια της δεκαετίας του '70 και του '80, τη στιγμή που η έρευνα και η παραγωγή ήταν προσανατολισμένες στην ποσότητα και όχι στην ποιότητα. Η τελευταία δεκαετία χαρακτηρίστηκε από μια εντυπωσιακή πρόοδο ως προς τις μεθόδους εκτροφής, τη διατροφή, τον έλεγχο και την αντιμετώπιση των ασθενειών. Επιλύθηκαν πολλά προβλήματα που σχετίζονται με την παραγόμενη ποσότητα, αλλά ελάχιστα βελτιώνουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Έτσι, οι μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις συνεχίζουν σήμερα να αποτελούν ένα σημαντικό και συχνό πρόβλημα, με υψηλές οικονομικές επιπτώσεις, καθώς υποβαθμίζουν δραστικά την εικόνα του προϊόντος (η εξωτερική μορφολογία τους δεν μοιάζει με αυτή του άγριου γόνου) μειώνοντας την εμπορευσιμότητά τους, αλλά και τις βιολογικές επιδώσεις των εκτρεφόμενων ειδών (χαμηλός ρυθμός αύξησης, επιρρέπεια στην προσβολή ασθενειών) (Κλημογιάννη, 2006).

Οι σκελετικές δυσπλασίες είναι απ' τις σημαντικότερες παραμορφώσεις καθώς έχουν αναφερθεί σε ποικιλία ειδών με υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε ποσοστό που αγγίζει και το 100%. Οι γνωστότερες παραμορφώσεις στα ψάρια αφορούν τις δυσπλασίες της σπονδυλικής στήλης, ιδιαίτερα σε ψάρια τα οποία στερούνται νηκτικής κύστης. Όμως, δυσμορφίες της σπονδυλικής στήλης και άλλων σκελετικών στοιχείων παρουσιάζονται και σε άλλα ψάρια, οφειλόμενες σε διάφορους παράγοντες, όπως στις συνθήκες θερμοκρασίας του περιβάλλοντος κατά τα οντογενετικά τους στάδια, στη χρόνια έλλειψη



ορισμένων θρεπτικών στοιχείων από τη διατροφή τους και στις υδροδυναμικές συνθήκες της δεξαμενής εκτροφής. Σήμερα, οι γνώσεις που υπάρχουν και η συσσωρευμένη εμπειρία της ζωοτεχνίας παραγωγής των ιχθυδίων, μπορούν να εγγυηθούν την ποιότητα του παραγόμενου γόνου στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς (Κλαδάς, 2006). Στον πίνακα 1.3 περιγράφονται οι διάφορες κατηγορίες σκελετικών δυσμορφιών σε γόνους τσιπούρας και λαυρακιού, το μέγεθος (ή η ηλικία) διάγνωσης, οι επιπτώσεις τους στην ανάπτυξη των ψαριών και η αποδεδειγμένη ή πιθανολογούμενη αιτία τους. Οι συχνότεροι τύποι μορφο-ανατομικών παραμορφώσεων είναι: σκελετικές παραμορφώσεις βραγχιακού επικαλύμματος, σιαγώνων, υοειδούς τόξου, ουραίου πτερυγίου, ραχιαίου και εδρικού πτερυγίου, λόρδωση και κύφωση, ενώ συχνή είναι και η εμφάνιση δυσχρωματισμού.

Το δυσμορφικό ψάρι δεν είναι εμπορεύσιμο εξαιτίας της εμφάνισής του που αποτρέπει τον καταναλωτή, της μειωμένης αύξησης και της κακής μετατρεψιμότητας που χαρακτηρίζει την εκτροφή του (εξαιτίας της υποχρεωτικής συνεχούς κίνησής του). Τα δυσμορφικά άτομα πρέπει να διαχωρίζονται από τον πληθυσμό πριν διατεθούν στην αγορά. Στην περίπτωση της μη διογκούμενης νηκτικής κύστης αυτό επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της «επίπλευσης» (γνωστή και ως «έλεγχος επίπλευσης»), κατά την οποία το ψάρι ναρκώνεται σε μια δεξαμενή με νερό υψηλής αλατότητας (πάνω από 55‰), (Κλαδάς, 2006).

Επίσης ένα ακόμα πρόβλημα στην εκτροφή των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων είναι η πυκνότητα, γιατί επιδρά σημαντικά στη συμπεριφορά της διατροφής και στο σύνολο των επιθετικών συμπεριφορών (Χριστοδουλοπούλου, 2009).

**Πίνακας 1.3** Κατάταξη σκελετικών δυσπλασιών ιχθυδίων θαλασσινών ειδών (Κουμουνδούρος *et al.*, 1995).

ΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΕΙΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ (ολικό μήκος σε mm)	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ	ΑΙΤΙΕΣ
Λόρδωση	5,0 - 8,0 (νύμφες 15 περίπου ημερών)	Αλλοιωμένη εξωτερική εμφάνιση  Μειωμένος ρυθμός αύξησης  Αυξημένη θνησιμότητα κατά την "αποκοπή"	Μη λειτουργική δευτερογενής νηκτική κύστη
"Κοντό" ή κεκαμένο βραγχιακό επικάλυμμα	12,0 - 13,0	Αλλοιωμένη εξωτερική εμφάνιση  Μειωμένοι ρυθμοί αύξησης  Αυξημένη θνησιμότητα κατά την αποκοπή	Πιθανή έλλειψη βιταμίνης C
Στένωση, κάμψη ή διπλή ανάπτυξη του ουραίου πτερυγίου.	6,0 - 7,5	Αλλοιωμένη εξωτερική εμφάνιση  Δευτερογενής λόρδωση, σκολίωση	Άγνωστες
Σύντηξη σπονδύλων	13,0 - 15,0	Αλλοιωμένη εξωτερική εμφάνιση	Έλλειψη βιταμίνης C?
"Αιματική" κάμψη σπονδυλικής στήλης	Ιχθύδια (μεγαλύτερα των 40 ημερών)	Αλλοιωμένη εξωτερική εμφάνιση και μειωμένοι ρυθμοί αύξησης στο λαυράκι εάν η γωνία εκτροπής είναι >35°. Μειωμένοι ρυθμοί αύξησης στην τσιπούρα.	Έντονες υδροδυναμικές συνθήκες κατά την αποκοπή
Προγναθισμός, Crossbite	15,0	Αλλοιωμένη εξωτερική εμφάνιση  Μειωμένος ρυθμός αύξησης	Άγνωστες
Απουσία ραχιαίου ή κοιλιακού πτερυγίου	10,0 - 15,0	Αλλοιωμένη εξωτερική εμφάνιση	Άγνωστες

## 1.2 Θερμοκρασία και ιχθυοκαλλιέργειες

Η επιτυχία της εκτροφής οποιουδήποτε υδρόβιου οργανισμού εξαρτάται σε ένα μεγάλο βαθμό από την κατανόηση των ειδικών απαιτήσεων του οργανισμού ως προς το περιβάλλον εκτροφής. Έτσι, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός γνώσης της σχέσης μεταξύ του οργανισμού με το περιβάλλον εκτροφής, τόσο περισσότερες εμφανίζονται και οι προοπτικές αύξησης της παραγωγικότητας.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην οντογένεση των ιχθύων έχει μελετηθεί εκτενέστατα. Προς την κατεύθυνση αυτή θεωρήθηκε ότι, χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά την οντογενετική ανάπτυξη (επώαση, προνυμφική ανάπτυξη) που πλησιάζουν περισσότερο στις θερμοκρασίες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας στη φύση, έχουν θετική επίδραση στις επιδόσεις των νυμφικών καλλιεργειών, επειδή εμποδίζουν τις βακτηριακές πληθυσμιακές εκρήξεις στα πρώτα στάδια της ζωής των νυμφών. Πολλοί επιστήμονες ακόμα και σήμερα συνεχίζουν να ασχολούνται με την επίδραση της θερμοκρασίας τόσο στο μεταβολικό ρυθμό όσο και στη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων.

Πρώτος ο Asptein (1909), εισήγαγε τον όρο βαθμο-ημέρες ( $\text{day-degrees} = D^\circ$ ) στην προσπάθειά του να αποδώσει τη χρονική διάρκεια ενός δεδομένου αναπτυξιακού σταδίου σε σχέση με τη θερμοκρασία, αφού διαπίστωσε ότι αυτή η έκφραση του χρόνου παρέμενε σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας. Ακολούθησαν και άλλες μελέτες που πιστοποίησαν τα παραπάνω (Penaz *et al.*, 1983). Βαθμο-ημέρες μίας νύμφης είναι το σύνολο του αθροίσματος των μέσων τιμών των ημερήσιων θερμοκρασιών της μέχρι τότε ζωής της. Το εργαλείο αυτό χρησιμοποιείται για τη συγκριτική παρουσίαση των διαφορετικών πρωτοκόλλων εκτροφής. Ο όρος βαθμο-ημέρες πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή και να αναφέρεται σε μικρές ηλικιακές διαφορές, καθώς η σχέση της ηλικίας με το ρυθμό ανάπτυξης, όπως συνήθως συμβαίνει σε όλα τα βιολογικά φαινόμενα, δεν είναι γραμμική.

Η αύξηση του μεταβολικού ρυθμού με την αύξηση της θερμοκρασίας περιγράφηκε καλύτερα από τον συντελεστή van't Hoff  $Q_{10}$  (ο βασικός μεταβολισμός μπορεί να διπλασιαστεί για κάθε αύξηση της θερμοκρασίας κατά  $10^\circ\text{C}$ ) με ευρεία χρήση (Marangos *et al.*, 1986 - Temming *et al.*, 2002). Υπολογισμός του «βιολογικού μηδέν» (biological zero), η χαμηλότερη θερμοκρασία κάτω από την οποία σταματάει η ανάπτυξη) μελετήθηκε εκτενέστατα (Smith and Chernoff, 1981) και συνεχίζει να έχει άμεσο επιστημονικό ενδιαφέρον για κάθε είδος ψαριού. Συνοπτικά η θερμοκρασία έχει βρεθεί ότι επιδρά στα εξής:

## **Ποιότητα αυγού**

Η θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας και της επώασης των αυγών, αποτελεί ίσως τη πιο σημαντική φυσικοχημική παράμετρο του νερού που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα των αυγών. Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τον μεταβολισμό, τη λειτουργία και τη κατασκευή του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Kinne and Kinne, 1961). Γενικότερα, βάση εκτεταμένων εργαστηριακών ερευνών έχει βρεθεί ότι το μέγιστο και το ελάχιστο όριο της θερμοκρασίας για τα έμβρυα των ψαριών, πριν αυτό γίνει θανατηφόρο, αλλάζει ανάμεσα στα είδη (Rombough, 1996). Παρόλα αυτά όμως, οι απόλυτες αλλαγές θερμοκρασίας που μπορεί να αντέξει ένα αυγό είναι  $\pm 6^{\circ}\text{C}$ .

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα θαλάσσια είδη ψαριών φαίνεται ότι ωοτοκούν σε ένα εύρος θερμοκρασιών που καθορίζεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μπορούμε να αποκτήσουμε τον υψηλότερο αριθμό συνολικών βιώσιμων γόνων. Αυγά τα οποία αναπτύσσονται πέρα από το ανώτερο όριο του βέλτιστου εύρους θερμοκρασιών τους, μπορούν να είναι γόνιμα αλλά παρόλο αυτά έχουν την τάση να αναπτύξουν ανωμαλίες (Kraak and Paunkhurst, 1996) εξαιτίας των ζημιών που προκαλούνται σε βασικά ένζυμα του μεταβολισμού (Laurence and Rogers, 1976).

Τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια των εμβρύων έχουν διαφορετικές θερμοκρασιακές απαιτήσεις (Kinne and Kinne, 1961). Στα περισσότερα είδη που έχουν μελετηθεί, εμφανίζεται να υπάρχει μια περίοδος χαμηλής θερμοκρασιακής σταθερότητας κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων ανάπτυξης (γονιμοποίηση μέχρι γαστριδίωση), η οποία ακολουθείται από μια φάση αυξανόμενης σταθερότητας και αργότερα, λίγο πριν το τέλος της εμβρυακής ανάπτυξης εμφανίζεται πάλι μία περίοδος χαμηλής σταθερότητας (Bailey and Evans, 1971).

Ο Dannevig (1985) ήταν ο πρώτος που απέδειξε και πειραματικά ότι η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση στο χρόνο ανάπτυξης του αυγού. Τα έμβρυα των ψαριών γενικότερα θεωρούνται πολύ ευαίσθητα στις αλλαγές της θερμοκρασίας κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια των αυλακώσεων (Thompson and Riley, 1981) και της γαστριδίωσης (Rombough, 1996). Οι ρυθμοί θνησιμότητας σε υψηλότερες θερμοκρασίες, μειώνονται όταν τα αυγά εκθέτονται σε αυτές κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης (Iversen and Danielssen, 1984).

## **Ανάπτυξη ή διαφοροποίηση**

Όλοι οι οργανισμοί έχουν θανατηφόρα όρια στη θερμοκρασία (Hokanson, 1977) και όμως μέσα σε αυτήν έχουν και βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη της δομής και της λειτουργίας τους. Η αλλαγή στη θερμοκρασία θα επηρεάσει το μεταβολισμό

(Rombough, 1997) και επομένως σχετικές φυσιολογικές διαδικασίες, οι οποίες έχουν επιπτώσεις στην αύξηση (Nicieza and Metcalfe, 1997), την εξέλιξη (Koumoundouros *et al.*, 2001), και την απόδοση στις φυσιολογικές και συμπεριφοριστικές ικανότητες (Fuiman and Higgs, 1997). Εντούτοις, η θερμοκρασία επηρεάζει την πρόωρη ανάπτυξη, όπως τη νυμφική φάση και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην αλλαγή θερμοκρασίας (Rombough, 1997).

Ορισμένες επιστημονικές εργασίες έχουν αποδείξει ότι, η θερμοκρασία της νυμφικής καλλιέργειας έχει επίδραση στη διαμόρφωση ορισμένων χαρακτηριστικών π.χ. αριθμός σειρών λεπιών, αριθμός και διαφοροποίηση μυϊκών ινών (Galloway *et al.*, 1999) και γενικότερα το σχήμα του σώματος (Boglione *et al.*, 2001) χωρίς αυτοί οι παράγοντες να είναι περιοριστικοί στην παραπέρα ανάπτυξη και αύξηση του οργανισμού. Η θερμοκρασία επίσης επηρεάζει τους χρόνους στους οποίους πραγματοποιούνται τα αναπτυξιακά γεγονότα (Kucharczyk *et al.*, 1997).

Η θερμοκρασία αποτελεί τελικά ίσως τον πιο κρίσιμο παράγοντα στην αναπτυξιακή πορεία των ψαριών. Σχετίζεται άμεσα με την εκκόλαψη των αβγών των ψαριών, την αύξηση, τη διαφοροποίηση, τη μορφολογία, την κολυμβητική ικανότητα και φυσικά τη θνησιμότητα ενός ατόμου (Fuiman and Werner 2002). Οι Fuiman *et al.* (1998) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο ρυθμός ανάπτυξης επιταχύνεται περισσότερο από το ρυθμό αύξησης, οδηγώντας σε διαφορετικά μεγέθη ιχθυονυμφών σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Οι Koumoundouros *et al.* (2001) μελετώντας την οντογενετική πλαστικότητα στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) κατέληξαν επίσης στο συμπέρασμα ότι η ολοκλήρωση συγκεκριμένων οντογενετικών γεγονότων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, βρήκαν ότι στην υψηλότερη θερμοκρασία που εξετάστηκε, τα διάφορα οντογενετικά γεγονότα ολοκληρώνονταν σε μικρότερο μήκος. Ωστόσο, υπάρχουν και αντίθετες περιπτώσεις, όπως αυτή του *Platichthys stellatus* (Policansky 1982) στο οποίο η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του μήκους μεταμόρφωσης.

## **Αύξηση**

Τα ψάρια στις βέλτιστες θερμοκρασίες παρουσιάζουν ικανοποιητική αύξηση και επιβίωση (Gadomski and Caddell, 1991). Η θερμοκρασία μπορεί να αλλάξει ανάλογα με την ηλικία και το μέγεθος, δεδομένου ότι τα νεαρά άτομα πολλών ειδών προτιμούν τις υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι τα ενήλικα άτομα (Pedersen and Jobling, 1989), ενώ τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια παρουσιάζουν καλύτερη αύξηση και επιβίωση σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Imsland *et al.*, 1996).

Οι Fuiman *et al.* (1998) έδειξαν ότι η θερμοκρασία επιδρά περισσότερο στο ρυθμό ανάπτυξης παρά στο ρυθμό αύξησης οδηγώντας έτσι σε διαφορετικά μεγέθη σώματος σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Επομένως, το ολικό μήκος του σώματος στο οποίο πραγματοποιούνται τα διάφορα οντογενετικά γεγονότα όπως η εκκόλαψη, τα νυμφικά στάδια, η μεταμόρφωση επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία (Chambers and Laggett, 1987).

Ανάλογα λοιπόν με την εξέλιξη των περιβαλλοντικών συνθηκών, κυρίως της θερμοκρασίας, έχουμε αυξημένους ή μειωμένους ρυθμούς αύξησης (Rombough, 1996) των διαδοχικών παρτίδων ιχθυδίων του κάθε είδους.

### **Μεταβολικός ρυθμός**

Η οντογένεση είναι η ανάπτυξη και αύξηση ενός οργανισμού, και εξαρτάται από το συγχρονισμό των αναπτυξιακών διαδικασιών (Kovas, 2002). Η θερμοκρασία ιδιαίτερα, προκαλεί την αλλαγή στα ποσοστά ανάπτυξης ψαριών στο εμβρυακό (Heath *et al.*, 1993), νυμφικό (Hunt von Herbing *et al.*, 1996) και νεαρά στάδια (Benoit and Pepin, 1999). Μια μείωση στο ποσοστό οντογένεσης που προκαλείται από μια αλλαγή στη θερμοκρασία οδηγεί σε μια πιο μακροχρόνια νυμφική διάρκεια και αυξάνει τον κίνδυνο στο νυμφικό περιβάλλον (Atkinson, 1996). Επιπλέον, μέσω των ποικίλων ποσοστών ανάπτυξης, η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει το μέγεθος του οργανισμού στον οποίο οι οντογενετικοί μετασχηματισμοί εμφανίζονται.

Οι μελέτες της επίδρασης της θερμοκρασίας τόσο στους μηχανισμούς (Guinea and Fernandez, 1997), όσο και στο ρυθμό του μεταβολισμού αποτέλεσαν αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών ενώ η προσπάθεια για επιπλέον κατανόηση της σχέσης αυτής συνεχίζεται ανοίγοντας νέους δρόμους για τη μελέτη της φυσιολογίας των ιχθύων (Κλημογιάννη, 2004).

### **Ρυθμός κατανάλωσης θρεπτικών**

Τόσο κατά τη διάρκεια της ενδογενούς θρέψης, όσο κατά την ετερότροφη φάση της ζωής των ιχθύων, ο ρυθμός απορρόφησης των λεκιθικών αποθεμάτων και ο ρυθμός πρόσληψης και κατανάλωσης της εξωγενούς τροφής αντιστοίχως, έχει βρεθεί ότι επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία (Κλημογιάννη, 2004). Συγκεκριμένα, ο ρυθμός απορρόφησης των λεκιθικών αποθεμάτων κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο, εμφανίζει αναλογική σχέση με τη θερμοκρασία, έχοντας όμως ένα βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος (Overnell, 1997). Ίδια αναλογική σχέση εμφανίζει και ο

ρυθμός κατανάλωσης τροφής κατά τα ετερότροφα αναπτυξιακά στάδια πάντα σε σχέση με τη θερμοκρασία (Silva and Orellana, 2001).

### **Μορφο-ανατομικές ανωμαλίες**

Η θερμοκρασία ανήκει στους αβιοτικούς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση μορφο-ανατομικών παραμορφώσεων. Πολλοί είναι οι ερευνητές που έχουν πειραματιστεί με την επίδραση της θερμοκρασίας στην εμφάνιση ανωμαλιών του σκελετού και στο γενικότερο σχήμα και χρωματισμό των ιχθύων (Venizelos and Benetti, 1999).

Επίσης υπάρχουν ανωμαλίες στην εκκόλαψη όταν το ποσοστό θερμοκρασίας είναι πάνω από 16-22°C. Οι συνηθέστερες παραμορφώσεις είναι οι εξής: ζαρωμένη πτερυγιοπτυχή, σκελετικές παραμορφώσεις (σπόνδυλοι και παραμορφωμένος σιαγόνας), νωτιαία κυρτότητα και μια μεγάλη περικαρδιακή κοιλότητα (Polo *et al.*, 1991). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι παραμορφώσεις αυτές σχετίζονται κυρίως με τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (Bertolini *et al.*, 1991).

### **Θνησιμότητα**

Η επιβίωση των ιχθύων, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα αναπτυξιακά τους στάδια, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και κυρίως τη θερμοκρασία. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, ο εν λόγω παράγοντας επηρεάζει τη θνησιμότητα είτε έμμεσα επιδρώντας κατά τη διάρκεια της ωογένεσης ελέγχοντας την ποιότητα των αυγών (Migaud *et al.*, 2001), είτε άμεσα επιδρώντας στα ίδια τα άτομα κατά τη διάρκεια της εκτροφής τους (Watanabe *et al.*, 1995 – Klimogianni *et al.*, 2004).

Είναι ευρύτερα αποδεκτό ότι το μεγαλύτερο μέγεθος των νυμφών, το οποίο ευνοείται από τις χαμηλότερες θερμοκρασίες και εμφανίζει χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (Kato and Kamler, 1983).

### **Συμπεριφορά**

Ο παράγων θερμοκρασία διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο σε κάθε είδους δραστηριότητες των ζωικών οργανισμών και κατ' επέκταση των ψαριών. Τα θερμικά ερεθίσματα γίνονται αντιληπτά από τα ψάρια με την αλλαγή της έντασής τους. Έχει βρεθεί ότι η θερμοκρασία είναι ένα από τα ερεθίσματα που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της ηθολογίας του ψαριού. Είναι γνωστή η μετανάστευση των ψαριών πριν από την αναπαραγωγική τους περίοδο και η θερμοκρασία εμφανίζεται ως ένας από τους ρυθμιστικούς παράγοντες (Harden, 1968).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ταχύτητα και τη κολυμβητική συμπεριφορά (Lagardere *et al.*, 1995, Koumoundouros *et al.*, 2002). Μεταξύ των αβιοτικών παραγόντων που επηρεάζουν την εμφάνιση της επιθετικότητας, είναι η θερμοκρασία και η πληρότητα του στομάχου του ζώου. Ο ρόλος της πληρότητας του στομάχου έχει αποδειχθεί μόνο για την ανάπτυξη του κανιβαλισμού. Επομένως η άνοδος της θερμοκρασίας σε πολλά είδη εμφανίζει συμπεριφορά επιθετικότητας (Kestemont *et al.* 2003).

### **Γενική φυσιολογία**

Από όλους τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τους υδρόβιους οργανισμούς, η θερμοκρασία είναι η πιο κυρίαρχη. Μια περιβαλλοντική θερμοκρασία μπορεί πάντα να επηρεάσει τα αποτελέσματα αυτής. Τα ψάρια είναι ποικιλόθερμα, δηλαδή είναι σε θέση να ασκήσουν την ελάχιστη σημαντική επιρροή στη διατήρηση μιας ορισμένης θερμοκρασίας σωμάτων με τα εξειδικευμένα μεταβολικά ή συμπεριφοριστικά μέσα. Η θερμοκρασία σωμάτων τους κυμαίνεται έτσι σχεδόν σε συντονισμό με τη θερμοκρασία του υδρόβιου μέσου τους (Bartholow, 1976). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη διαφοροποίηση των γονάδων στα γονοχωριστικά είδη ψαριών (Devlin and Nagahama, 2002).

Επίσης έχει βρεθεί ότι ο καθορισμός του φύλου στο λαβράκι είναι ισχυρά θερμοεξαρτώμενος, με τα αρσενικά άτομα να ευνοούνται στις υψηλές θερμοκρασίες και τα θηλυκά στις χαμηλές (Pavlidis *et al.*, 2000), ενώ το κρίσιμο στάδιο του καθορισμού του φύλου φάνηκε να είναι η αρχική περίοδος της ζωής του λαβρακιού μέχρι τη μεταμόρφωση (Koumoundouros *et al.*, 2002).

### **1.3 Οντογένεση και η σημασία της μελέτης**

Η αναπτυξιακή πορεία ενός οργανισμού από γονιμοποιημένο ωάριο μέχρι και το θάνατό του είναι γνωστή ως οντογένεση (ontogeny). Με τον όρο αυτό περιγράφεται τόσο η αύξηση (growth, αλλαγή του μεγέθους με την ηλικία) όσο και η ανάπτυξη (development, διαφοροποίηση και ωρίμανση των κυττάρων, ιστών, οργάνων και συστημάτων). Ο ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιείται η διαφοροποίηση και η αλλαγή του μεγέθους στα ψάρια ποικίλει όχι μόνο από είδος σε είδος αλλά και μέσα στο ίδιο είδος ανάλογα με την ηλικία του. Μεγάλες έως και δραματικές αλλαγές στο μέγεθος, το σχήμα, στις δομές και τη φυσιολογία σημειώνονται κυρίως κατά τη διάρκεια των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων των ψαριών, έως και τη μεταμόρφωση (Kendall *et al.*, 1984).



Καθώς το σώμα ενός οργανισμού μεταβάλλεται στο χρόνο αλλάζει και το σχήμα του. Η αλλαγή αυτή οφείλεται στο ότι τα διάφορα τμήματα του σώματος αυξάνονται με διαφορετικό σχετικό ρυθμό, διαδικασία η οποία αποδίδεται με τον όρο αλλομετρία (van Snik *et al.*, 1997). Κατά τη διάρκεια της οντογένεσης και σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο κύριο μέλημα είναι η εξασφάλιση της λειτουργικότητας. Έτσι κατά τη πορεία των αναπτυξιακών σταδίων συνεχώς κατασκευάζονται και προετοιμάζονται δομές με λειτουργική υπόσταση (Thorpe, 1987). Η αλλομετρία αντικατοπτρίζει την στενή σύνδεση της μορφολογίας με τη λειτουργία (Helfman *et al.*, 1999).

Κατά τη διάρκεια της ζωής τους τα ψάρια έρχονται αντιμέτωπα με ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον τόσο ως προς τους αβιοτικούς όσο και ως προς τους βιοτικούς παράγοντες. Στις μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος τα ψάρια απαντούν με προσαρμογές συγκεκριμένων χαρακτήρων (φαινοτυπική πλαστικότητα) με σκοπό τη διαφύλαξη ζωτικών δραστηριοτήτων τους, ενώ ταυτοχρόνως κρατούν την ποικιλομορφία τους σε χαμηλά επίπεδα (αναπτυξιακή σταθερότητα) (Debat and David, 2001). Έτσι η φαινοτυπική πλαστικότητα των ψαριών εξυπηρετεί τη διατήρηση της λειτουργικότητας των δομών υπό την πίεση περιβαλλοντικών μεταβολών.

Είναι κοινά αποδεκτό ότι η μεθοδολογία συλλογής και συντήρησης των δειγμάτων άγριου πληθυσμού αλλοιώνει την εμφάνιση των ατόμων (Lockwood and Dally, 1975). Από την άλλη, η ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ψαριών επηρεάζεται κατά ένα μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Beccaria *et al.*, 1991), δημιουργώντας έτσι μορφολογικές διαφορές μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ατόμων (Matsuoka, 1987 – Boglione *et al.*, 2001). Γενικά, όποια και να είναι η προέλευση των δειγμάτων, η μελέτη της οντογενετικής πορείας αποκτά κύρος όταν οι συνθήκες εκτροφής είναι σταθερές στο χρόνο και κατά τέτοιο τρόπο ελεγχόμενες ώστε να επιτρέπουν ομαλή διεξαγωγή της πορείας ανάπτυξης και αύξησης του οργανισμού.

Η μελέτη της οντογένεσης κάθε είδους ψαριού έχει μεγάλη σημασία προσφέροντας σημαντικές γνώσεις που προάγουν τόσο την αλιεία όσο και την ιχθυοκαλλιέργεια (Κλημογιάννη, 2004).

Με την αναλυτική περιγραφή της ανάπτυξης παρέχεται η δυνατότητα εντοπισμού των κρίσιμων αναπτυξιακών σταδίων, γεγονός το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο επιλογής του τύπου των χειρισμών εκτροφής ανά περίπτωση (Blaxter, 1981).

Από την άλλη, ο εντοπισμός του σχηματισμού ενός χαρακτήρα μπορεί να αποβεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον αναπτυξιακό προσδιορισμό μιας μορφο-ανατομικής ανωμαλίας με επίκτητο χαρακτήρα, μιας και έχει βρεθεί στενή σχέση μεταξύ διατροφής και κολυμβητικής συνήθειας. Τέλος, η σύγκριση της οντογένεσης ενός νέου είδους για

την ιχθυοκαλλιέργεια, με την οντογένεση παραδοσιακών εκτρεφόμενων ειδών μπορεί να δώσει χρήσιμα συμπεράσματα για τον προσδιορισμό της μεθοδολογίας εκτροφής (Κλημογιάννη, 2004).

#### **1.4 Μυτάκι (*Diplodus puntazzo*, Getti 1777): ένα νέο είδος για την ιχθυοκαλλιέργεια**

Η ευρωπαϊκή και μεσογειακή καλλιέργεια θαλασσίων ψαριών εξουσιάζεται γενικά από δύο είδη: λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και τσιπούρα (*Sparus aurata*). Αυτή η κατάσταση απαιτεί τον προσδιορισμό υποψήφιων νέων ειδών που θα δώσουν υπόσχεση για αύξηση της παραγωγής σε αυτές τις περιοχές. Μεταξύ των νέων πιθανών ειδών είναι το μυτάκι (*Diplodus puntazzo*) που έχει γίνει ένας από τους ελκυστικότερους υποψηφίους για τη διαφοροποίηση της ιχθυοκαλλιέργειας (Boglione *et al.*, 2003).

Η εκτροφή κάθε νέου είδους μπορεί να καλύψει κενά στις ποσότητες της αλιευτικής παραγωγής, ενώ ταυτόχρονα υπερπηδά το πρόβλημα της εποχιακής διαθεσιμότητας των ειδών. Η ανάπτυξη της εκτροφής ενός είδους ψαριού είναι εξαιρετικά δύσκολη υπόθεση ενώ η επίτευξή της προϋποθέτει πρώτα από όλα συστηματική γνώση της βιολογίας του είδους. Η κατάκτηση της παραπάνω γνώσης μεταφράζεται στη συνέχεια σε κατάλληλους ανά περίπτωση χειρισμούς. Η γραμμική σχέση αυτών των παραγόντων θέτει ισχυρές βάσεις βιώσιμης παραγωγής ενός νέου είδους.

Το μυτάκι (*Diplodus puntazzo*) έχει μεγάλη εμπορική αξία που είναι ανταγωνιστικότερη από τα άλλα είδη (Abellan and Basurco, 1999 - Favaloro *et al.*, 2002). Παρά την επιτυχή εκτροφή των αρχικών σταδίων ζωής αυτού του είδους, οι υψηλοί δείκτες θνησιμότητας φτάνουν μέχρι 80% ενώ στην ανάπτυξη των εγκαταστάσεων έχουν βιωθεί πρόσφατα καταστρεπτικές οικονομικές συνέπειες. Υπάρχουν λίγες δημοσιευμένες πληροφορίες σχετικά με την παθολογία και τις θρεπτικές απαιτήσεις αυτού του είδους, είτε στο φυσικό περιβάλλον είτε στα εντατικά συστήματα εκτροφής (Athanasopoulou *et al.*, 1999).

Στα πλαίσια της διαφοροποίησης, το μυτάκι καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά σε πειραματική βάση στη Κύπρο το 1988. Αυτά τα πειράματα άρχισαν με τη συλλογή άγριου γόνου. Η ωοτοκία και η νυμφική εκτροφή του μυτακιού ρυθμίστηκαν επιτυχώς στο πειραματικό σταθμός υδατοκαλλιέργειας του τμήματος αλιείας από τους Stephanou και Georgiou (1991). Τα αποτελέσματα ανάπτυξης αυτού του είδους ήταν ενθαρρυντικά. Η νυμφική εκτροφή δεν παρουσίασε σημαντικές δυσκολίες, έτσι η δυνατότητα αγοράς ήταν ελπιδοφόρα παίζοντας αποφασιστικό ρόλο στη γρήγορη υιοθέτηση μονάδων καλλιέργειας για νέα εμπορεύσιμα είδη.

Ταξινομικά ανήκει στην οικογένεια των *Sparidae* (Osteichyes), πολλά μέλη της οποίας έχουν αποτελέσει αντικείμενο της θαλάσσιας Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας (όπως το λυθρίνι *Pagellus erythrinus*, το φαγκρί *Pagrus pagrus*, ο σαργός *Diplodus sargus*, η συναγρίδα *Dentex dentex*). Το γένος *Diplodus* εκτός του *Diplodus puntazzo* περιλαμβάνει και άλλα είδη όπως, *Diplodus annularis*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus argenteus*, *Diplodus ascensionis*, *Diplodus bellottii*, *Diplodus bermudensis*, *Diplodus carpensis*, *Diplodus cervinus*, με τα τρία πρώτα να αποτελούν τα πιο διαδεδομένα στη Μεσόγειο.

Οι απαιτήσεις των ειδών του γένους *Diplodus* όσο αφορά στο μικροπεριβάλλον τους έχουν περιγραφεί αναλυτικά από τον Macpherson (1998). Συγκεκριμένα, το μυτάκι απαντάται σε περιοχές με διάφορα υποστρώματα (τραγάνα, αμμώδες, πετρώδες, λιβάδια με ποσειδωνία) και κατοικεί σε βάθη μέχρι 150m, τρέφεται με φυτικά είδη καθώς και με σκουλήκια, μαλάκια και γαρίδες. Το μυτάκι αναπαράγεται κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου. Το εμβρυϊκό και νυμφικό στάδιο περνά στο πλαγκτονικό περιβάλλον, ενώ κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης τα άτομα μεταναστεύουν στην παράκτια βενθοπελαγική ζώνη, δημιουργώντας ομάδες με κυμαινόμενη πυκνότητα. Μετά την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης, τα άτομα μεταναστεύουν από την παράκτια ζώνη σε βαθύτερες περιοχές, όπου και ζουν μεμονωμένα (Macpherson, 1998). Πρόκειται για είδος που απαντάται στη Μεσόγειο, στον Ατλαντικό, από το Γιβραλτάρ ως τις ακτές της Σιέρρα Λεόνε, συμπεριλαμβανομένων και των ακτών της Ιβηρικής χερσονήσου και του Πράσινου Ακρωτηρίου. Σπάνια βρίσκονται στη Μαύρη θάλασσα.

Το μήκος του μπορεί να φτάσει τα 60 cm, ενώ το βάρος του μέχρι 1,7 kg και η ηλικία του μπορεί να φτάσει τα 10 χρόνια. Το σώμα του είναι πεπλατυσμένο και πεπιεσμένο στις πλευρές. Τα λέπια του είναι κυκλοειδή. Το ραχιαίο του πτερύγιο αποτελείται από 6-7 σκληρές ακτίνες και 14-15 μαλακές, ενώ το εδρικό από 3 σκληρές και 12-13 μαλακές. Το χρώμα του είναι ασημί-γκρι, με 6 σκούρες και 6 λεπτότερες και πιο ανοιχτόχρωμες, εναλλασσόμενες, κάθετες ραβδώσεις.

Το μυτάκι είναι ερμαφρόδιτο είδος με λειτουργικό πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό (Atz, 1964 - Zohar *et al.*, 1978 - Chan and Yeung, 1983 - Buxton and Garratt, 1990), στον ερμαφροδιτισμό αναφέρθηκε αρχικά ο Syrski (1876), γεγονός που δεν εκπλήσσει μιας και ανήκει στην οικογένεια των *Sparidae* της οποίας ο ερμαφροδιτισμός είναι διαδεδομένος (D' Ancona, 1949 – Lissia Frau and Casu, 1968 – Yamamoto, 1969). Ο D' Ancona (1949) πρότεινε μια έλλειψη αντιστροφής φύλων σε αυτό το είδος ενώ σύμφωνα με Lissia-Frau and Pala (1968) ορισμένα άτομα (είτε αρχικά αρσενικά είτε θηλυκά) δεν αλλάζουν ποτέ το φύλο. Ωριμάζει σεξουαλικά σε ηλικία δύο χρονών και για να

αναπαραχθεί χρειάζεται περιορισμένο εύρος θερμοκρασίας νερού στους  $21\pm 0,5$  °C (Micalle *et al.*, 1996) και η περίοδος ωοτοκίας επεκτείνεται από το Σεπτέμβριο μέχρι τον Δεκέμβριο (Paradaki *et al.*, 2008).

Από τα ελάχιστα αποτελέσματα εκτροφής που έχουν δημοσιευτεί (Faranda *et al.*, 1985 - Micalle *et al.*, 1995), φαίνεται ότι το μυτάκι είναι ένα είδος με υψηλό ρυθμό αύξησης, που σε συνδυασμό με την υψηλή εμπορική του αξία διεκδικεί επάξια μια θέση ανάμεσα στα υποψήφια προς εκτροφή νέα είδη. Οι γνώσεις επί της βιολογίας του μυτακιού είναι αναγκαίο να εμπλουτιστούν ώστε να βοηθηθεί η εκτροφή του είδους.

### **1.5 Αντικείμενο και στόχοι της παρούσας μελέτης**

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η εκτροφή μυτακιού από το στάδιο του γονιμοποιημένου αυγού έως το τέλος του εμβρυακού σταδίου, σε εργαστηριακές συνθήκες εκτροφής και κάτω από δυο διαφορετικές θερμοκρασίες. Στόχος της ήταν αφενός η περιγραφή της οντογένεσης κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (εμβρυακό και λεκιθοφόρο νυμφικό) με απώτερο σκοπό τη μορφολογική ταυτοποίηση του είδους η οποία κατόπιν μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στην επιλογή κατάλληλων διαχειριστικών χειρισμών κατά την εκτροφή του, και αφετέρου η μελέτη της αναπτυξιακής πλαστικότητας κάτω από δυο διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες. Το μυτάκι αποτελεί νέο είδος για τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας, του οποίου η προοπτική μαζικής παραγωγής του προϋποθέτει προσδιορισμό και ικανοποίηση των βιολογικών του απαιτήσεων.

Τα αυγά που χρησιμοποιήθηκαν ανήκαν στην ίδια ομάδα (μια ωοτοκία της ίδιας ομάδας γεννητόρων). Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε κάτω από σταθερές και ελεγχόμενες αβιοτικές συνθήκες. Η βαρύτητα που δόθηκε για τη διατήρηση της σταθερότητας των συνθηκών ήταν μεγάλη.

Το μυτάκι όπως προαναφερθήκαμε αναπαράγεται κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου με εύρος βέλτιστων θερμοκρασιών νερού τους  $21\pm 0,5$  °C (Micalle *et al.*, 1996). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα έγινε και η επιλογή των συγκεκριμένων θερμοκρασιών.

Τέλος, οι γνώσεις που αποκομίστηκαν από τη μελέτη της οντογένεσης και της επίδρασης της θερμοκρασίας σε αυτή μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό των ηθολογικών απαιτήσεων του μυτακιού με άμεσα οφέλη στον προγραμματισμό και τη διαχείριση της παραγωγής.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

---



Η παρούσα μελέτη πάνω στην οντογένεση του εμβρυακού σταδίου στο κοινό μυτάκι και στην επίδραση της θερμοκρασίας στην οντογένεση, πραγματοποιήθηκε στο Τ.Ε.Ι Μεσολογγίου, σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, στο τμήμα Υδατοκαλλιεργειών και Αλιευτικής Διαχείρισης, στο εργαστήριο των Ενυδρείων. Η μελέτη έλαβε χώρα αρχές Νοεμβρίου του 2009. Η επιλογή της συγκεκριμένης χρονικής περιόδου καθορίστηκε από την περίοδο ωοτοκίας του είδους κάτω από φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με αυγά από γεννήτορες του ιχθυογεννητικού σταθμού της εταιρείας Νηρεύς Α.Ε. το οποίο βρίσκεται στην περιοχή της Χιλιαδούς της κοινότητας Μανάγουλης, του δήμου Ευπαλίου, στο νομό Φωκίδας.

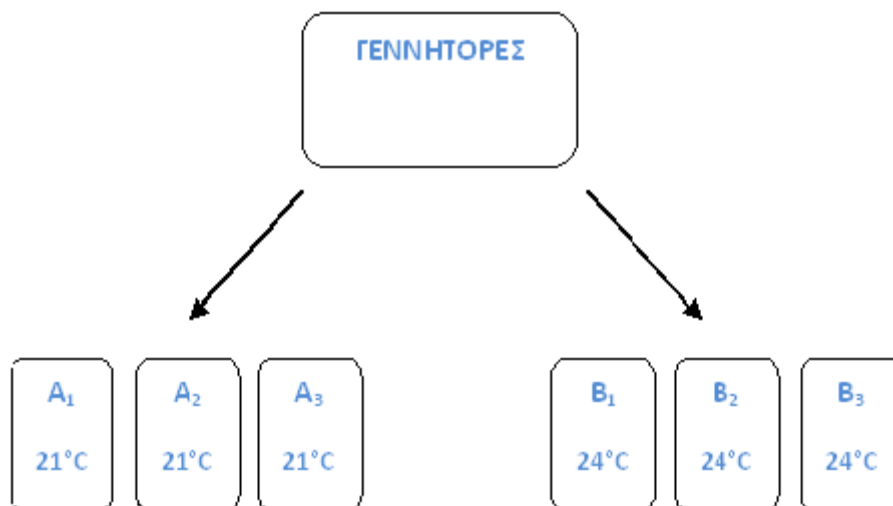
Το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από έξι δεξαμενές-ενυδρεία των 35 l ωφέλιμου όγκου. Η διάταξη των δεξαμενών δίνεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.1**, η διαχείριση των οποίων περιγράφεται διεξοδικά στη συνέχεια του κεφαλαίου.

Πριν από την έναρξη της μελέτης, τόσο οι δεξαμενές όσο και τα διάφορα βοηθητικά εξαρτήματα απολυμάνθηκαν με πυκνό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου. Η κάθε δεξαμενή διέθετε συμπληρωματικό εξοπλισμό (σύστημα ανανέωσης νερού, δίκτυο παροχής αέρα και θερμοστάτες), όπου πριν το ξεκίνημα του πειράματος προετοιμάστηκε και ελέγχθηκε η λειτουργία τους.

## 2.2 Διαδικασίες και συνθήκες

Όπως προαναφέρθηκε, η μελέτη πραγματοποιήθηκε με αυγά από γεννήτορες του ιχθυογεννητικού σταθμού της εταιρείας Νηρεύς Α.Ε. στη Χιλιαδού Μανάγουλης, Φωκίδας. Το απόθεμα των γεννητόρων απαρτιζόταν από 350 άτομα (1,0 kg μέσο βάρος), πρόελευσης  $F_1$  εκτρεφόμενης γενιάς, τα οποία είχαν αποθεματοποιηθεί σε κυλινδρική δεξαμενή χωρητικότητας 45 m<sup>3</sup>.

Η ωοτοκία πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα και τα αυγά που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από μία ωοτοκία (αυγά της ίδιας ομάδας) κάτω από φυσικές συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας. Το παρεχόμενο φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο (UV) θαλασσινό νερό (αλατότητας 38‰), υποστήριζε τη δεξαμενή των γεννητόρων με ένα ρυθμό ανανέωσης περίπου 5 m<sup>3</sup>/h. Η διατροφή τους ακολουθούσε ένα περιοδικό πρόγραμμα σε εβδομαδιαία βάση που απαρτιζόταν από καλαμάρι και ψάρια και pellets.



**Εικόνα 2.1** Σχηματική απεικόνιση της διάταξης των πειραματικών δεξαμενών.

Για τον ακριβή προσδιορισμό του χρόνου ωοτοκίας και γονιμοποίησης, προηγήθηκε μια περίοδος (μια εβδομάδα) δειγματοληπτικού ελέγχου και διερεύνησης του νερού της δεξαμενής γεννητόρων. Για τη δεδομένη δεξαμενή γεννητόρων και τη δεδομένη χρονική στιγμή, η γονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε μεσημεριανές ώρες.

Τα αυγά που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό των πειραματικών πληθυσμών προήλθαν από μια ωοτοκία. Με δεδομένο το γεγονός ότι τα γονιμοποιημένα αυγά στο μυτάκι επιπλέουν σε αλατότητα 38‰, αυτά συλλέχθηκαν μέσω της υπερχειλίσης σε μικρή κυλινδροκωνική δεξαμενή χωρητικότητας 400 l, εφοδιασμένης με πλαγκτονικό δίχτυ 400μm ανοίγματος ματιού.

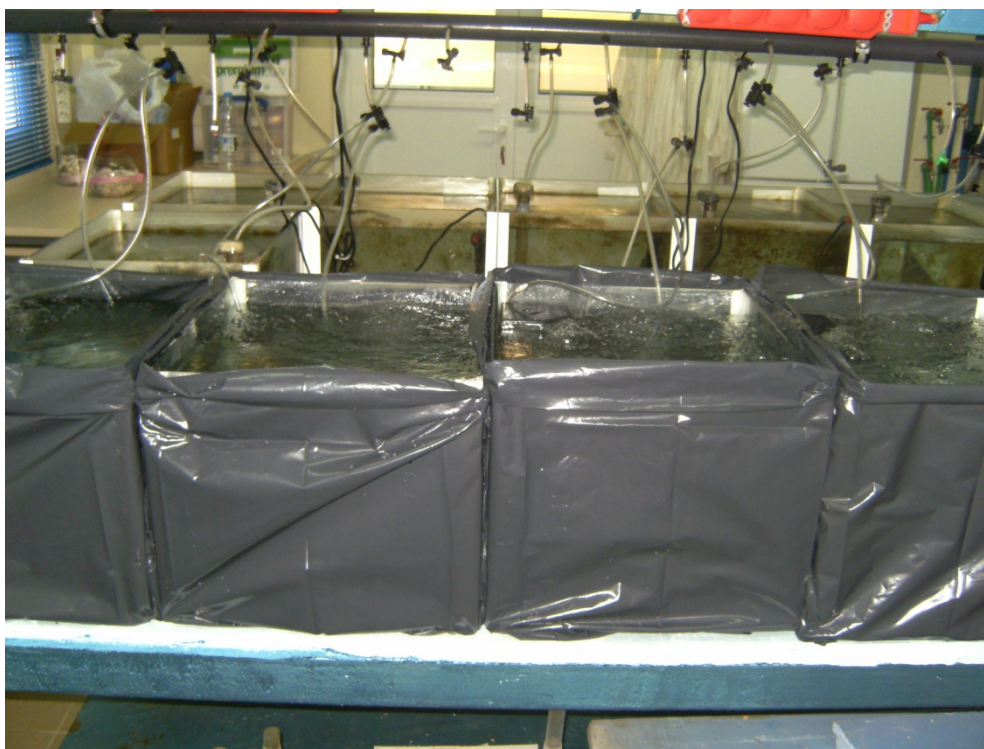
Το νερό που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από διάλυμα γλυκού νερού βρύσης και συνθετικό αλάτι για να αποκτήσει αλατότητας 38‰, μια αλατότητα που επικρατεί και στο φυσικό θαλασσινό νερό της περιοχής του Κορινθιακού. Η θερμοκρασία του νερού της θάλασσας την ημέρα της γονιμοποίησης των πειραματικών πληθυσμών ήταν 20°C. Η παραπάνω θερμοκρασία σε συνδυασμό με τις καταγεγραμμένες βιβλιογραφικά θερμοκρασίες φυσικής ωοτοκίας, καθόρισαν την επιλογή των θερμοκρασιακών συνθηκών που επιλέχθηκαν στο παρόν πείραμα (21 και 24°C).

### 2.2.1 Αποθεματοποίηση πειραματικών δεξαμενών

Η μελέτη της οντογένεσης του εμβρυακού σταδίου στο μυτάκι πραγματοποιήθηκε κάτω από δυο θερμοκρασιακές συνθήκες (21±0.2°C και 24±0.5°C).



Το πειραματικό σύστημα επώασης των αυγών του μυτακιού αποτελούνταν από 6 ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  για τους  $21^\circ\text{C}$  και  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  για τους  $24^\circ\text{C}$ ) δεξαμενές-ενυδρεία (3 για κάθε πειραματική θερμοκρασία), χωρητικότητας 35 l έκαστο. Οι δεξαμενές στην πραγματικότητα ήταν γυάλινα και ορθογώνια ενυδρεία (διαστάσεων 40 x 35 x 30 cm) ενώ εξωτερικά των τοιχωμάτων τους καλύφθηκαν με μαύρες σακούλες για την εμπόδιση της διέλευσης του φωτός (**Εικόνα 2.2**).



**Εικόνα 2.2** Φωτογραφική απεικόνιση των πειραματικών δεξαμενών-ενυδρείων.

Το νερό της κάθε δεξαμενής ανακυκλωνόταν (με ρυθμό ανανέωσης περίπου 100%) την ώρα (κλειστό ατομικό σύστημα) ξεχωριστά με τη βοήθεια φίλτρου εφοδιασμένου με αντλία (**Εικόνα 2.3**). Τόσο η είσοδος όσο και η έξοδος της αντλίας καλύφθηκαν με πλαγκτονικό δίκτυο 400  $\mu\text{m}$  για την αποφυγή διαρροής του πληθυσμού. Ο φωτισμός κρατήθηκε σε μηδενικά επίπεδα, ενώ ελαφρύς αερισμός (σωλήνας μικρού διαμετρήματος, από το δίκτυο του εργαστηρίου, με πέτρα αέρα) εφαρμόστηκε.



**Εικόνα 2.3** Φωτογραφική απεικόνιση του φίλτρου των δεξαμενών.

Η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού ρυθμιζόταν και διατηρούταν στα πειραματικά επίπεδα με τη χρήση θερμοστατών. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας γινόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 30 min) καθ' όλη τη διάρκεια του εικοσιτετράωρου με τη χρήση εργαστηριακού θερμομέτρου χειρός.

Καθημερινός έλεγχος των επιπέδων κορεσμού του διαλυμένου οξυγόνου και του pH πραγματοποιήθηκε. Το εύρος των τιμών στα οποία κυμάνθηκαν ήταν 100% για το διαλυμένο οξυγόνο και 8,0 για το pH.

Ο αριθμός των αυγών που τοποθετήθηκε σε κάθε δεξαμενή ήταν περίπου 17.500 (τελικής συγκέντρωσης 500 αυγά  $l^{-1}$ ). Ακολούθησε μία περίοδος περίπου 2 ωρών όπου βαθμιαία πραγματοποιήθηκε αλλαγή της θερμοκρασίας από τους 20 °C στους 21°C και στους 24°C για τις ανάγκες της μελέτης. Η περίοδος προσαρμογής στις νέες θερμοκρασιακές συνθήκες (περίοδος εγκλιματισμού), πραγματοποιήθηκε με ιδιαίτερη προσοχή μιας και ο βαθμός ομαλότητας αλλαγών των περιβαλλοντικών παραγόντων μπορεί να καθορίσει την τύχη της συνέχειας μιας καλλιέργειας.

## 2.3 Παράμετροι που παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν

Η μελέτη της οντογένεσης του εμβρυακού σταδίου στο μυτάκι εστιάστηκε κυρίως στα εξής: **1.** ποσοστά γονιμοποίησης και εκκόλαψης, **2.** ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αυγού του μυτακιού, **3.** προσδιορισμός των αναπτυξιακών χρόνων, και **4.** εξέλιξη των αναπτυξιακών σταδίων.

### 2.3.1 Ποσοστά γονιμοποίησης και εκκόλαψης

Κατά το εμβρυακό στάδιο στο μυτάκι υπολογίστηκε τόσο το ποσοστό γονιμοποίησης, όσο και τα ποσοστά εκκόλαψης των αυγών του για κάθε θερμοκρασία και δεξαμενή χωριστά. Για τον προσδιορισμό του ποσοστού της γονιμοποίησης, τα αυγά πριν από την εναπόθεσή τους στα ενυδρεία, τοποθετήθηκαν σε δοχείο 10 l με νερό αλατότητας 38‰ και αφήθηκαν σε ηρεμία για 10 λεπτά. Τα γονιμοποιημένα αυγά σε αυτές τις συνθήκες επιπλέουν, ενώ αντίθετα τα μη γονιμοποιημένα καθιζάνουν. Με ζύγιση των επιπλέοντων και των καθιζάνοντων αυγών υπολογίστηκε το ποσοστό γονιμοποίησης. Για τον υπολογισμό του ποσοστού εκκόλαψης, πραγματοποιήθηκε ζύγιση των νεκρών αυγών, τα οποία εναποτέθηκαν στους πυθμένες των επωαστήρων, ενώ τα ποσοστά που προέκυψαν επιβεβαιώθηκαν με δειγματοληπτικές καταμετρήσεις των νεοεκκολαπτόμενων ιχθυονυμφών, για κάθε θερμοκρασία και δεξαμενή χωριστά.

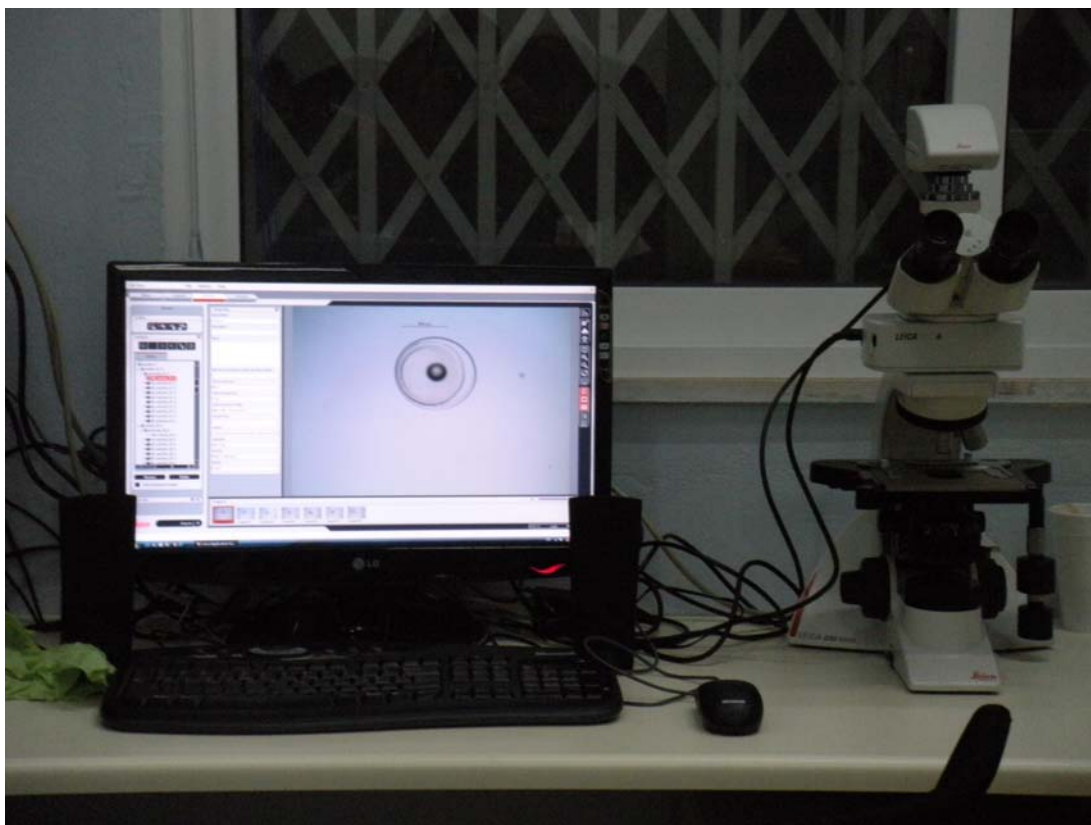
### 2.3.2 Χαρακτηριστικά αυγού

Στην αρχή του πειράματος μετρήθηκαν τρία ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αυγού του μυτακιού:

- A. η διάμετρος του αυγού (mm),
- B. η διάμετρος της σταγόνας λιπιδίου (mm),
- Γ. το νωπό βάρος (mg).

Όσο αφορά τη διάμετρο, τόσο του αυγού όσο και της σταγόνας λιπιδίου σε δείγμα 160 αυγών πραγματοποιήθηκε "μικροσκοπική" μέτρηση. Συγκεκριμένα, με χρήση ψηφιακής κάμερας (Leica DM 100) προσαρμοσμένης σε μικροσκόπιο (Leica ICCA) ([Εικόνα 2.4](#)), φωτογραφήθηκαν τα 160 αυγά. Η μέτρηση των διαμέτρων έγινε με τη χρήση του ψηφιακού προγράμματος ImageJ.

Για τον ακριβή προσδιορισμό του νωπού βάρους του αυγού του μυτακιού πάρθηκαν 6 δείγματα από 84 έως 200 mg ή συνολικού βάρους 796 mg. Τα δείγματα ζυγίστηκαν με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού ακρίβειας 0,0001 g (OHAUS GA 110) ενώ αναλυτικά καταμετρήθηκαν 2.870 αυγά σύνολο.



**Εικόνα 2.4** Σύστημα μικροσκοπίου και ψηφιακής κάμερας.

### 2.3.3 Αναπτυξιακοί χρόνοι

Οι χρόνοι στους οποίους έλαβαν χώρα τα διάφορα αναπτυξιακά γεγονότα του εμβρυακού σταδίου στο μυτάκι μετρήθηκαν από αφετηρία τη στιγμή της γονιμοποίησης που ορίστηκε ως η αρχή του σταδίου ( $t_0 = 0$  ώρες), ενώ εκφράστηκαν ως απόλυτες (ώρες μετά τη γονιμοποίηση) και ως σχετικές τιμές (Divanach, 1985):

$$RT_i = t_i / T_{sd} * 100$$

όπου

$RT_i$ : σχετικός χρόνος (Relative Time) του  $i$  αναπτυξιακού γεγονότος (απόλυτη τιμή)

$t_i$ : το χρονικό διάστημα από το  $t_0$  μέχρι το  $i$  αναπτυξιακό γεγονός (ώρες)

Tsd : η συνολική διάρκεια του σταδίου (ώρες).

Το τέλος του σταδίου και επομένως η αρχή του λεκιθοφόρου σταδίου, ορίστηκε στο χρονικό σημείο όπου το 50% των αυγών του πληθυσμού είχε εκκολαφθεί (Kendall *et al.*, 1984).

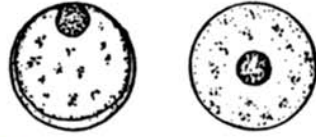
#### **2.3.4 Αναπτυξιακή εξέλιξη**

Η εξέλιξη του εμβρυακού σταδίου στο μυτάκι μελετήθηκε επισταμένα καθ' όλη τη διάρκειά του και στις δύο θερμοκρασίες (21 και 24°C). Για τον σκοπό αυτό η παρατήρηση έγινε *in vivo* με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου, ενώ επίσης κάθε δείγμα φωτογραφήθηκε με τη χρήση της ψηφιακής κάμερας.

Ξεκινώντας από τη γονιμοποίηση, δείγμα των 25 ατόμων ανά θερμοκρασιακή συνθήκη λαμβανόταν κάθε 30 min, μέχρι και την εκκόλαψη. Ο προσδιορισμός των εμβρυακών αναπτυξιακών σταδίων του μυτακιού σε κάθε θερμοκρασία, πραγματοποιούνταν βάσει της πλειοψηφίας των ατόμων κάθε δείγματος. Γενικά, φάνηκε ότι η εμβρυακή ανάπτυξη των ατόμων κάθε δείγματος ήταν σχεδόν σύγχρονη, επιτρέποντας έτσι τον ακριβή προσδιορισμό των σταδίων κάθε φορά.

Ο προσδιορισμός των σταδίων πραγματοποιήθηκε βάσει του Divanach (1985) ([Εικόνα 2.5](#)).

Γονιμοποίηση



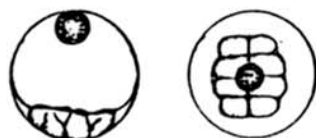
Πρώτη αυλάκωση



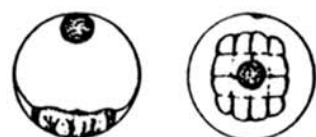
Δεύτερη αυλάκωση



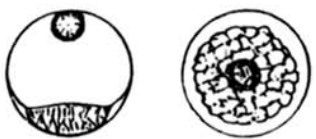
Αυλάκωση παραλ. στη δεύτερη



Αυλάκωση παραλ. στη πρώτη



Μορίδιο



Σχηματισμός βλαστοδίσκου





Επιβολή 1/2



Επιβολή 3/4



Έμβρυο 180° της λεκίδου



Έμβρυο 240° της λεκίδου



Έμβρυο 270° της λεκίδου



Έμβρυο 360° της λεκίδου



Εκκόλαψη



**Εικόνα 2.5** Σχηματική απεικόνιση των αναπτυξιακών σταδίων κατά την εμβρυογένεση των ιχθύων (Divanach, 1985, in Κλημογιάννη, 2004).





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

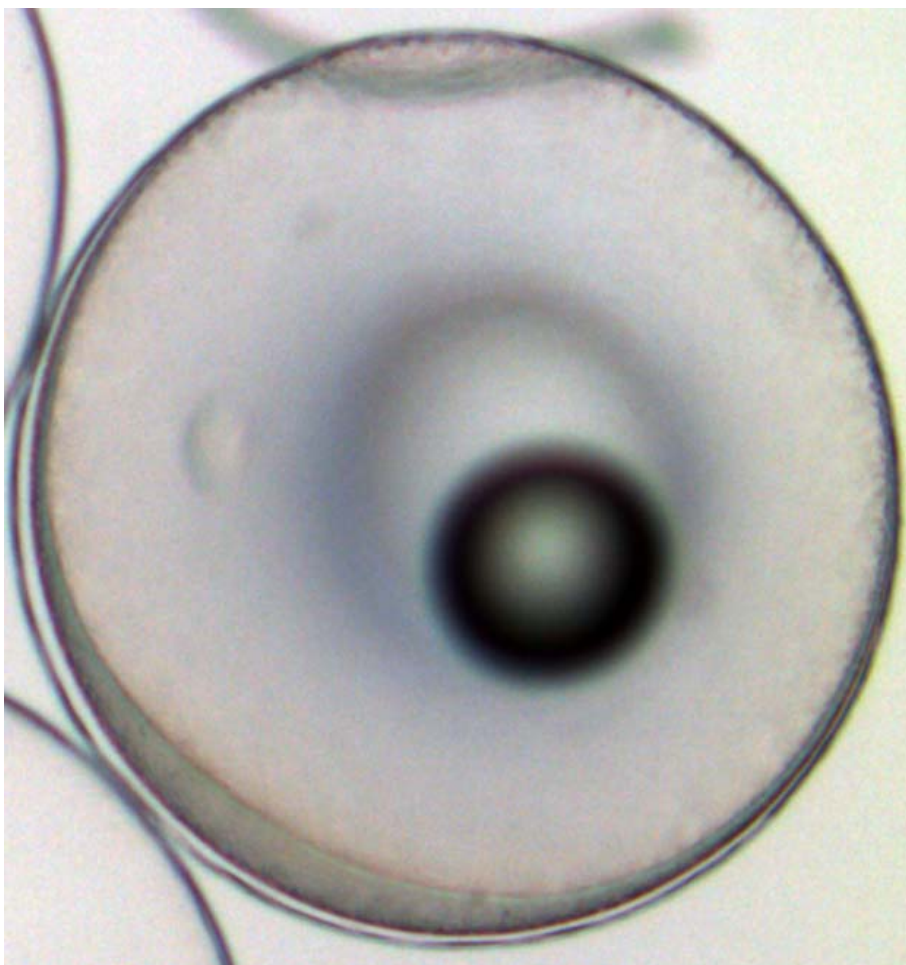
---



### 3.1 Χαρακτηριστικά αυγού

Σε αλατότητα 38‰, κάτω από την οποία πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη, τα αυγά στο μυτάκι επιπλέουν (υπονευστονικά ή εμφανίζουν επιφανειακή κατανομή). Όσο αφορά τον χώρο στον οποίο θα αναπτυχθεί το έμβρυο, φάνηκε να είναι τελολεκιθικά (το έμβρυο αναπτύχθηκε στον ζωικό πόλο του αυγού, και αντιδιαμετρικά από τη σταγόνα λιπιδίων).

Τα αυγά του μυτακιού έχουν σφαιρικό σχήμα, είναι διαφανή, ενώ εσωτερικά πληρούνται με ομογενή και άχρωμη λέκιθο. Διαθέτουν μια σταγόνα λιπιδίων (oil globule), η οποία εντοπίστηκε στην περιφέρεια του αυγού. Αυτή δεν διαθέτει χρωματισμό (άχρωμη), ενώ η παρατήρησή της με το μικροσκόπιο την εμφανίζει με ένα μαύρο δακτύλιο στην περιφέρειά της λόγω της διάθλασης του φωτός (**Εικόνα 3.1**).



**Εικόνα 3.1** Φωτογραφική απεικόνιση αυγού του *D. puntazzo*, μετά τη γονιμοποίηση.

**Πίνακας 3.1** Δείγμα 160 αυγών του *D. puntazzo* για υπολογισμό διαμέτρων.

A/A	ΔΙΑΜ. ΑΥΓΟΥ (mm)	ΔΙΑΜ. ΣΤΑΓΟΝΑΣ (mm)	A/A	ΔΙΑΜ. ΑΥΓΟΥ (mm)	ΔΙΑΜ. ΣΤΑΓΟΝΑΣ (mm)	A/A	ΔΙΑΜ. ΑΥΓΟΥ (mm)	ΔΙΑΜ. ΣΤΑΓΟΝΑΣ (mm)
1	0,865	0,234	56	0,862	0,245	111	0,880	0,245
2	0,862	0,245	57	0,868	0,245	112	0,852	0,235
3	0,865	0,242	58	0,877	0,245	113	0,867	0,242
4	0,868	0,240	59	0,865	0,242	114	0,862	0,239
5	0,845	0,240	60	0,880	0,242	115	0,882	0,247
6	0,854	0,234	61	0,868	0,234	116	0,845	0,239
7	0,865	0,248	62	0,868	0,228	117	0,867	0,238
8	0,871	0,245	63	0,868	0,248	118	0,845	0,234
9	0,860	0,248	64	0,871	0,245	119	0,862	0,242
10	0,868	0,240	65	0,865	0,240	120	0,848	0,225
11	0,865	0,245	66	0,880	0,240	121	0,863	0,232
12	0,871	0,245	67	0,865	0,222	122	0,865	0,247
13	0,874	0,237	68	0,868	0,240	123	0,862	0,239
14	0,877	0,225	69	0,871	0,237	124	0,869	0,241
15	0,868	0,228	70	0,871	0,237	125	0,846	0,241
16	0,868	0,225	71	0,877	0,242	126	0,851	0,231
17	0,862	0,242	72	0,857	0,240	127	0,861	0,244
18	0,865	0,242	73	0,865	0,240	128	0,874	0,248
19	0,885	0,242	74	0,865	0,242	129	0,859	0,247
20	0,871	0,242	75	0,880	0,245	130	0,871	0,243
21	0,865	0,237	76	0,848	0,242	131	0,863	0,243
22	0,874	0,234	77	0,862	0,234	132	0,873	0,247
23	0,885	0,237	78	0,848	0,237	133	0,876	0,241
24	0,868	0,231	79	0,854	0,234	134	0,879	0,227
25	0,874	0,228	80	0,851	0,228	135	0,863	0,225
26	0,865	0,231	81	0,869	0,232	136	0,868	0,225
27	0,851	0,234	82	0,885	0,228	137	0,865	0,245
28	0,873	0,222	83	0,870	0,233	138	0,861	0,238
29	0,865	0,234	84	0,885	0,236	137	0,884	0,241
30	0,860	0,222	85	0,858	0,226	138	0,869	0,240
31	0,874	0,248	86	0,878	0,243	139	0,867	0,239
32	0,877	0,245	87	0,861	0,231	140	0,872	0,232
33	0,871	0,237	88	0,872	0,241	141	0,883	0,235
34	0,874	0,248	89	0,863	0,235	142	0,871	0,234
35	0,868	0,242	90	0,884	0,233	143	0,871	0,225
36	0,880	0,240	91	0,873	0,247	144	0,868	0,234
37	0,862	0,231	92	0,874	0,240	145	0,849	0,232
38	0,871	0,234	93	0,878	0,226	146	0,875	0,224
39	0,877	0,248	94	0,875	0,238	147	0,864	0,233
40	0,868	0,234	95	0,848	0,228	148	0,866	0,228
41	0,871	0,234	96	0,864	0,247	149	0,871	0,245
42	0,882	0,225	97	0,863	0,240	150	0,879	0,247
43	0,871	0,234	98	0,879	0,247	151	0,869	0,235
44	0,880	0,231	99	0,862	0,239	152	0,873	0,247
45	0,860	0,228	100	0,882	0,244	153	0,862	0,238
46	0,877	0,242	101	0,865	0,231	154	0,883	0,243
47	0,865	0,234	102	0,868	0,228	155	0,865	0,234
48	0,868	0,237	103	0,865	0,247	156	0,869	0,232
49	0,868	0,240	104	0,869	0,243	157	0,877	0,248
50	0,882	0,231	105	0,867	0,242	158	0,867	0,235
51	0,874	0,248	106	0,878	0,238	159	0,854	0,240
52	0,871	0,237	107	0,866	0,223	160	0,871	0,245
53	0,880	0,228	108	0,864	0,236			
54	0,871	0,234	109	0,877	0,242			
55	0,851	0,231	110	0,870	0,236			

**Πίνακας 3.2** Δείγμα 2.294 αυγών του *D. puntazzo* για υπολογισμό νωπού βάρους.

A/A	ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (gr)	ΑΡ.ΑΥΓΩΝ	ΑΥΓΑ ΑΝΑ gr	ΝΩΠΟ ΑΤΟΜΙΚΟ ΒΑΡΟΣ (mg)
1	0,146	448	3.068	0,326
2	0,140	386	2.757	0,363
3	0,128	364	2.844	0,352
4	0,200	582	2.910	0,344
5	0,098	282	2.878	0,348
6	0,084	232	2.762	0,362
<b>ΣΥΝΟΛΑ</b>	0,796	2.294		

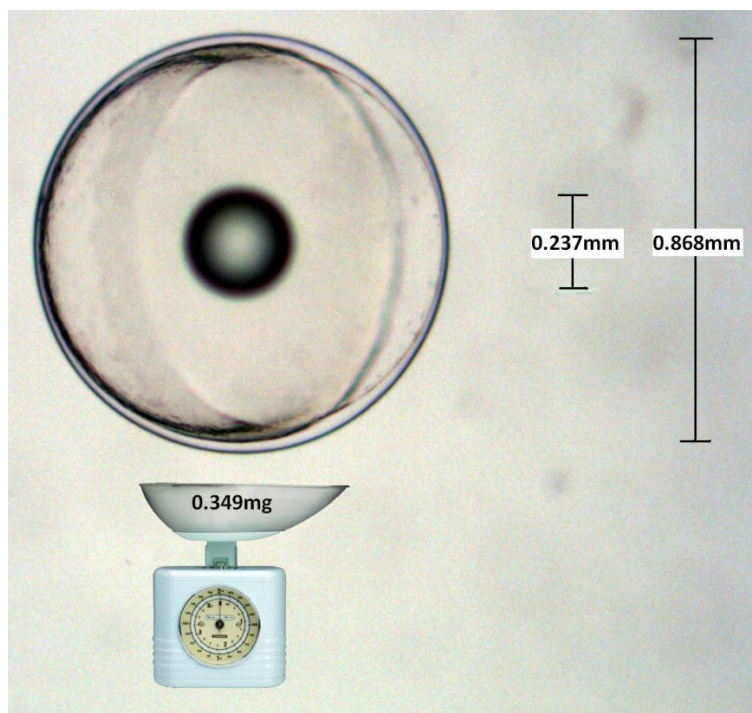
Μετά τη γονιμοποίηση το χόριο των αυγών κλείνει τα κανάλια επικοινωνίας του με το περιβάλλον μέσο, για να αποφευχθεί η πολυσπερμία. Λίγο πριν από αυτή την απομόνωση, μια μικρή ποσότητα νερού εισέρχεται στον περιλεκιθικό χώρο, γεγονός που τον καθιστά πλέον διακριτό από πλάγια παρατήρηση, ιδιαίτερα στον ζωικό πόλο, εκεί όπου συσσωρεύεται το πρωτόπλασμα και εξελίσσεται η εμβρυογένεση.

Στην παρούσα μελέτη η καταμέτρηση 160 αυγών (**Πίνακας 3.1**) έδειξε ότι το αυγό στο μυτάκι έχει διάμετρο που κυμαίνεται από 0.845 έως 0.885 mm (μέση τιμή  $0.868 \pm 0.009$  mm) (Πίνακας 3.3). Από το ίδιο δείγμα, η διάμετρος της σταγόνας λιπιδίων μετρήθηκε από 0.222 έως 0.248 mm (μέση τιμή  $0.237 \pm 0.007$  mm). Από τη ζύγιση 2.870 αυγών (**Πίνακας 3.2**) υπολογίσθηκε ότι, το νωπό βάρος του αυγού στο μυτάκι κυμαίνεται από 0.326 έως 0.363 mg (μέση τιμή  $0.349 \pm 0.014$  mg).

**Πίνακας 3.3** Χαρακτηριστικές διαστάσεις των αυγών του *D. puntazzo*.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	S.D.	Max	Min	n
Διάμετρος αυγού (mm)	0,868	0,009	0,885	0,845	160
Διάμετρος σταγόνας λιπιδίων (mm)	0,237	0,007	0,248	0,222	160
Βάρος (mg)	0,349	0,014	0,363	0,326	2.870

Οι μέσες τιμές των παραπάνω χαρακτηριστικών διαστάσεων του αυγού στο μυτάκι παραθέτονται και σχηματικά στην **Εικόνα 3.2**.



**Εικόνα 3.2** Σχηματική απεικόνιση μέσω των τιμών των χαρακτηριστικών διαστάσεων των αυγών του *D. puntazzo*.

### 3.2 Εμβρυακή ανάπτυξη στο μυτάκι

Η εξέλιξη της εμβρυακής οντογένεσης στο μυτάκι (βλ. **Πίνακας 3.1**) αποτυπώθηκε ως εξής:

#### Αυλακώσεις

Μετά τη γονιμοποίηση (Μ.Γ) το πρωτόπλασμα φάνηκε να διαφοροποιείται από τη λέκιθο και να συγκεντρώνεται στον ζωικό πόλο. Αποτέλεσμα αυτού είναι η διάκριση του περιλεκιθικού χώρου (ο χώρος μεταξύ του χορίου και της λεκιθικής μεμβράνης) όταν η παρατήρηση γίνεται από την πλάγια όψη του αυγού. Αφού το πρωτόπλασμα συγκεντρώθηκε στον ζωικό πόλο ξεκίνησαν οι αυλακώσεις (κατάτμηση του ζυγωτού) (cleavage). Στα αυγά του μυτακιού οι αυλακώσεις παρατηρήθηκε να είναι μεροβλαστικές (πάνω από τη λέκιθο και σε διαφοροποιημένη περιοχή του κυτοπλάσματος).

Η πρώτη αυλάκωση (1h Μ.Γ. για τους 21°C και τους 24°C ή 2.44% και 3.13% RT<sub>i</sub>, αντίστοιχα) χώρισε το ζυγωτό στη μέση και δημιουργήθηκαν δυο νέα κύτταρα (**Εικόνα 3.3**). Πριν ολοκληρωθεί η πρώτη αυλάκωση ξεκίνησε και η δεύτερη αυλάκωση (1h και

**Πίνακας 3.3** Εμβρυακή ανάπτυξη του *D. pulex* στους 21 και 24°C.

ΣΤΑΔΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	21°C		24°C	
		ΧΡΟΝΟΣ (h)	RT <sub>i</sub> (%)	ΧΡΟΝΟΣ (h)	RT <sub>i</sub> (%)
<b>ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ</b>	Γονιμοποίηση	0.00'	0,00	0.00'	0,00
<b>ΑΥΛΑΚΩΣΕΙΣ</b>	2 κύτταρα	1.00'	2,44	1.00'	3,13
	4 κύτταρα	1.30'	3,66	1.30'	4,69
	8 κύτταρα	2.30'	6,10	2.00'	6,25
	16-32 κύτταρα	3.30'	8,54	2.30'	7,81
<b>ΜΟΡΙΔΙΟ</b>	Μορίδιο	4.30'	10,98	3.30'	10,94
<b>ΒΛΑΣΤΙΔΙΟ</b>	Βλαστίδιο	7.30'	18,29	5.30'	17,19
	Πρώμο γαστρίδιο	9.30'	23,17	7.30'	23,44
<b>ΓΑΣΤΡΙΔΙΟ</b>	1/4 επιβολή	12.30'	30,49	9.30'	29,69
	1/3 επιβολή	14.00'	34,15	10.30'	32,81
	1/2 επιβολή	15.00'	36,59	11.30'	35,94
	3/4 επιβολή	15.30'	37,80	12.00'	37,50
<b>ΝΕΥΡΙΔΙΟ</b>	Πρώμο νευρίδιο	16.30'	40,24	13.00'	40,63
	Εμφάνιση σωματιδίου Kupffer	17.00'	41,46	13.30'	42,19
	Υστερο νευρίδιο	17.30'	42,68	13.30'	42,19
	Κλείσιμο βλαστοπόρου	18.00'	43,90	14.00'	43,75
<b>ΟΡΓ. ΕΜΒΡΥΟΥ</b>	2 σωμίτες	18.30'	45,12	14.30'	45,31
	4 σωμίτες	19.30'	47,56	15.30'	48,44
	6 σωμίτες (1/2 εμβρύου)	20.30'	50,00	16.00'	50,00
	8 σωμίτες	21.30'	52,44	16.30'	51,56
	10-11 σωμίτες	22.30'	54,88	17.30'	54,69
	12 σωμίτες αρχή σχηματισμού καρδιάς	23.30'	57,32	18.00'	56,25
	14 σωμίτες	24.00'	58,54	18.30'	57,81
	16 σωμίτες (σχηματισμός πρωτογενούς περιφεριακής πτερυγοπτυχής)	25.00'	60,98	19.30'	60,94
	18 σωμίτες (2/3 εμβρύου, σχηματισμός οπτικών φακών)	26.30'	64,63	20.30'	64,06
	20 σωμίτες (σχηματισμός ωτόλιθων)	28.00'	68,29	21.30'	67,19
	22 σωμίτες (αποκόλληση ουραίου πτερύγιου από το λεκθικό σάκο)	28.30'	69,51	22.30'	70,31
	3/4 εμβρύου, έμβρυο σε κίνηση	34.00'	82,93	26.30'	82,81
<b>ΕΚΚΟΛΑΨΗ</b>	Πολύ δραστήριο έμβρυο, κεφαλή υπερβολικά ανεπτυγμένη	39.00'	95,12	30.30'	95,31
	Αρχή εκκόλαψης	40.30'	98,78	31.30'	98,44
	50% εκκόλαψης	<b>41.00'</b>	<b>100</b>	<b>32.00'</b>	<b>100</b>



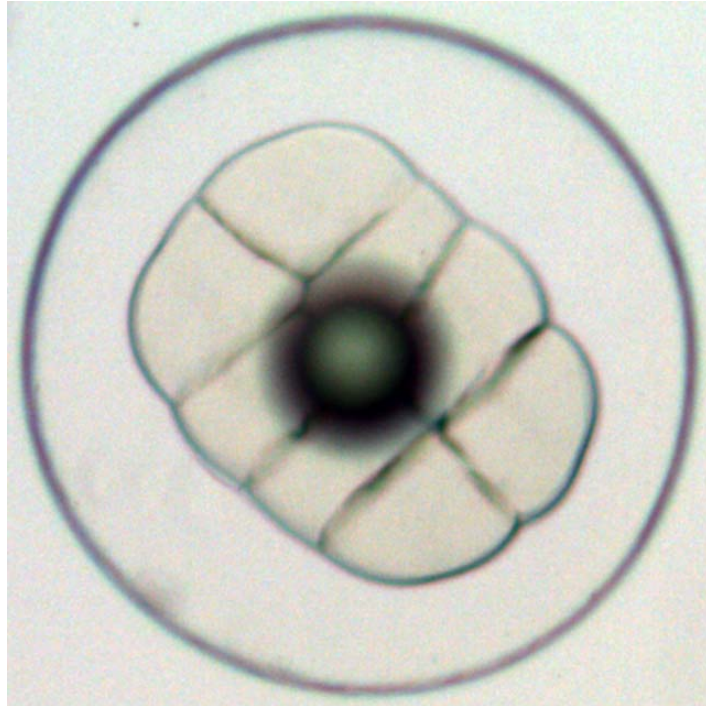


**Εικόνα 3.3** Αυλακώσεις, στη φάση των 2 κυττάρων, του *D. puntazzo*.

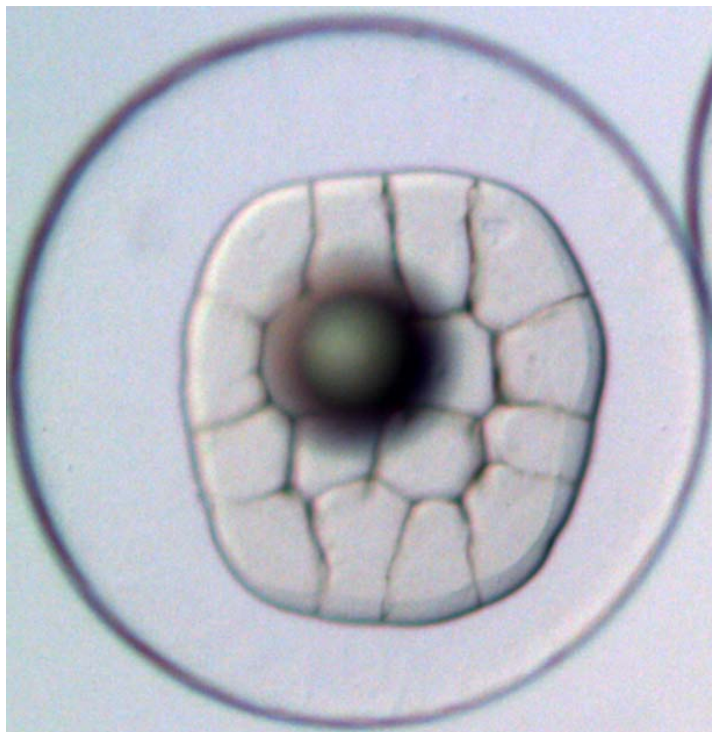


**Εικόνα 3.4** Αυλακώσεις, στη φάση των 4 κυττάρων, του *D. puntazzo*.





**Εικόνα 3.5** Αυλακώσεις, στη φάση των 8 κυττάρων, του *D. puntazzo*.



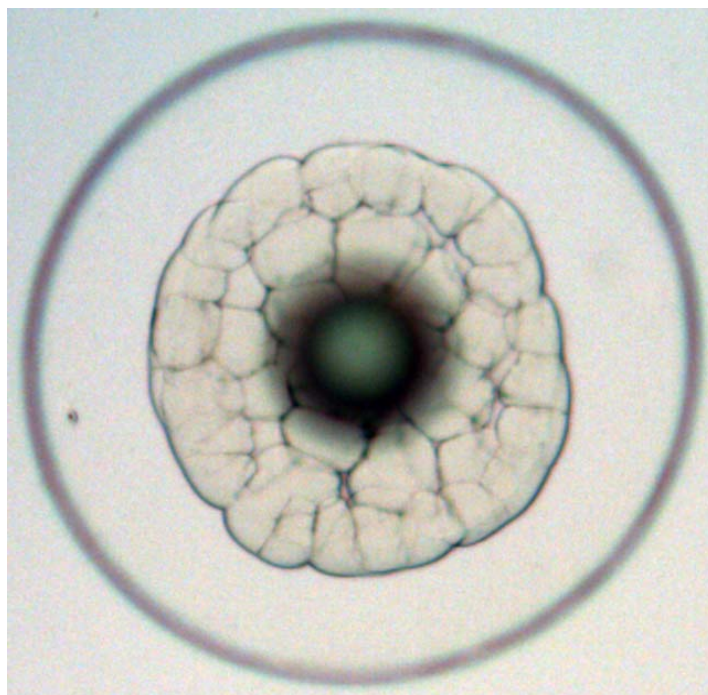
**Εικόνα 3.6** Αυλακώσεις, στη φάση των 16-32 κυττάρων, του *D. puntazzo*.

30min Μ.Γ. για τους 21°C και τους 24°C ή 3.66% και 4.69% RT<sub>i</sub>, αντίστοιχα) κάθετη στην πρώτη, σχηματίζοντας τέσσερα κύτταρα (Εικόνα 3.4). Με την επόμενη αυλάκωση (2h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 2h Μ.Γ. για τους 24°C ή 6.10% και 6.25% RT<sub>i</sub>, αντίστοιχα) δημιουργήθηκαν οκτώ κύτταρα (Εικόνα 3.5), ενώ 3h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 2h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 8.54% και 7.81% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν οι επόμενες αυλακώσεις (16 με 32 νέα κύτταρα) (Εικόνα 3.5).

### Μορίδιο

Στην αρχή των κυτταρικών διαιρέσεων οι αυλακώσεις στο μυτάκι είναι σύγχρονες και συμμετρικές. Μέχρι τα 16-32 βλαστομερίδια (έτσι ονομάζονται τα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες αυλακώσεις) παρατηρήθηκε ο παραπάνω συγχρονισμός και συμμετρία. Μετά τα 32 κύτταρα ο συγχρονισμός και η συμμετρία ήταν δύσκολο να διαπιστωθεί (Εικόνα 3.7).

Με την πρόοδο των αυλακώσεων, τα κύτταρα στο μυτάκι παρατηρήθηκε συνεχώς να πολλαπλασιάζονται και να γίνονται όλο και μικρότερα, ενώ το μέγεθος και το γενικότερο σχήμα του εμβρύου παραμένει το ίδιο. Η συνεχόμενη κατάτμηση του ζυγωτού έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας συμπαγής μάζας κυττάρων που μοιάζει με μούρο και το αυγό του μυτακιού έχει εισέλθει στο στάδιο του μοριδίου (morula) (4h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 3h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 10.98% και 10.94% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα).



Εικόνα 3.7 Μορίδιο, του *D. puntazzo*.

## Βλαστίδιο

Μετά το στάδιο του μοριδίου και στην αρχή του σταδίου του βλαστιδίου (blastula), η διάκριση των κυττάρων στο μυτάκι αρχίζει να περιορίζεται αφού μειώνεται το μέγεθος των κυττάρων εξαιτίας των κυτταρικών διαιρέσεων (πρώιμη φάση του βλαστιδίου) (Εικόνα 3.8).

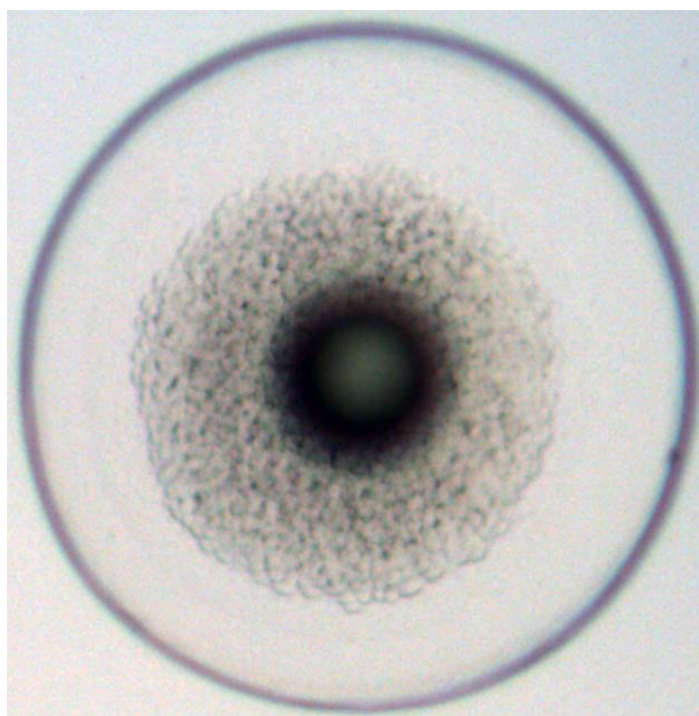
Σε χρόνο 7h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 5h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 18.29% και 17.19% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, στον ζωικό πόλο αρχίζει να σχηματίζεται μια κοιλότητα, ο βλαστόδισκος ή βλαστικός δίσκος (germ ring) και το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο του βλαστιδίου. Σε αυτό το στάδιο το πρώιμο έμβρυο απαρτίζεται από κάποιες δεκάδες χιλιάδες κύτταρα που το σύνολό τους σχηματίζει το βλαστόδερμα (blastoderm).



**Εικόνα 3.8** Βλαστίδιο σε πρώιμη φάση, του *D. pulex*.

Το βλαστόδερμα μπορεί να χωριστεί σε δυο περιοχές την κεντρική διαφανή περιοχή (area pellucida) και στην περιφερική αδιαφανή περιοχή (area opaca) όπου και την περιβάλλει. Η διαφανή περιοχή υποδιαιρείται στην εσωτερική κεντρική περιοχή (central area) και στην περιθωριακή ζώνη (marginal zone), όπου σε αυτό το στάδιο κύτταρα της επιβλάστης μαζί με κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν οριζόντια από την περιθωριακή

ζώνη ενώνονται και σχηματίζουν μια ομοιόμορφη στοιβάδα την υποβλάστη. Στο τέλος του σταδίου, το βλαστόδερμα αποτελείται από δυο στοιβάδες, την υποβλάστη και τη επιβλάστη. Η κοιλότητα που σχηματίζουν οι δυο στοιβάδες αποτελούν τον βλαστόκοιλο, ενώ στην περιφέρεια του έχει σχηματισθεί ένας δακτύλιος (σαν να κάθεται η λέκιθος πάνω σε έναν δακτύλιο) γνωστός ως βλαστόδισκος (ύστερη φάση του βασιδίου) (Εικόνα 3.9).



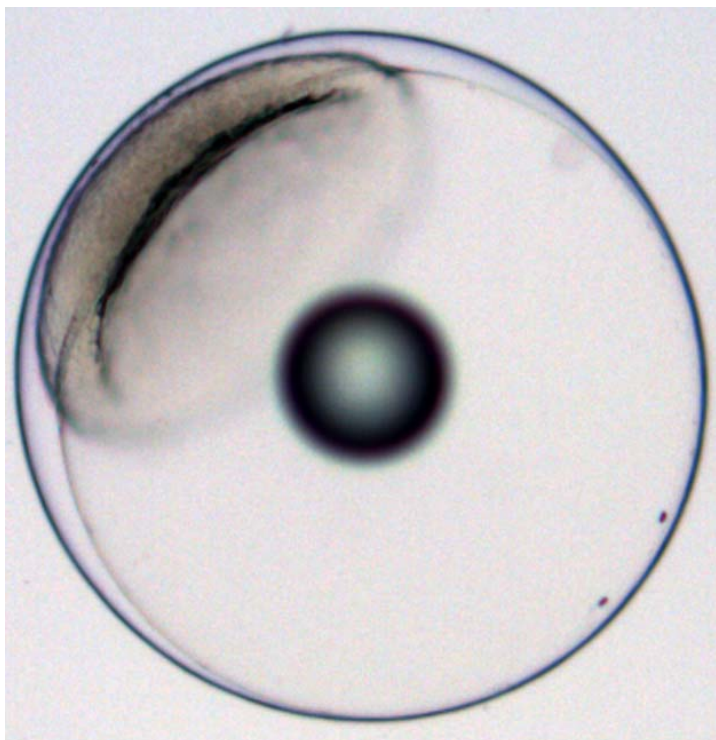
**Εικόνα 3.9** Βλαστίδιο σε ύστερη φάση, του *D. puntazzo*.

### **Γαστρίδιο**

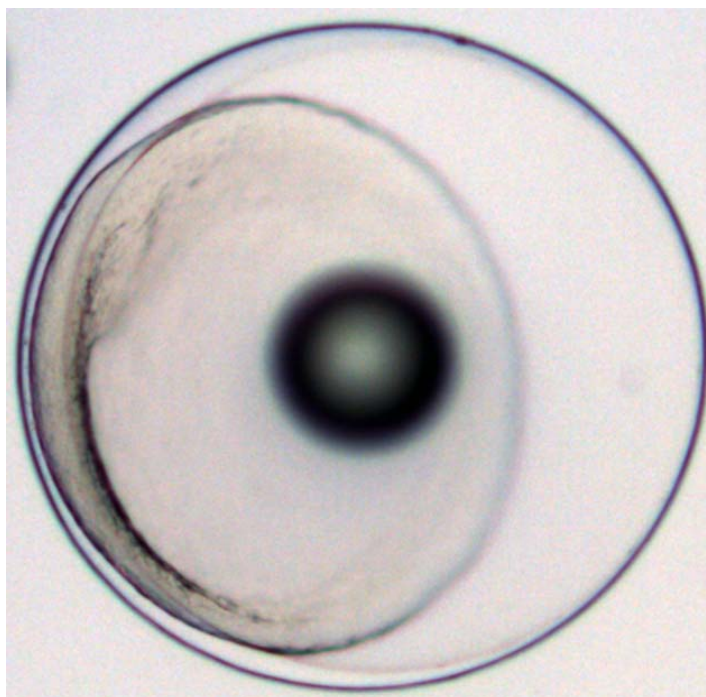
Το στάδιο της γαστριδίωσης (gastrula) στο μυτάκι ξεκίνησε 9h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 7h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 23.17% και 23.44% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, ως προ-πρώιμο γαστρίδιο (pre-early gastrula) (Εικόνα 3.10). Γενικά, το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες και κατευθυνόμενες μετακινήσεις κυττάρων. Τα κύτταρα του ζωικού πόλου κινούνται και εξαπλώνονται πάνω από τα κύτταρα του φυτικού πόλου (επιβολή-eriboly), ενώ τα κύτταρα του φυτικού πόλου διεισδύουν μέσα στον βλαστοπόρο. Η μετακίνηση των κυττάρων είναι ένα πολύ σημαντικό γεγονός και για το λόγο αυτό παρατηρείται εκτεταμένα σε όλες τις οντογενετικές μελέτες, ενώ



περιγράφεται σύμφωνα με το ποσοστό κάλυψης (σε κλάσματα) της επιφάνειας της λεκίθου από τα κύτταρα του εμβρύου.

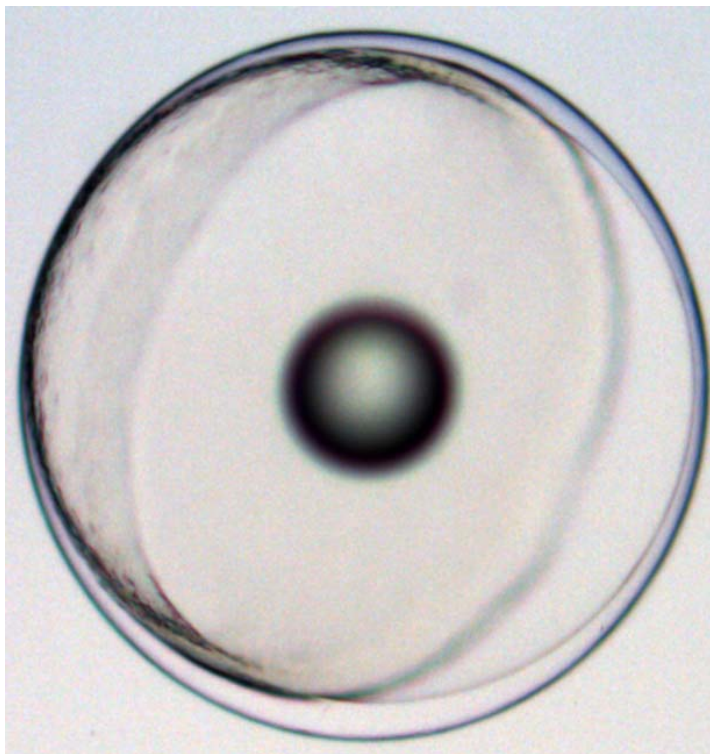


**Εικόνα 3.10** Γαστρίδιο, στην προ-πρώιμη φάση, του *D. puntazzo*.



**Εικόνα 3.11** Γαστρίδιο, στην πρώιμη φάση ή 1/4 επιβολή, του *D. puntazzo*.

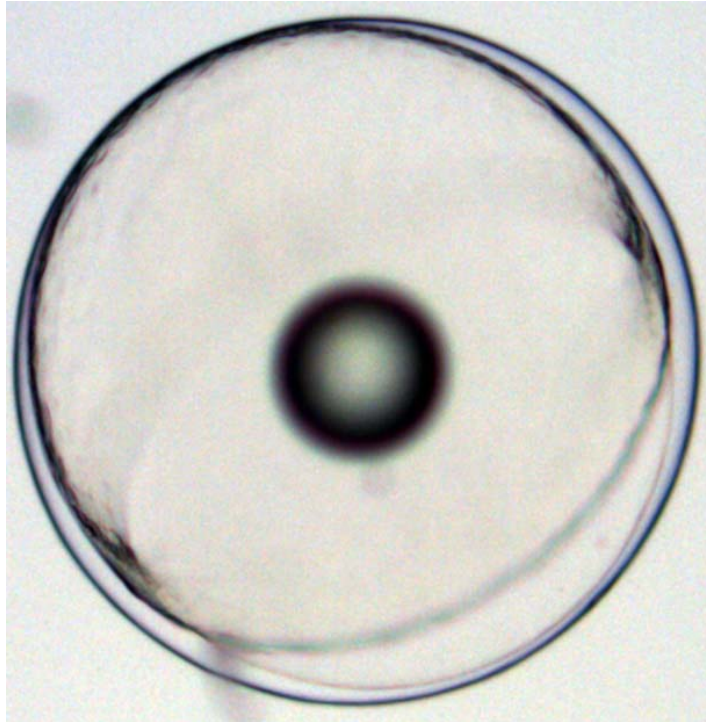
Το πρώτο στάδιο της επιβολής (πρώιμο γαστρίδιο ή early gastrula) εντοπίστηκε 12h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 9h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 30.49% και 29.69% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, όταν το βλαστόδερμα είχε καλύψει το 1/4 της λεκίθου (**Εικόνα 3.11**).



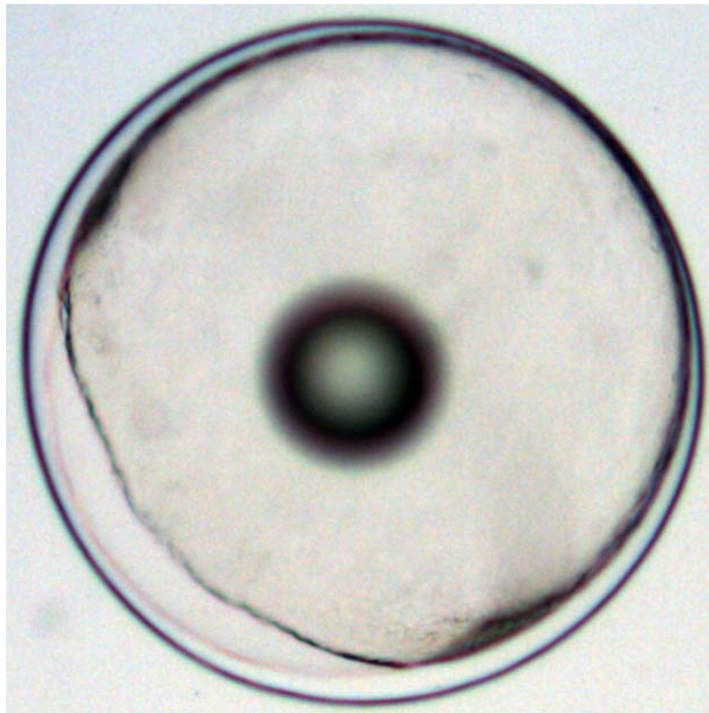
**Εικόνα 3.12** Γαστρίδιο, στην προ-μέσο φάση ή 1/3 επιβολή, του *D. puntazzo*.

Το δεύτερο στάδιο της επιβολής που ονομάζεται προ-μεσο γαστρίδιο (pre-middle gastrula) όπου το βλαστόδερμα έχει καλύψει το 1/3 της λεκίθου, στο μυτάκι εντοπίστηκε 14h Μ.Γ. για τους 21°C και 10h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 34.15% και 32.81% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα (**Εικόνα 3.12**). Σε χρόνο 15h Μ.Γ. για τους 21°C και 11h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 36.59% και 35.94% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, εντοπίστηκε η 1/2 επιβολή ή μέσω γαστρίδιο (middle gastrula) (**Εικόνα 3.13**). Το τέταρτο στάδιο της επιβολής (επιβολή 3/4) ή ύστερο γαστρίδιο (late gastrula) που σηματοδοτεί και τη λήξη του γαστριδίου στο μυτάκι εντοπίσθηκε 15h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 12h Μ.Γ. για τους 24°C ή 37.80% και 37.50% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα (**Εικόνα 3.14**).

Ο σχηματισμός του βλαστοπόρου (blastopore) είναι η απαρχή μιας διεργασίας που εγκαθιδρύει και σταθεροποιεί σχέσεις μεταξύ των ομάδων των κυττάρων και του μικροπεριβάλλον του. Κύτταρα που βρίσκονται στο χείλος του βλαστοπόρου επιμηκύνονται και διαφοροποιούν την μορφολογία τους και γίνονται φιαλόμορφα. Έτσι,



**Εικόνα 3.13** Γαστρίδιο, στην μέσο φάση ή 1/2 επιβολή, του *D. puntazzo*.



**Εικόνα 3.14** Γαστρίδιο, στην ύστερη φάση ή 3/4 επιβολή, του *D. puntazzo*.

όταν τα κύτταρα κινούνται μακριά από το βλαστοπόρο στο εσωτερικό της εσοχής του, τότε η κοιλότητα αυτή ονομάζεται αρχέντερο και το άνοιγμα της προς τα έξω είναι ο

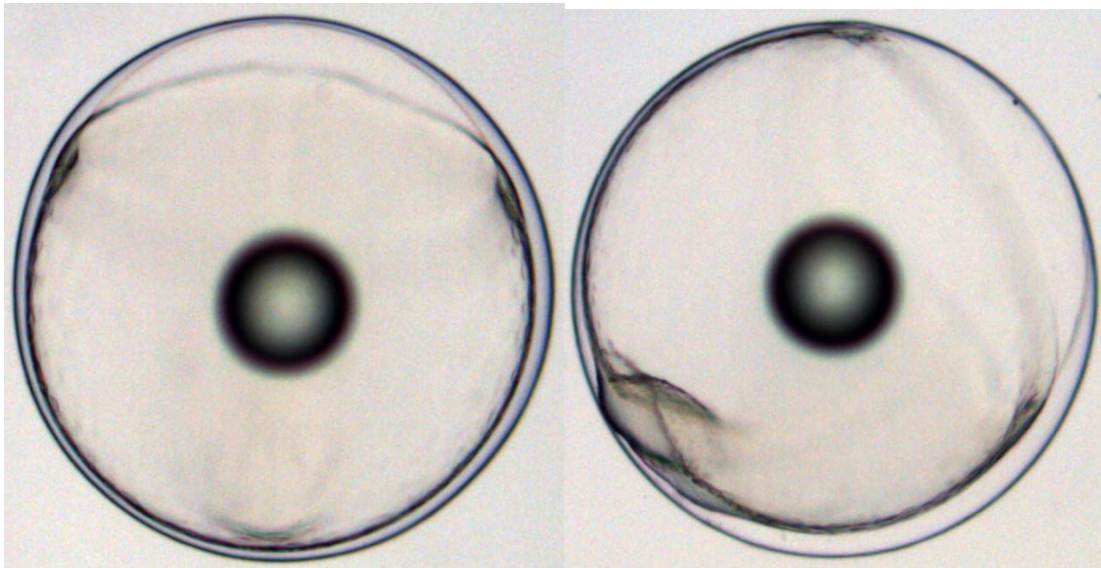


βλαστοπόρος. Τα πρώτα επιφανειακά που εγκολπώνονται και αποτελούν το τυφλό άκρο του αρχεντέρου θα σχηματίσουν το ενδοδερμικό παράγοντα δομών της κεφαλής του (π.χ. φάρυγγα). Όσο βαθιάει η κοιλότητα του αρχεντέρου, τα δυο άκρα του βλαστοπόρου συναντιούνται στο κοιλιακό μέρος του εμβρύου και ο βλαστοπόρος μοιάζει με δαχτυλίδι.

Το αποτέλεσμα των μετακινήσεων είναι η αναδιοργάνωση του εμβρύου όπου θα σχηματιστούν τρεις βλαστικές στοιβάδες (εξώδερμα-μεσόδερμα-ενδόδερμα) των πρωτογενών ιστών του εμβρύου. Αυτές οι κυτταρικές ανακατατάξεις αποτελούν ένα πολύ κρίσιμο σημείο στην ανάπτυξη του εμβρύου μιας και η μετέπειτα μορφογένεση του οργανισμού εξαρτάται από τον επιτυχή σχηματισμό των βλαστικών αυτών στοιβάδων.

### **Νευρίδιο**

Η έναρξη της νευριδίωσης σηματοδοτείται με την εμφάνιση της νευρικής αύλακας που θα οδηγήσει στην νευρική χορδή. Η νευρική πλάκα έχει σχήμα αχλαδιού, είναι πεπλατυσμένη εμπρός όπου θα σχηματίσει τον εγκέφαλο και στενότερη οπίσθια όπου θα σχηματίσει τον νωτιαίο μυελό. Σταδιακά τα άκρα ανασηκώνονται και σχηματίζουν τον νευρικό σωλήνα.



**Εικόνα 3.15** Νευρίδιο, στην πρώιμη φάση, του *D. pulex*.



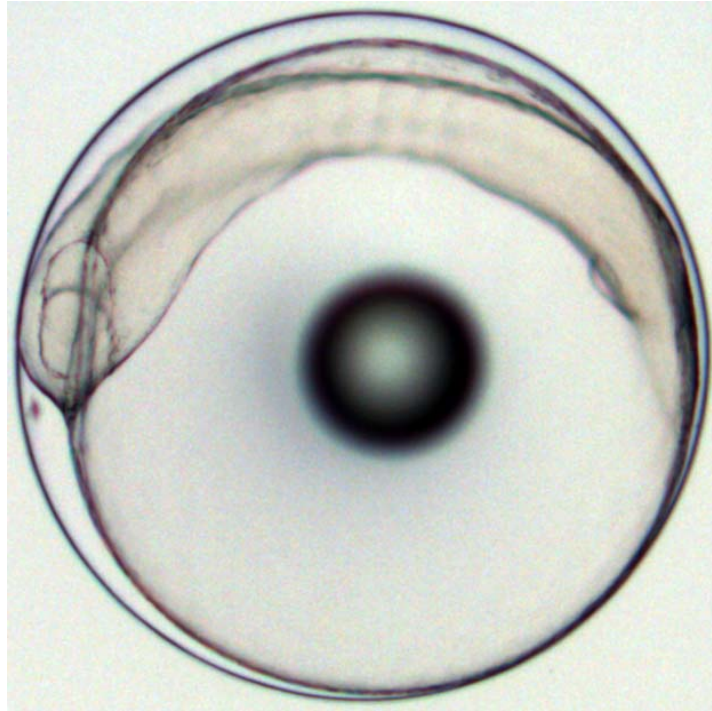
Χρονικά το πρώιμο νευρίδιο (early neurula) στο μυτάκι παρατηρήθηκε 16h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 13h Μ.Γ. για τους 24°C ή 40.24% και 40.63% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα (**Εικόνα 3.15**). Το σωματίδιο του Kurpfer, που εντοπίζεται στο νωτιαίο και οπίσθιο μέρος του σώματος με μορφή φυσαλίδα, σχηματίστηκε 17h Μ.Γ. για τους 21°C και 13h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 41.46% και 42.19% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα. Λίγο πριν κλίσει ο βλαστοπόρος αρχίζει και σχηματίζονται οι σωμίτες χωρίς όμως να φαίνονται καθαρά. Ουσιαστικά, στα πλάγια της νωτοχορδής το μεσόδερμα διατάσσεται κατά στοιβάδες. Η διάτμηση αυτού του μεσοδέρματος δημιουργεί τους σωμίτες (somites), που είναι πλάκες οι οποίες αργότερα θα σχηματίσουν μέρος του σκελετού, των μυών, και την ράχη του κορμού. Ο βλαστοπόρος έκλεισε σε χρόνο 18h Μ.Γ. για τους 21°C και 14h Μ.Γ. για τους 24°C ή 43.90% και 43.75% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα.



**Εικόνα 3.16** Νευρίδιο, στην ύστερη φάση, του *D. punctazzo*.

### **Οργανογένεση εμβρύου**

Από την έναρξη της οργανογένεσης του εμβρύου έως την εκκόλαψη λαμβάνουν χώρα σχηματισμοί δομών και οργάνων (για αυτό και ο χαρακτηρισμός οργανογένεση) που θα οδηγήσουν στην τελική μορφοποίηση του εμβρύου. Ο σχηματισμός των σωματιών και η εκτενής παρατήρησή τους έχει προσφέρει στήριγμα στο βήμα προς βήμα χαρακτηρισμό του σταδίου. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται πλευρικά του νευρικού σωλήνα το

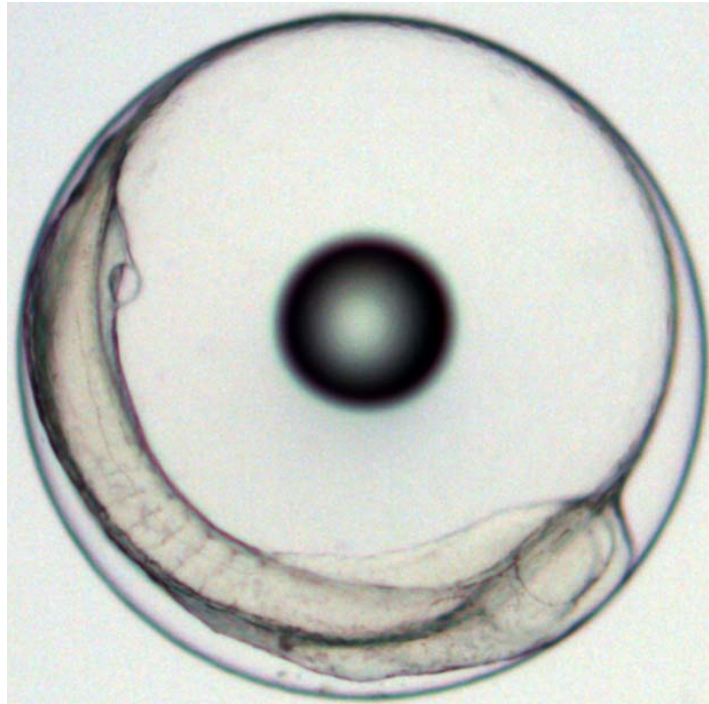


**Εικόνα 3.17** Οργανογένεση, στη φάση των 4 σωματιών, του *D. punctazzo*.

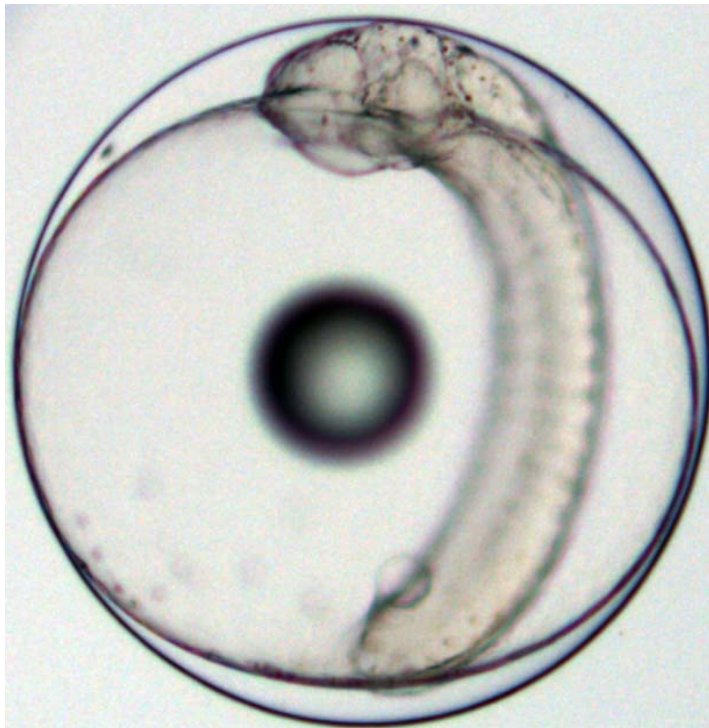
μεσόδερμα να σχίζεται σε δυο πέταλα, το πλησιέστερο προς το εξώδερμα και το άλλο προς το ενδόδερμα, όπου αυτά μεταξύ τους θα σχηματίσουν την σωματική κοιλότητα. Μάλιστα στο πρώτο σημείο της σωματικής κοιλότητας που σχηματίζεται θα σχηματιστεί και η καρδιά. Ακόμη καθώς το έμβryo επιμηκύνεται ένας κυτταρικός πληθυσμός οι νευρικές κρηπίδες, αρχίζει να μεταναστεύει σε διάφορα σημεία του εμβρύου για να διαμορφωθεί σε χρωματοφόρα, συνδετικός ιστός, και μέρη του κρανίου.

Σε χρόνο 18h και 30min M.Γ. για τους 21°C και 14h και 30min M.Γ. για τους 24°C ή 45.12% και 45.31% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, σχηματίστηκαν οι πρώτοι 2 σωματίτες, ενώ 19h και 30min M.Γ. για τους 21°C και 15h και 30min M.Γ. για τους 24°C ή 47.56% και 48.44% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, ο αριθμός τους έφτασε τους 4 (**Εικόνα 3.17**). Ταυτόχρονα το μήκος του εμβρύου διαρκώς μεγάλωνε για να φτάσει να καλύψει το 1/2 της περιφέρειας του αυγού 20h και 30min M.Γ. για τους 21°C και 16h M.Γ. για τους 24°C ή 50% RT<sub>i</sub> και για τις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες (στον ίδιο χρόνο οι σωματίτες έγιναν 6) (**Εικόνα 3.18**). Στο μεσαίο και οπίσθιο τμήμα του σώματος του εμβρύου στο μυτάκι και σε χρόνο 21h και 30min M.Γ. για τους 21°C και 16h και 30min M.Γ. για τους 24°C ή 52.44% και 51.56% RT<sub>i</sub>

αντίστοιχα, ήταν πλέον ορατοί 8 σωματίτες, ενώ μια ώρα μετά και στις δυο θερμοκρασίες οι σωματίτες αυξήθηκαν στον αριθμό τους σε 10 με 11 (Εικόνα 3.19).



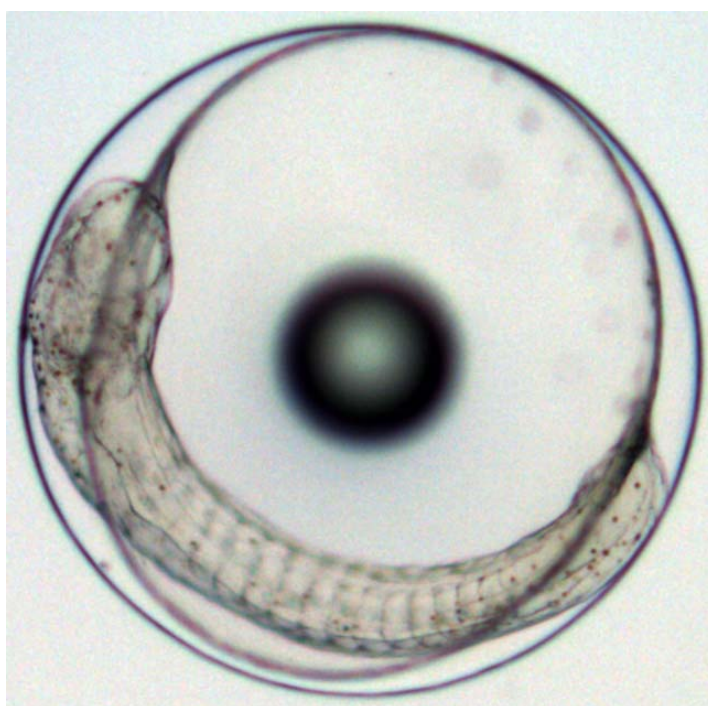
**Εικόνα 3.18** Οργανογένεση, στη φάση των 6 σωματιών, του *D. puntazzo*.



**Εικόνα 3.19** Οργανογένεση, στη φάση των 10 σωματιών, του *D. puntazzo*.



Τα πρώτα χρωματοφόρα εντοπίστηκαν στο στάδιο των 8 σωματιών στο πρόσθιο τμήμα του σώματος και συγκεκριμένα στη ραχιαία περιοχή της κεφαλής. Όταν μετρήθηκαν 12 σωματίτες, τον ίδιο χρόνο άρχισε να σχηματίζεται και η καρδιά (23h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 18h Μ.Γ. για τους 24°C ή 57.32% και 56.25% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα), χωρίς όμως να είναι λειτουργική. Μισή ώρα μετά οι σωματίτες μετρήθηκαν σε αριθμό 14 (**Εικόνα 3.20**). Ο σχηματισμός της πρωτογενούς περιφερειακής πτερυγιοπτυχής (primordial marginal fin fold), εντοπίσθηκε 25h Μ.Γ. για τους 21°C και 19h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 60.98% και 60.94% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα (σε αυτό το χρόνο ο αριθμός των σωματιών έφτασε τους 16).



**Εικόνα 3.20** Οργανογένεση, στη φάση των 14 σωματιών, του *D. puntazzo*.

Καθώς ο αριθμός σωματιών αυξάνεται, ο όγκος της λεκίθου μειώνεται καλύπτοντας τις ενεργειακές ανάγκες του εμβρύου (η λέκιθος αποτελεί την πρώτη δεξαμενή ενεργειακών αποθεμάτων του εμβρύου). Τη στιγμή που το έμβρυο καλύψει τα 2/3 της περιφέρειας του αυγού σε χρόνο 26h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 20h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 64.63% και 64.06% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, ο σχηματισμός οπτικών φακών λαμβάνει χώρα (σε αυτό το χρόνο ο αριθμός των σωματιών έφτασε τους 18) (**Εικόνα 3.21**). Το μοντέλο του χρωματισμού έχει πλέον αλλάξει, με τα χρωματοφόρα να εντοπίζονται και στο

οπίσθιο τμήμα του κορμού, ενώ στην πρόσθια περιοχή και στην οπίσθια των οφθαλμών εντοπίζεται συγκέντρωση αρκετών χρωματοφόρων.

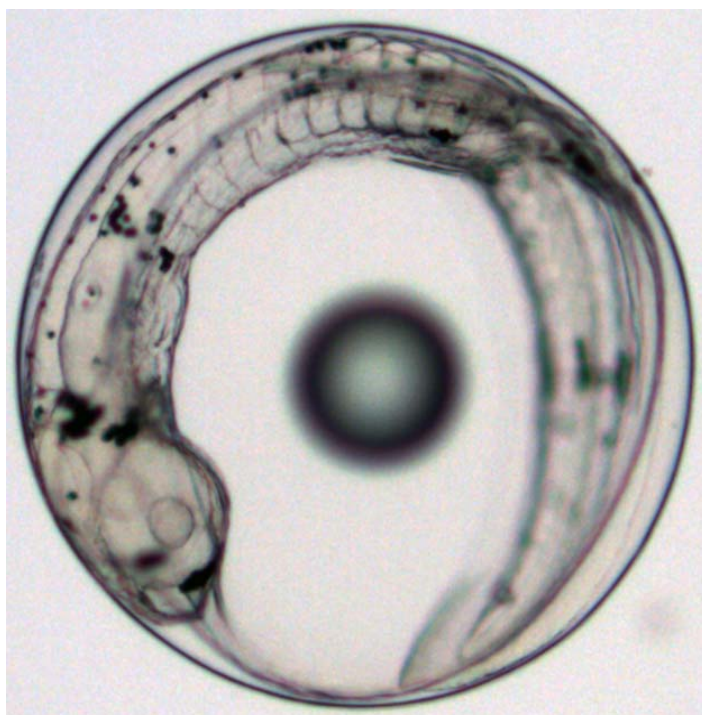


**Εικόνα 3.21** Οργανογένεση, στη φάση των 18 σωματιών, του *D. punctata*.



**Εικόνα 3.22** Οργανογένεση, στη φάση των 22 σωματιών, του *D. punctata*.

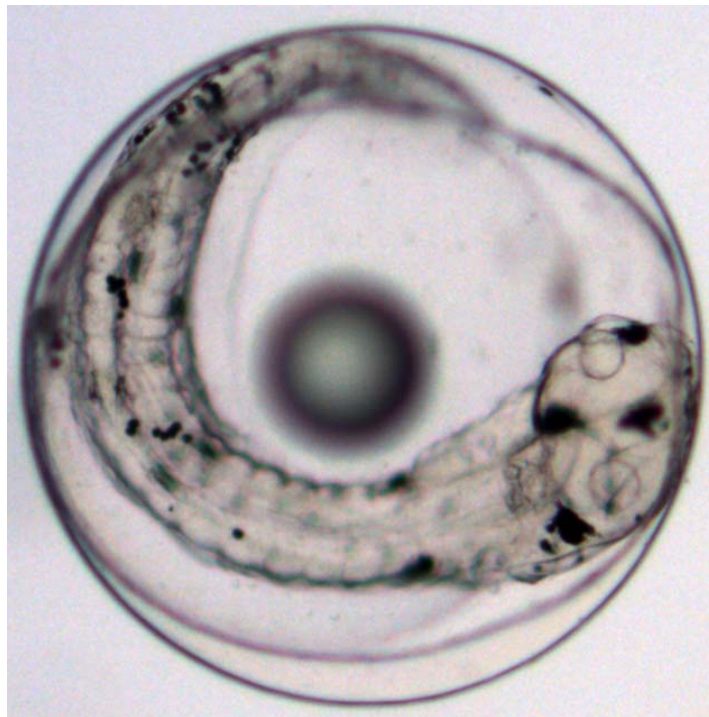
Ενώ το σωματίδιο του Kupffer έχει πλέον εξαφανιστεί η οργανογένεση αυτής της αναπτυξιακής φάσης περιλαμβάνει την εμφάνιση των ωτόλιθων σε χρόνο 28h Μ.Γ. για τους 21°C και 21h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 68.29% και 67.19% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα (20 σωματίτες μετρήθηκαν στο χρόνο αυτό). Στον ίδιο αναπτυξιακό χρόνο κάνουν την εμφάνιση τους και τα ακουστικά κυστίδια (πίσω από τους οφθαλμούς), και η στοματική κοιλότητα στην περιοχή του ρύγχους. Σε επόμενο στάδιο και σε χρόνο ίσο με 28h και 30min Μ.Γ. για τους 21°C και 22h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 69.51% και 70.31% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, οι σωματίτες έχουν φτάσει τους 22 ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αποκόλληση του ουραίου πτερυγίου από τον λεκιθικό σάκο (**Εικόνα 3.22**). Σε αυτή τη φάση, οι οπτικοί φακοί έχουν σχηματιστεί καλά. Η καρδιά, δομικά και λειτουργικά έχει ολοκληρωθεί (αρχίζουμε να έχουμε και τους πρώτους παλμούς). Τέλος, ο όγκος της λεκίθου έχει μικρύνει αισθητά.



**Εικόνα 3.23** Οργανογένεση, 3/4 κάλυψη της περιφέρειας, του *D. puntazzo*.



Όταν το μήκος του εμβρύου κάλυψε τα 3/4 της περιφέρειας του αυγού, εντοπίσθηκε σπασμωδική κίνηση του ατόμου μέσα στο αυγό (34h Μ.Γ. για τους 21°C και 26h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 82.93% και 82.81% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα) (Εικόνα 3.23). Στον ίδιο χρόνο, συγκέντρωση χρωματοφόρων παρατηρήθηκε στην οπίσθια περιοχή των ωτόλιθων, ενώ μια ώρα αργότερα χρωματοφόρα κύτταρα εντοπίζονται κοντά στο ουραίο άκρο. Σε χρόνο 39h Μ.Γ. για τους 21°C και 30h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 95.12% και 95.31% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, το έμβρυο του μυτακιού κάλυπτε όλη την περιφέρεια του αυγού, η κεφαλή του εμφανίστηκε υπερβολικά αναπτυγμένη, ενώ ταυτόχρονα όσο αφορά την κίνησή του εμφανίστηκε πολύ δραστήριο, με το έμβρυο να πραγματοποιεί ολόκληρες περιστροφές γύρω από τον εαυτό του. Στο σημείο αυτό η οργανογένεση έχει ολοκληρωθεί (Εικόνα 3.24).

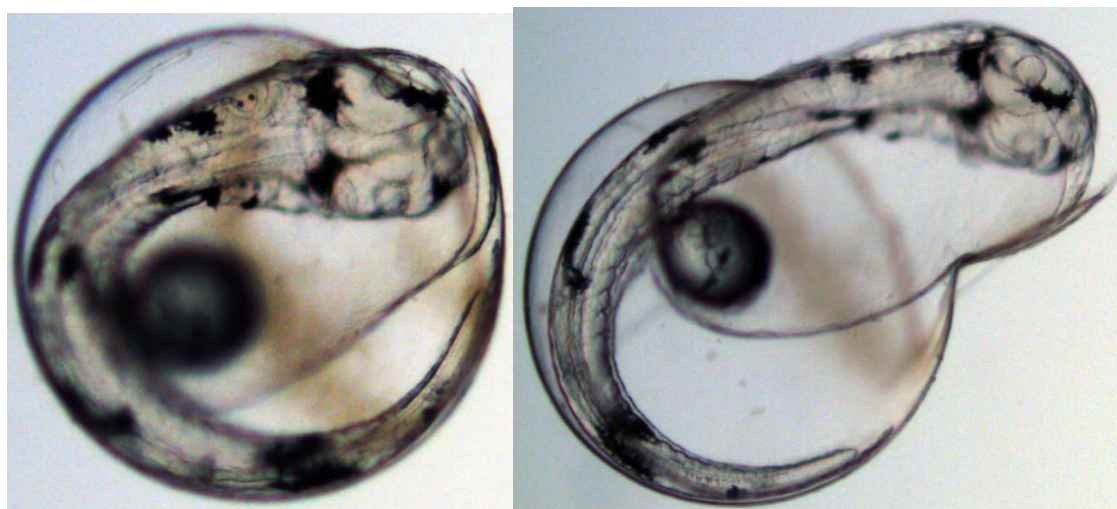


**Εικόνα 3.24** Οργανογένεση, πολύ δραστήριο έμβρυο, του *D. puntazzo*.

### **Εκκόλαψη**

Σε αναπτυξιακό χρόνο 40h Μ.Γ. και 30min για τους 21°C και 31h και 30min Μ.Γ. για τους 24°C ή 98.78% και 98.44% RT<sub>i</sub> αντίστοιχα, παρατηρήθηκε η εκκόλαψη των πρώτων αυγών στο μυτάκι. Το έμβρυο εξέρχεται του αυγού με την δράση ειδικών αδενικών κυττάρων, τα οποία βρίσκονται στην κεφαλή του και εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Αυτά συντελούν στην τοπική διάλυση του χορίου (chorionic membrane), και με

παλλόμενες κινήσεις της κεφαλής ανοίγει η έξοδος από την οποία θα ελευθερωθεί η λεκιθοφόρα νύμφη. Μισή ώρα μετά και για τις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες (41h Μ.Γ. και 32h Μ.Γ. για τους 21°C και τους 24°C αντίστοιχα), είχαν εκκολαφθεί το 50% του συνόλου των αυγών (χρόνος εκκόλαψης) ([Εικόνα 3.25](#)).

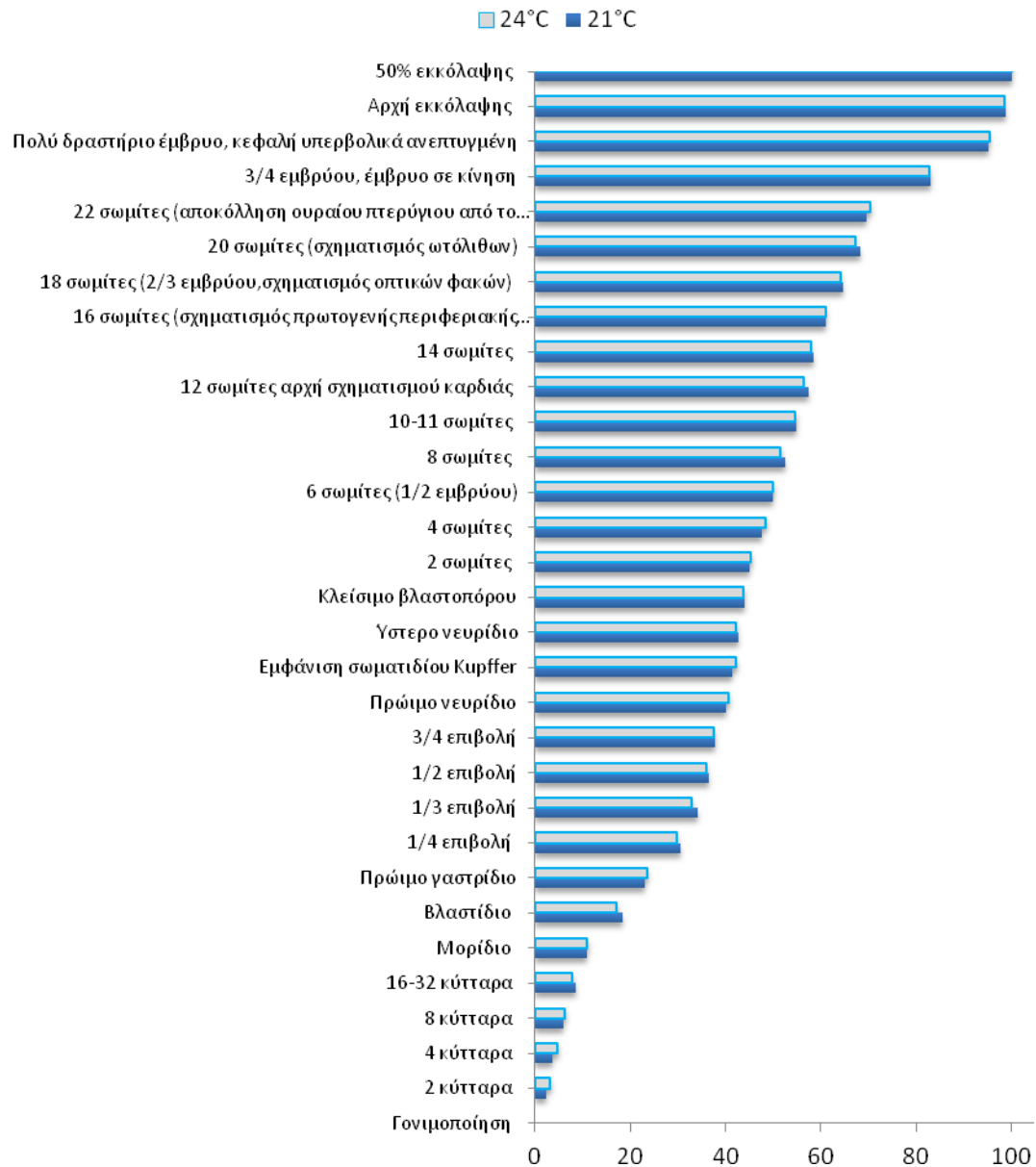


[Εικόνα 3.25](#) Εκκόλαψη, του *D. puntazzo*.

Λίγο πριν την εκκόλαψη, ο αριθμός των σωματιών δεν φάνηκε να αλλάζει (22 σωματίτες), ενώ ο όγκος του λεκιθικού σάκου περιορίζεται στο πρόσθιο μισό του σώματος, μέχρι και την έδρα, αφήνοντας ελεύθερο το υπόλοιπο σώμα. Από την άλλη, το πρότυπο κατανομής των χρωματοφόρων λίγο πριν την εκκόλαψη συμπεριλαμβάνει μεγάλες συγκεντρώσεις κυττάρων στις περιοχές προσθίως και οπισθίως των οφθαλμών, οπισθίως των ωτόλιθων, ραχιαία και κοιλιακά στον κορμό του σώματος στο ύψος του 5-6<sup>ου</sup> σωματίτη (στην περιοχή κοντά στην έδρα), στο ύψος του 12-13<sup>ου</sup> σωματίτη και στο ύψος του 17-18<sup>ου</sup> σωματίτη. Αυτή η χωροθέτηση των χρωματοφόρων κυττάρων θα παραμείνει σταθερή μέχρι και την εκκόλαψη του εμβρύου.

Η εμβρυακή ανάπτυξη στο μυτάκι σε σχέση με το σχετικό χρόνο RT<sub>i</sub> και για τις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες (21 και 24°C) αποτυπώνεται στην [Εικόνα 3.26](#).

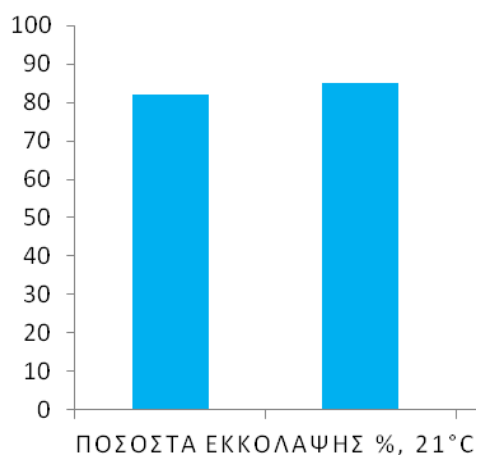




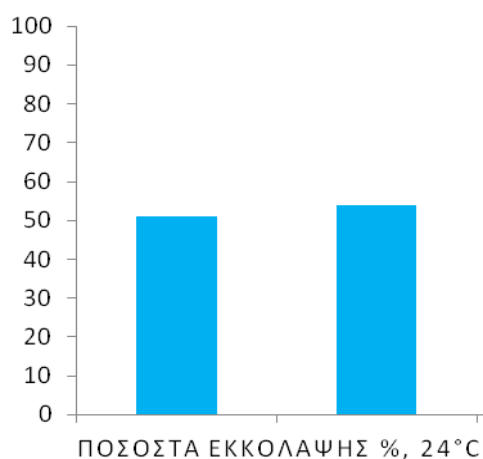
**Εικόνα 3.26** Γράφημα της εμβρυακής ανάπτυξης του *D. puntazzo* σε σχέση με το σχετικό χρόνο RT<sub>i</sub> και για τις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες (21 και 24°C).

### 3.3 Ποσοστά επιβίωση

Η εκτίμηση του αριθμού των λεκιθοφόρων νυμφών αμέσως μετά την ολοκλήρωση της εκκόλαψης για κάθε ενυδρείο χωριστά και σε κάθε πειραματική θερμοκρασία έδειξε ότι, τα ποσοστά εκκόλαψης κυμάνθηκαν από 82, 85, 91% για τους 21°C (Εικόνα 3.27) έως 51, 54, 55 στους 24°C (Εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.27 Ποσοστά εκκόλαψης (% στο σύνολο των αυγών) του *D. pumtazzo* στους 21°C.



Εικόνα 3.28 Ποσοστά εκκόλαψης (% στο σύνολο των αυγών) του *D. pumtazzo* στους 24°C.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---



#### 4.1 Οντογένεση

Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε την ανάπτυξη του εμβρυακού σταδίου του κοινού είδους μυτάκι (*Diplodus puntazzo*). Όπως πολλές μελέτες έχουν παρουσιάσει, η περίοδος ωοτοκίας αυτού του είδους επεκτείνεται από το Σεπτέμβριο μέχρι τον Νοέμβριο, με μια βέλτιστη θερμοκρασία τους  $21\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Αυτός είναι και ο λόγος για την επιλεγμένη πειραματική περίοδο και θερμοκρασία. Είναι δύσκολο να προσδιοριστούν διαφορές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αυγών του μυτακιού με αυτά των υπόλοιπων ειδών της οικογένειας Sparidae, όπως της τσιπούρας *Sparus aurata*, του σπάρου *Diplodus annularis*, της συναγρίδας *Dentex dentex*, του φαγκριού *Pagrus pagrus*, του λιθρινιού *Pagellus erythrinus* (Divanach, 1985 - Kentouri, 1985 - Polo *et al.*, 1991 - Fernandez Palacios *et al.*, 1994 - Jug Dujakovic *et al.*, 1995 - Michelakakis *et al.*, 2001 - Κλημογιάννη, 2004).

Συγκεκριμένα, οι τιμές των μορφομετρικών χαρακτήρων των αυγών στο μυτάκι βρίσκονται εντός του εύρους διακύμανσης των μελετημένων ειδών της οικογένειας των Sparidae, με τη διάμετρο του αυγού και της σταγόνας των λιπιδίων να τοποθετούνται πολύ κοντά σε αυτά του λιθρινιού, σαργού, και της μουρμούρας, κατατάσσοντάς τα στη χαμηλότερη κλίμακα μεγέθους (Πίνακας 4.1).

Γενικά, η διάμετρος των αυγών, το σχήμα τους, η σύσταση και ο χρωματισμός της λεκίθου, ο αριθμός και το μέγεθος των σταγόνων λιπιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στη συστηματική τους ταξινόμηση (Hempel, 1984). Επειδή όμως το μέγεθος του αυγού μπορεί να επηρεαστεί από βιολογικούς (ηλικία και μέγεθος γεννητόρων, ιστορικό γεννητόρων), γενετικούς (κληρονομικότητα, γενεαλογικές σχέσεις), χωρο-χρονικούς (γεωγραφική κατανομή, εποχικότητα), περιβαλλοντικούς (θερμοκρασία, αλατότητα, οξυγόνο, ρύπανση) και διαχειριστικούς παραμέτρους (συγκέντρωση αυγών στην επώαση, μηχανικό στρες (Chambers and Trippel, 1997), δύσκολα προσδίδεται στο χαρακτήρα αυτό υψηλή ταξινομική αξία. Μόνο όταν η επίδραση των παραπάνω παραγόντων είναι σαφής και διακριτή, το μέγεθος των αυγών αποκτά συστηματική αξία (Blaxter and Hempel, 1963 - Chambers *et al.*, 1989). Έτσι, μόνο θεωρητικά η διάμετρος των αυγών μπορεί να προσδιορίζει τα είδη Sparidae, επειδή στην πράξη το μέγεθος των αυγών μπορεί να διαφέρει ακόμη και μεταξύ των θηλυκών του ίδιου είδους, ενώ φαίνεται πάρα πολύ εξαρτώμενο και από την ηλικία, τον χρόνο ωοτοκίας, τη γεωγραφική προέλευση και τη διατροφή (Kjorvik *et al.*, 1990).

**Πίνακας 4.1** Χαρακτηριστικές διαστάσεις των αυγών ειδών της οικογένειας Sparidae.

Είδη	Διάμετρος αυγών (mm)	Διάμετρος σταγόνας λιπιδίου (mm)	Αναφορά
<i>Sparus aurata</i>	0.92-1.04	0.18-0.26	Kentouri, 1985
<i>Diplodus annularis</i>	0.71-0.81	0.18-0.22	Divanach, 1985
<i>Diplodus sargus</i>	0.90-1.16	0.18-0.26	Divanach, 1985
<i>Diplodus vulgaris</i>	0.88-1.04	0.18-0.26	Divanach, 1985
<i>Dentex dentex</i>	0.94-0.96	0.19-0.21	Jug-Dujakovic <i>et al.</i> , 1995
<i>Dentex gibbosus</i>	0.94-0.98	0.18	Fernandez-Palacios <i>et al.</i> , 1994
<i>Lithognathus mormyrus</i>	0.70-0.82	0.16-0.22	Kentouri, 1985
<i>Pagrus pagrus</i>	0.99-1.09	0.24	Mihelakakis <i>et al.</i> , 2001
<i>Pagellus erythrinus</i>	0.74-0.80	0.18-0.19	Κλημογιάννη, 2004
<i>Diplodus puntazzo</i>	0.85-0.89	0.22-0.25	

Η εξέλιξη της εμβρυακής ανάπτυξης του μυτακιού ακολουθεί σε γενικές γραμμές το μοντέλο εξέλιξης των ειδών της οικογένειας των *Sparidae* όπου τόσο οι χρόνοι (εκφρασμένοι ως επί της εκατό ποσοστά της ολικής διάρκειας του εμβρυακού σταδίου, RT<sub>i</sub>) εκδήλωσης των διαφόρων αναπτυξιακών γεγονότων όσο και η σειρά εμφάνισης των χαρακτήρων, παρουσιάζουν ουσιαστικές ομοιότητες με την αντίστοιχη χρονολογική και μορφολογική διαδοχή των υπολοίπων μελετημένων ειδών της οικογένειας αυτής (Divanach, 1985 - Κουμουνδούρος, 1993 - Κουμουνδούρος, 1998 - Κλημογιάννη, 2004).

Κατά τη μελέτη του εμβρυακού σταδίου του μυτακιού, δεν εμφανίζονται αυγά με τη μορφολογία τους να διαφέρει από αυτή του συνόλου των δειγμάτων. Η έλλειψη μορφολογικών αποκλίσεων (ή μορφολογικές ανωμαλίες) στην παρούσα μελέτη μπορεί και να είναι τυχαίο γεγονός λόγω της θνησιμότητας αυτών των αυγών και της απομάκρυνσής τους από το σύνολο των υγείων (αυγά με μορφολογικές ανωμαλίες δεν εξελίσσονται σε όλη τη διάρκεια του εμβρυακού σταδίου, γρήγορα πεθαίνουν και απομακρύνονται από τα υπόλοιπα μιας και χάνουν την πλευστότητά τους).

Γενικά, η καταγραφή μορφολογικών ανωμαλιών και η προσπάθεια προσέγγισης των γενεσιουργών παραγόντων, ειδικότερα του εμβρυακού σταδίου, έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών. Η ασυμμετρία των πρώτων εμβρυακών κυττάρων ή πρώιμων βλαστομερών (Devauchelle *et al.*, 1998), η έλλειψη διαφάνειας της λεκίθου (Dinis, 1982 - McEvoγ, 1984), η αυξημένη παρουσία μελανοφόρων (Craig, 1985), το μεγαλύτερο μέγεθος του περιλεκιθικού χώρου και οι αλλαγές της διαμέτρου των αυγών μετά τη γονιμοποίηση (Kjorsvik *et al.*, 1984 - Sakai *et al.*, 1985) έχουν παρατηρηθεί σε αρκετά είδη ψαριών. Έχει παρατηρηθεί ότι, όσο πιο πρώιμη χρονικά είναι η έκθεση κάτω από συγκεκριμένο ανασταλτικό παράγοντα τόσο πιο καθοριστική εμφανίζεται η επίδρασή του στη μετέπειτα ανάπτυξη του εμβρύου (Kjorsvik *et al.*, 1990). Γεγονός επίσης είναι ότι, από τα ποσοστά γονιμοποίησης μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για την ποιότητα των αυγών (Kjorsvik *et al.*, 1990), χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η καλή ποιότητα συνδέεται πάντα και με υψηλά ποσοστά επιβίωσης στα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια.

## 4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της οντογενετικής μελέτης των πειραματικών πληθυσμών του μυτακιού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τόσο του απόλυτου (ώρες μετά τη γονιμοποίηση), όσο και του σχετικού χρόνου  $RT_i$  (% ποσοστό της ολικής διάρκειας). Η αξία της χρήσης του σχετικού χρόνου κατά την επίδραση διαφόρων παραγόντων στην εμβρυακή οντογένεση των πληθυσμών, έχει φανεί σε αρκετές μελέτες ειδών ψαριών, συμπεριλαμβανομένων των *Sparidae*, μιας και διευκολύνει τη μεταξύ τους σύγκριση (Divanach, 1985 - Koumoundouros *et al.*, 2001 - Κλημογιάννη, 2004). Πρέπει να σημειωθεί ότι, η μελέτη της οντογένεσης ως προς τη καταγραφή των χρόνων εμφάνισης των αναπτυξιακών γεγονότων παρουσιάζει μια σχετικότητα στην ακρίβειά του, μιας και τα διάφορα γεγονότα δεν εκδηλώνονται ταυτόχρονα σε όλα τα άτομα του εκάστοτε πληθυσμού. Για το λόγο αυτό, η εκάστοτε οριοθέτηση των σταδίων του εμβρυακού πραγματοποιήθηκε με τη λογική της ταυτόχρονης εκδήλωσης στο 50% του πληθυσμού.

Η εμβρυακή ανάπτυξη των πειραματικών πληθυσμών του μυτακιού, όσο αφορά το σχετικό χρόνο  $RT_i$  σχηματισμού των διαφόρων μορφολογικών χαρακτήρων, εμφανίζεται σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η υψηλή δειγματοληπτική συχνότητα σε συνδυασμό με το μεγάλο μέγεθος των δειγμάτων ενισχύουν την πιστότητα της ακρίβειας των αποτελεσμάτων. Αντίθετα, η διάρκεια των σταδίων εμφανίζεται διαφοροποιημένη με τη θερμοκρασία όταν ο χρόνος εκφράζεται με τις απόλυτες τιμές του (Polo *et al.*, 1991).

Στη παρούσα εργασία διαπιστώνεται ότι η διάρκεια του εμβρυακού σταδίου του μυτακιού μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που ενισχύεται και από άλλες μελέτες (Polo *et al.*, 1991 - Conides and Glamuzina, 2001 - Klimogianni *et al.*, 2004). Τα ποσοστά επιβίωσης στο μυτάκι επηρεάστηκαν από την επίδραση της θερμοκρασίας, όπου στους 21°C εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά εκκόλαψης σε σύγκριση με τους 24°C. Αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλα είδη ψαριών έχουν καταλήξει σε παρόμοια συμπεράσματα (Polo *et al.*, 1991 -Watanabe *et al.*, 1995) διαφοροποίησης στα ποσοστά επιβίωσης του εμβρυακού σταδίου των ψαριών.



#### 4.2.1 Από την έρευνα στην εφαρμογή

Πλήθος ερευνητικών εργασιών έχουν αποδείξει τη σπουδαιότητα της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη, την αύξηση, την επιβίωση, την εξωτερική μορφολογία και τη διάρκεια, ανάγοντας την στον κρισιμότερο αβιοτικό παράγοντα της εκτροφής των ψαριών. Τα ποσοστά εκκόλαψης (Rana, 1990) και η χρονική διάρκεια του εμβρυακού σταδίου (Polo *et al.*, 1991) έχουν χρησιμοποιηθεί σαν κριτήρια για τον υπολογισμό των βέλτιστων θερμοκρασιών.

Σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προτείνουν τη θερμοκρασία των 21°C σαν τη καταλληλότερη για το εμβρυακό στάδιο όσο αφορά τα ποσοστά εκκόλαψης (πιο υψηλά), ενώ από τη σκοπιά της χρονικής διάρκειας πιο σύντομη εμφανίζεται η εμβρυακή ανάπτυξη στους 24°C.

Απομένει από τον καλλιεργητή να αξιολογήσει πιο από τα παραπάνω δυο κριτήρια θεωρεί σημαντικότερο στο πρόγραμμα διαχείρισης που εφαρμόζει.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---



Από τη μελέτη της οντογένεσης (ανάπτυξη και αύξηση) του εμβρυακού σταδίου στο μυτάκι και κάτω από την επίδραση της θερμοκρασία, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- 1.** Είναι δύσκολο να προσδιοριστούν διαφορές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αυγών του μυτακιού με αυτά των υπόλοιπων ειδών της οικογένειας Sparidae.
- 2.** Οι τιμές των μορφομετρικών χαρακτήρων των αυγών στο μυτάκι βρίσκονται εντός του εύρους διακύμανσης των μελετημένων ειδών της οικογένειας των Sparidae, με τη διάμετρο του αυγού και της σταγόνας των λιπιδίων να τοποθετούνται πολύ κοντά σε αυτά του λιθρινιού, σαργού, και της μουρμούρας, κατατάσσοντάς τα στη χαμηλότερη κλίμακα μεγέθους.
- 3.** Η εξέλιξη της εμβρυακής ανάπτυξης του μυτακιού ακολουθεί σε γενικές γραμμές το μοντέλο εξέλιξης των ειδών της οικογένειας των Sparidae τόσο ως προς τους σχετικούς χρόνους ( $RT_i$ ) εκδήλωσης των διαφόρων αναπτυξιακών γεγονότων όσο και ως προς τη σειρά εμφάνισης των χαρακτήρων.
- 4.** Η εμβρυακή ανάπτυξη των πειραματικών πληθυσμών στο μυτάκι, αναφορικά με τον σχετικό χρόνο  $RT_i$  σχηματισμού των διαφόρων μορφολογικών χαρακτήρων, εμφανίζεται σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας.
- 5.** Στη παρούσα εργασία διαπιστώνεται ότι η διάρκεια του εμβρυακού σταδίου του μυτακιού μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.
- 6.** Τα ποσοστά επιβίωσης στο μυτάκι επηρεάστηκαν από την επίδραση της θερμοκρασίας, όπου οι  $21^{\circ}\text{C}$  εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά εκκόλαψης σε σύγκριση με τους  $24^{\circ}\text{C}$ .



**ABSTRACT / ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

---





In the present study the embryonic growth and development under two different temperature conditions of common sharpnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777), are described. This species is a rudimentary hermaphrodite fish with partial protandry. The spawning period extend from September to November, with an optimum temperature at  $21\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . The ontogeny analysis, provide the possibility of identification on critical developmental stages and also can be used as a tool for developmental definition in morpho-anatomic abnormalities. The above mentioned parameters can be used as section criteria of the type cultured manipulations while offer solutions on quality issues of fish production. The aim of the present study was to acquire further knowledge on the embryonic ontogeny of *D. puntazzo* and the effect of temperature, to help both commercial aquaculture and ichthyoplankton studies.

Experiment was performed on October of 2009, with eggs from commercial hatchery of Nireus S.A. Company in Hiliadou Managouli Doridos, Greece. The eggs were collected from captive broodstocks, under natural photoperiod and temperature conditions. With density of 500 eggs  $\text{l}^{-1}$  (17.500 eggs per tank) the eggs were placed in three tanks per temperature ( $21\pm 0.2^{\circ}\text{C}$  και  $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) (triplicate) 35 l water volume each. The egg development of *D. puntazzo* was studied in vivo using a stereoscopic microscope (Leica ICCA), while morphometric character with photographs via digital camera (Leica DM100) adapted at microscope. For that, 25 were sampled every 30 min. Also, estimated the relative time ( $\text{RT}_i$ ) of each developmental event  $i$  as  $\text{RT}_i = (t_i/\text{Tsd}) \times 100$ .

Eggs of *D. puntazzo* are typical sparid eggs whose presented a diameter of  $0.868\pm 0.009$   $\mu\text{m}$  and a wet weight of  $0.349\pm 0.014$  mg, while contain a lipid globule of  $0.237\pm 0.007$   $\mu\text{m}$  diameter. It is difficult to identify morphological characteristics by which the eggs of this species differ from those of *S. aurata*, *D. annularis*, *D. dentex* and *P. erythrinus*. The comparison of the embryonic stage between *D. puntazzo* and the above sparid species showed same ontogenetic pattern, with similar estimated relative time of each developmental event. The embryonic development of this species, as  $\text{RT}_i$  seems to be stable and independent from temperature condition. Also, the duration of embryonic stage reduced with temperature increased (41 and 32 h for 21 and  $24^{\circ}\text{C}$ , respectively). The  $21^{\circ}\text{C}$  observed with higher survival rate than  $24^{\circ}\text{C}$ .

The sharpnout seabream, *Diplodus puntazzo*, has been rearing in Mediterranean aquaculture for more than ten years appearing high levels on survival and growth rate. The next important step is to improve the accuracy on culture manipulation.

Στην παρούσα μελέτη περιγράφηκε η εμβρυακή ανάπτυξη του κοινού είδους μυτάκι (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777), κάτω από δυο θερμοκρασίες. Το είδος αυτό εμφανίζει πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό. Η περίοδος ωοτοκίας του εκτίνεται από το Σεπτέμβριο μέχρι το Νοέμβριο, με βέλτιστη θερμοκρασία τους  $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Η ανάλυση της οντογένεσης προσφέρει τη δυνατότητα αναγνώρισης των κρίσιμων αναπτυξιακών σταδίων, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο για τον αναπτυξιακό ορισμό των μορφο-ανατομικών ανωμαλιών. Οι παραπάνω παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιμέρους κριτήρια επιλογής καλλιεργητικών χειρισμών ενώ προσφέρουν λύσεις στη βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απόκτηση περαιτέρω γνώσεων τόσο της εμβρυακής ανάπτυξης του *D. puntazzo* όσο και της επίδρασης της θερμοκρασίας, ώστε να βοηθηθεί η ιχθυοκαλλιέργεια αλλά και οι ιχθυοπλαγκτονικές μελέτες.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο του 2009, με αυγά από τον ιχθυογεννητικό σταθμό στη Χιλιαδού, Μανάγουλης Δωρίδας, Ελλάδα. Τα αυγά αυτά συλλέχθηκαν από γεννήτορες σε αιχμαλωσία κάτω από συνθήκες φυσικής φωτο και θερμοπεριόδου. Με πυκνότητα 500 αυγά  $\text{l}^{-1}$  (17.500 αυγά ανά δεξαμενή) τα αυγά τοποθετήθηκαν σε τρεις δεξαμενές ανά θερμοκρασία (εις τριπλούν) 35 l ωφέλιμου όγκου. Η ανάπτυξη των αυγών του *D. puntazzo* μελετήθηκε in vivo χρησιμοποιώντας στερεοσκόπιο (Leica ICCA), ενώ οι μορφομετρικοί χαρακτήρες με φωτογραφίες από ψηφιακή κάμερα (Leica DM100) προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο. Για αυτό, 25 αυγά παίρνονταν κάθε 30 min. Επίσης, υπολογίστηκε ο σχετικός χρόνος των αναπτυξιακών γεγονότων ως  $RT_i = (t_i/T_{sd}) \times 100$ .

Τα αυγά του *D. puntazzo* είναι τυπικά αυγά της οικ. Sparidae, με διάμετρο  $0.868 \pm 0.009$   $\mu\text{m}$  και νωπό βάρος  $0.349 \pm 0.014$  mg, με σταγόνα λιπιδίων διαμέτρου  $0.237 \pm 0.007$   $\mu\text{m}$ . Είναι δύσκολο να προσδιορισθούν μορφολογικοί χαρακτήρες διαφορετικοί από αυτούς των *S. aurata*, *D. annularis*, *D. dentex* and *P. erythrinus*. Σύγκριση του εμβρυακού μεταξύ του *D. puntazzo* και των υπολοίπων σπαροειδών έδειξε όμοιο οντογενετικό μοντέλο, με παρόμοιους σχετικούς χρόνους εμφάνισης των αναπτυξιακών γεγονότων. Η εμβρυακή ανάπτυξη, ως  $RT_i$ , φάνηκε να είναι σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας. Η διάρκεια (41 και 32 h στους 21 και  $24^\circ\text{C}$ ) του εμβρυακού σταδίου μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι  $21^\circ\text{C}$  εμφάνισαν υψηλότερη επιβίωση από τους  $24^\circ\text{C}$ .

Το κοινό μυτάκι, *Diplodus puntazzo*, έχει εκτραφεί στη Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια για περισσότερο από δέκα χρόνια με υψηλά επίπεδα επιβίωσης και αναπτυξιακού ρυθμού. Επόμενο σημαντικό βήμα είναι η βελτίωση της ακρίβειας των καλλιεργητικών χειρισμών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---



- Abellan E. and Basurco B., 1999. Options Mediterranean's. No 2 In: Marine Finfish Species Diversification; Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture. C.I.H.E.A.M., Zaragoza, Spain, pp: 1-19.
- Apstein C., 1909. Die Bestimmung des Alters pelagisch lebender Fischeier. Mitt. d. itsch. Fischereiver. 25, 364-373.
- Athanassopoulou F., Prapas T., Rodger H., 1999. Diseases of Puntazzo puntazzo Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. Journal of Fish Diseases J. Fish Dis. Vol. 22, No. 3, 215-218.
- Atkinson D., 1996. Ectotherm life-history responses to developmental temperature. In: (Johnston IA, Bennett AF, eds). Animals and Temperature Phenotypic and Evolutionary Adaptation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 183- 205.
- Atz J.W., 1964. Intersexuality in fishes. In: (Armstrong CN and Marshall AJ, eds). Intersexuality in Vertebrates Including Man. Academic Press, London, pp. 145-232.
- Bagarinao T., 1986. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of three tropical marine fish species rearing in the hatchery. Mar. Biol. 91, 449 - 459.
- Bailey J.E. and Evans D.R., 1971. The low-temperature threshold for pink salmon eggs in relation to a proposed hydroelectric installation. Fishery Bulletin 69, 587-593.
- Barahona Fernandes M.H., 1978. Effect of aeration on the survival and growth of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae: a preliminary study. Aquaculture 14, 67-74.
- Bartholow J. and Coutant C., 1976. Thermal effects on fish ecology. In: Encyclopedia of Environmental Science and Engineering. NY: Gordon and Breach Publishers. pp. 891-896.
- Beccaria C., Diaz J.P., Connes R., Chatain B., 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. Aquaculture 99, 339 - 354
- Benoit H. and Pepin P., 1999. Interaction of rearing temperature and maternal influence on egg development rates and larval size at hatch in yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 785-794.
- Bertolini B., Boglione G., Cataudella S., Finioia M.G., Marino G., Monaco G., 1991. Temperature induced developmental anomalies in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) embryos and larvae. Acta Embryol. Morphol. Exper. 12, 77 - 79.
- Blaxter J.H.S., 1981. The rearing of larval fish. In: Aquarium systems (Hawkins AD, ed), pp. 303-323. Academic Press, New York.
- Blaxter J.H.S., Hempel G., 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus*). J. Con. Int. Explor. Mer 28, 211-240.
- Boglione C., Gagliardi F., Scardi M., Cataudella S., 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L, 1758). Aquaculture 192, 1-22.
- Bolione C., Giganti M., Selmo C., Cataudella S., 2003. Morphoecology in larval fin-fish: a new candidate species for aquaculture, *Diplodus puntazzo* (Sparidae). Aquac. Int., 11: 17-41.
- Bromage N., 1986. The use of photoperiod technique to control the reproduction of farmed fish. In: Trends and Problems in Aquaculture Development (Grimaldi E, Rosenthal H, eds), pp. 121-130. Ente Autonomo Fiere di Verona, Verona.
- Buxton C.O. and Garratt P.A., 1990. Alternative reproductive styles in seabreams (Pisces: Sparidae). Environ. Biol. Fish. 28, 113-124.
- Chambers R.C. and Leggett W.C., 1987. Size and age at metamorphosis in marine fishes: an analysis of laboratory-reared winter flounder (*Pleuronectes americanus*) with a review of variation in other species. Can. J. Aquat. Sci. 44, 1936-1947.
- Chambers R.C., Leggett W.C., Brown J.A., 1989. Egg size, female effects, and the correlations between early life history traits of capelin, *Mallotus villosus*: an appraisal at the individual level. Fish. Bull. U.S. 87, 515-523.
- Chambers R.C., Trippel E.A., 1997. In Early Life History and Recruitment in Fish Populations (Chambers RC, Trippel EA, eds), pp. 225-245. Fish and Fisheries Series 21, Chapman and Hall, UK.
- Chan S.T.H. and Yeung W.S.B., 1983. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In: (Hoar WS and Randall OJ eds). Fish Physiology, Vol. IXB. Academic Press, London, pp. 171-222.
- Chatain B. and Ounais Guschemann N., 1991. Determination of larvae mass rearing standards in the sea bream *Sparus aurata*. In Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds). LARVI' 91, 15, 314 - 315.
- Craik J.C.A., 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. Aquaculture 47, 61-88.
- D'Ancona U., 1949. Il differenziamento della gonade e l'inversione sessuale degli Sparidi. Arch. Oceanogr. Limnol. Vol 97-164.

- Danneving H., 1985. The influence of temperature on the development of the eggs of fishes. Thirteenth Ann. Report Fish Bd. Scotland. 13, 147-152.
- Davies P., Hanya I., Furukawa K., Nomura M., 1986. Effect of temperature and photoperiod on sexual maturation and spawning of the common Carp. II: Under conditions of low temperatures. *Aquaculture* 52, 51 – 58.
- Debat and David, 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *TREE* 16, 555-561.
- Devauchelle N., Alexandre J.C., Corre N.L., Letty Y., 1998. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture* 69, 159-184.
- Devlin R.H. and Nagahama Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-364.
- Dinis M.T., 1982. Methods of incubating Dover sole (*Solea solea* L.) eggs. *Rel. Act. Aq. Vasco Gama* 12, 8-9.
- Divanach P., 1985. In: Contribution de la Biologie et de l'Élevage de 6 Sparides Méditerranéens: *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (Poissons Teleosteens). These d'Etat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier.
- Divanach P., Boglione C., Menu B., Koumoundouros G., Kentouri M., Cataudella S., 1996. Abnormalities in finfish mariculture: An overview of the problem, causes and solutions. In: Seabass and Seabream culture: problems and prospects, pp. 45 – 66. International Workshop, Verona, October 16 – 18, 1996. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium.
- Dushkina L.A., 1975. Viability of herring (*Clupea*) eggs and fertilizing capacity of herring sperm stored under various conditions. *J. Ichth.* 15, 423-429.
- Farand F., Cavaliere' A., Lo Paro G., Manganaro A., Mazzola' A., 1985. Preliminary studies on reproduction of *Puntazzo puntazzo* (Gmelin, 1789) (Pisces, Sparidae) under controlled conditions. Department of Animal Biology and Marine Ecology, University of Messina, Via dei Verdi 75, 98100. Messina (Italy) Experimental Thalassographic Institute of the CNR, Spianata S. Ranieri, 98100 Messina (Italy) Zoological Institute, University of Palermo, Via Archirafi 18, 90123 Palermo (Italy). Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam - Printed in The Netherlands. *Aquaculture* 49, 111-123.
- Favaloro E., Lapiano L., Mazzola A., 2002. Rearing of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777), in a Mediterranean fish farm: monoculture versus polyculture. *Aquat. Res.*, 33: 137-140.
- Fernandez-Palacios H., Montero D., Soccoro J., Izquierdo M.S., Vengara J.M., 1994. First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex gibbosus* (Rafinesque, 1810) (Osteichthyes, Sparidae) under controlled conditions. *Aquaculture* 122, 63-73.
- Fuiman L.A. and Werner R.G., 2002. *Fishery Science: the Unique Contributions of Early Life Stages*. Blackwell Science, Oxford.
- Fuiman L.A., and Higgs D.M., 1997. Ontogeny, growth and the recruitment process. In: (Chambers RC, Trippel EA, eds), *Early Life History and Recruitment in Fish Populations*. Chapman & Hall, London, pp. 225– 250.
- Fuiman L.A., Poling K.R., Higgs D.M., 1998. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia* 3, 602-611.
- Gadomski D.M. and Caddell S.M., 1991. Effects of temperature on early-life-history stages of California halibut *Paralichthys californicus*. *Fish. Bull.* 89, 567–576.
- Galloway TF, Kjorsvik E, Kryvi H, 1999. Muscle growth in yolk-sac larvae of the Atlantic halibut as influenced by temperature in the egg and yolk-sac stage. *J. Fish Biol.* 55, 26-43.
- Guinea J. and Fernandez F., 1997. Effect of feeding frequency, feeding level and temperature on energy metabolism in *Sparus aurata*. *Aquaculture* 148, 125-142.
- Hay D.E., 1986. Effects of delayed spawning on viability of eggs and larvae of Pacific herring. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 115, 155 -161.
- Heath D.D., Bernier N.J., Heath J.W., Iwama G.K., 1993. Genetic, environmental, and interaction effects of growth and stress response of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) fry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 435– 442.
- Helfman G.S., Collette B.B., Facey D.E., 1999. Juveniles, Adults, Age, and Growth. In: *The Diversity of Fishes* (Helfman GS, ed), pp. 135-149. Blackwell Science, USA.
- Hempel G., 1984. In *Early Life History of Marine Fish: The Egg Stage* (Hempel G, ed). Washington Sea Grant, USA.

- Hokanson K.E., 1977. Temperature requirement of some percids and adaptations to the seasonal temperature cycle. *J. Fish. Res. Board Can.* 34, 1524–1550.
- Hunt von Herbing I., Boutilier R.G., Miyake T., Hall B.K., 1996. Effects of temperature on morphological landmarks critical to growth and survival in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.* 124, 593–606.
- ICAP, 1999. Θαλάσσιες Υδατοκαλλιέργειες, Κλαδική Μελέτη. Σελ. 1-4.
- Imsland A.K., Sunde L.M., Folkvord A., Stefansson S.O., 1996. The interaction between temperature and size on growth of juvenile turbot. *J. Fish Biol.* 49, 926–940.
- Iversen S.A., Danielssen D.S., 1984. Development and mortality of god (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae in different temperatures. *Flodevigen rapporster.* 1, 49-65.
- Jug-Dujakovik J., Dulcic J., Katavic I., 1995. Embryonic and yolk- sac larval development of the sparid *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). *Fish. Res.* 24, 91-97.
- Kato T. and Kamler E., 1983. Criteria for evaluation of fish egg quality, as exemplified for *Salmo gairdneri* (Rich.). *Bull.Natl. Res. Inst. Aquac.* 4, 61-78.
- Kendall A.W., Ahlstrom E.H., Moser H.G., 1984. Early life history stages of fishes and their characters. In: *Ontogeny and systematics of Fish* (Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW, Richardson SL, eds), pp. 11-22. *Spec. Publ. No 1, American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Allen Press, Lawrence.*
- Kestemont P., Jourdan S., Houbart M., Melard C., Paspatis M., Fontaine P., Cuvier A., Kentouri M., Baras E., 2003. Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. *Aquaculture* 22, 333-356.
- Kinne O. and Kinne E.M., 1961. Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature, salinity, oxygen combinations. *Can. J. Zool.* 40, 231-253.
- Kjorsvic E., and Lonning S., 1983. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the Cod, *Gadus morhua* L.J. *Fish Biol.* 23, 1 – 12.
- Kjorsvic E., Mangor-Jensen A., Holmefjord I., 1990. Egg Quality in Fish . *Adv. Mar. Biol.* 26, 71-113.
- Kjorsvic E., Stene A., Lonning S., 1984. Morphological, physiological and genetical studies of egg quality in cod (*Gadus morhua* L.). In: *The propagation of Cod Gadus morhua* L. (Dahl E, Danielssen DS, Moksness E, Solemdal P, eds), pp. 67-86. *Flodevigen rapportserie No 1.*
- Klimogianni A., Koumoundouros G., Kaspiris P., Kentouri M., 2004. Effect of temperature on the embryonic and yolk-sac larval development of common Pandora, *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758). *Mar. Biol.*, 145: 1015-1022.
- Koumoundouros G., Divanach P., Anezaki L., Kentouri M., 2001. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar. Biol.* 139, 817 – 830.
- Koumoundouros G., Pavlidis M., Anezaki L., Kokkari C., Sterioti A., Divanach P., Kentouri M., 2002. Temperature sex determination in the European sea, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenetic phase. *J. Exp. Zool.* 292, 573-579.
- Koumoundouros G., Sfakianakis D.G., Divanach P., Kentouri M., 2002. Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles. *J. Fish Biol.* 60, 923–932.
- Kovac V., 2002. Synchrony and heterochrony in ontogeny (of fish). *J. Theor. Biol.* 217, 499–508.
- Kraak G.V.D. and Pankhurst N.W., 1996. Temperature effects on the reproductive performance of fish. In: (Wood CM, McDonald DG, eds), pp. 159-176. *Global Warming: Implication for freshwater and marine fish.* Cambridge University Press.
- Kucharczyk D., Luczynski M., Kujawa R., Czerkies P., 1997. Effect of temperature on embryonic and larvae development of bream (*Abramis brama* L.). *Aquat. Sci.* 59, 214-224.
- Lagardere J.P., Anras M.L.B., Breton H., CLARET J.B.C., 1995. The effects of illumination, temperature and oxygen concentration on swimming activity of turbot *Psetta maxima* (Linne 1758). *Fish. Res.* 24, 165-171.
- Lissia Frau A.M. and Casu S., 1968. Il processo gonadogenetico in alcune specie di sparidi. *Studi sassaressi* I, 50 – 72.
- Lissia-Frau A.M. and Pala M., 1968. Ricerche sull'ermafroditismo dei Saraghi: (*D.sargus* L., *D.vulgaris* Geoffr., *Diannularis* L. e *P.puntazzo* Cetti), *Studi Sassaressi.* 46, 203-221.
- Lockwood S.J. and Daly C.B., 1975. Further observations on the effects of preservation in 4% neutral formalin on the length and weight of O-group flatfish. *J. Int. Explor. Mer.* 36, 170-175.
- Macpherson E., 1998. Ontogenetic shifts in habitat use and aggregation in juvenile sparid fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 220, 127-150.



- Marangos C., Yagi H., Ceccaldi H.J., 1986. Role de la temperature et de la salinite sur le taux de survie et la morphogenese au cours du development embryonnaire chez les oeufs du loup de mer *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Teleostei, Serranidae). *Aquaculture* 54, 287–300
- Matsuoka M., 1987. Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.* 65, 1-114.
- McEvoy L.A., 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 24, 437- 448.
- Micale V., Perdichizzi F., Basciano G., 1995. Aspects of the reproductive biology of the sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). I. Gametogenesis and gonadal cycle in captivity during the third year of life. Istituto Sperimentale Talassografico, Consiglio Nazionale delle Ricerche. Messina. Italy Biotechno Co. Marsala. Italy.
- Micale V., Perdichizzi F., Basciano G., 1996. Aspects of the reproduction biology of the sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo* Cetti 1777). I. Gametogenesis and gonadal cycle in captivity during the third year of life. *Aquaculture* 140, 281-291.
- Migaud H., Gardeur J.N., Kestemont P., Fontaine P., 2001. Influence of temperature and photoperiod on the broodstock gonadogenesis, spawning and larvae quality of Eurasian Perch, *Perca fluviatilis*. In: Lavri 2001, 3rd Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Gent (Belgium), (Hendry Cl, Van Stappen G, Wille M, Sorgeloos P, eds), pp.76-78. European Aquaculture Society No. 30, Oostende, Belgium.
- Mihelakakis A., Yoshimatsu T., Tsoikas C., 2001. Effect of feeding frequency on growth, feed efficiency, and body composition in young common pandora. *Aquac. Int.* 9, 197- 204.
- Nicieza A.G. and Metcalfe N.B., 1997. Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. *Ecology* 78, 2385– 2400.
- Oltra R. and Todoli R., 2000. Reproduction of the endangered killifish *Aphanius iberus* at different salinities. *Env. Biol. Fish.* 57, 113- 115.
- Osse J.W.M., van der Boogaart J.G.M., van Snik G.M.J., van der Sluys L., 1997. Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture* 155, 249-258.
- Overnell J., 1997. Temperature and efficiency of development during endogenous feeding in herring embryos and yolk-sac larvae. *J. Fish. Biol.* 50, 358- 365.
- Papadaki M., Papadopoulou M., Siggelaki I. Mylonas C.C., 2008. Egg and sperm production and quality of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity. *Aquaculture* 276, 187-197.
- Pavlidis M., Koumoundouros G., Steriotti A., Somarakis S., Divanach P., Kentouri M., 2000. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 287, 225-232.
- Pedersen T. and Jobling M., 1989. Growth rates of large, sexually mature cod, *Gadus morhua*, in relation to condition and temperature during an annual cycle. *Aquaculture* 81, 161–168.
- Penaz M., Prokes M., Kouril J., Hamackova J., 1983. Early development of the carp *Cyprinus carpio*. *Acta Sci. nat. Acad. Sci. Bohemoslov.* 17, 1–39.
- Policansky D., 1982. Influence of age, size, and temperature on metamorphosis in the starry flounder, *Paralichthys stellatus*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 39, 514-517.
- Polo A., Yufero M., Pascual E., 1991. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 92, 367 – 375.
- Rana K.J., 1990. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* (L.) eggs and fry. I. Gross embryology, temperature tolerance and rates of embryonic development. *Aquaculture* 87, 165-181.
- Rombough P.J., 1996. The effects of temperature on embryonic and larval development. In: (Wood CW, McDonald, eds), pp. 177-223. *Global warning: Implications for freshwater and marine fish.* Cambridge University Press.
- Sakai K., Nomura M., Takashima F., 1985. Characteristics of naturally spawned eggs of red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Scien. Fish.* 51, 1395-1399.
- Silva A., and Orellana Y., 2001. Effects of temperature on growth, survival, and daily food consumption of Chilean flounder *Paralichthys adspersus* larvae. In: Larvi 2001, 3rd Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Gent (Belgium), (Hendry Cl, Van Stappen G, Wille M, Sorgeloos P, eds), pp. 76-78. European Aquaculture Society No 30, Oostende, Belgium.
- Smith L.L. and Chernoff B., 1981. Breeding populations of cyprinodontoid fishes in a thermal stream. *Copeia* 3, 701-702.
- Stephanou D. and Georgiou G., 1991. Experimental culture of *Puntazzo puntazzo* in Cyprus. MEDRAP II report. Diversification of Aquaculture Production Workshop. Malta.

- Syrski S., 1876. Ergebnisse von untersuchungen der Geschlechtsorgane von Knochenfischen (De piscium osseorum organibus genitalibus), Kosmos. Lemberg. I, 418.
- Tandler A. and Mason C., 1984. The use of 140 labelled rotifers (*Brachionus plicatilis*) in the larvae of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*): measurements of the effect of rotifer concentration, the lighting regime and Seabream larval age on their rate of rotifer ingestion. In: German – Israeli cooperation in aquaculture research, 2nd status seminar, pp. 241 – 259. European Mariculture Society No 8, Special publication.
- Tandler A., Anav F.A., Choshniak, I., 1995. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. Aquaculture 135, 343-353.
- Temming A., Bohle B., Skagen D.W., Knudsen F.R., 2002. Gastric evacuation in mackerel: the effects of meal size, prey type and temperature. J. Fish Biol. 2002, 50-70.
- Thompson B.M. and Riley J.D., 1981. Egg and larval development studies in the North Sea cod (*Gadus morhua* L.). Rapp. P. –v. Réun. Cons. Int. Exp. Mer. 178, 553-559.
- Thorpe J.E., 1987. In: Rhythmic activity of fishes (Thorpe JE, ed). Academic press, London Tortonese E, 1975. Fauna D'Italia. In Osteichthyes, Pesci Ossei (Tortonese E, ed). Edizioni Calderini Bologna.
- Van Snik G.M.J., van de Boogaart J.G.M., Osse J.W.M., 1997. Larval growth patterns in *Cyprinus carpio* and *Clarias gariepinus* with attention to the finfold. J. Fish Biol. 50, 1339-1352.
- Venzelos A. and Benetti D.D., 1999. Pigment abnormalities in flatfish. Aquaculture 176, 181-188.
- Watanabe T., Arakawa T., Kitajima C., Fujita S., 1984. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of Red Sea Bream. Bull. Jap. Soc. Sc. Fish. 50, 495-501.
- Watanabe W.O., Lee C.S., Ellis S.C., Ellis E.P., 1995. Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolk sac larvae of the Nassau grouper *Epinephelus striatus*. Aquaculture 136, 141 – 147.
- Yamamoto T., 1969. In: Fish Physiology (Hoar WS, Randall DJ, eds), pp. 117-175. Academic Press, New York – London.
- Zohar Y., Abraham M., Gordin H., 1978. The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost (*Sparus aurata* L.) during the first two years of life. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 18 (4), 877-882.
- Κλαδάς Γ., 2006. Παραγωγή ιχθυδίων θαλάσσιων ειδών (Καλλιέργειες νυμφών). Σημειώσεις του τμήματος Ιχθυοκομίας Αλιείας, Ηγουμενίτσα.
- Κλημογιάννη Α., 2004. Μελέτη της οντογένεσης του λιθρινιού (*Pagellus erythrinus* L. 1758) και η επίδραση της θερμοκρασίας στα επιμέρους αναπτυξιακά στάδια σε συνθήκες εντατικής εκτροφής. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Κλημογιάννη Α., 2006. Εργαστηριακές σημειώσεις Ιχθυογεννητικών σταθμών. ΤΕΙ Μεσολογγίου, τμήμα Υδατοκαλλιεργειών και Αλιευτικής Διαχείρισης.
- Κουμουνδούρος et al., 1995...
- Κουμουνδούρος Γ., 1993. Βιολογία ανάπτυξης της τσιπούρας, *Sparus aurata* Linnaeus, 1758 (Percoidea, Sparidae), υπό εκτατικές συνθήκες καλλιέργειας. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 109 pp.
- Κουμουνδούρος Γ., Divanach P., Κεντούρη Μ., 1995. Σκελετικές παραμορφώσεις στις ιχθυοκαλλιέργειες: Ανάπτυξη, έγκαιρη Διάγνωση, Γενεσιουργοί Παράγοντες και Επιπτώσεις επί του τελικού προϊόντος. Αλιευτικά Νέα, Δεκ. 1995. σελ.66-76.
- Κουμουνδούρος Γ., 1998. Οντογένεση της λειτουργικής μορφολογίας και κριτήρια ποιότητας των νυμφών και ιχθυδίων της συναγρίδας *Dentex dentex* (L. 1758), σε συνθήκες εκτροφής. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.
- ΠΑΣΕΓΕΣ, 2010. IOBE: Ιδιαίτερα θετικές οι προοπτικές για το κλάδο των ιχθυοκαλλιεργειών. <http://stock.ana-mpa.gr/articleview1.php?id=5863>.
- Χριστοδουλοπούλου Σ., 2009. Επίδραση του περιβάλλοντος στην επιθετική συμπεριφορά των ιχθυδίων μυτακίου (*Diplodus puntazzo* Getti, 1777). Μεταπτυχιακή διατριβή στην Οικολογία – Διαχείριση & Προστασία Φυσικού Περιβάλλοντος.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

---

## Εμβρυακή και λεκιθοφόρα νυμφική ανάπτυξη στο κοινό είδος μυτάκι (*Diplodus puntazzo*)

Μαρία Καλαντζή, Γιώργος Πυρένης, Αικατερίνη Ζουλιώτη, Γιώργος Τράκος, Αικατερίνη Κλημογιάννη<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Τ.Ε.Ι Μεσολογίου, Τμήμα ΥΔ.Α.Δ., Νέα κτήρια, Τ.Κ. 30200, Μεσολόγγι, e-mail: k.klimogianni@gmail.com

### ABSTRACT

**Maria Kalanji, Giorgos Pyrenis, Aikaterini Zoulioti, Giorgos Trakos, Aikaterini Klimogianni: Embryonic and yolk-sac larval development of the common sharpnout seabream (*Diplodus puntazzo*)**

In the present study the embryonic and yolk-sac larval development of *Diplodus puntazzo* are described. The eggs were obtained from captive broodstock (F<sub>1</sub> generation cultured specimens) in October of 2009. Egg incubation and yolk-sac larval development were studied in three laboratory tanks (of 35 l each) at temperature condition of 21°C. Eggs exhibited a diameter of 0.868±0.009 mm and a wet weight of 0.349±0.014 mg, while contain one lipid globule of 0.237±0.007 mm diameter. At hatching (41 h after fertilization) the larvae of *D. puntazzo* measured 2.179±0.019 mm TL. The yolk sac was consumed 64 h after hatching (autotrophic phase ends), when the larvae reached 3.102±0.046 mm TL. The aim of the present study was to acquire further knowledge on the autotrophic ontogeny of *D. puntazzo*, to help both commercial aquaculture and ichthyoplankton studies.

Keywords: *Diplodus puntazzo*, ontogeny, egg, yolk-sac larval

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κοινό μυτάκι *Diplodus puntazzo* (Cetti 1777), είναι ένα είδος με μεγάλη εμπορική σημασία. Ταξινομικά ανήκει στην οικογένεια των Sparidae (Osteichthyes), ενώ διαθέτει μεγάλη γεωγραφική κατανομή, μιας και απαντάται από τη Μαύρη θάλασσα και τη Μεσόγειο μέχρι τον Ατλαντικό. Το μυτάκι είναι ερμαφρόδιτο είδος και μάλιστα παρουσιάζει πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό (Pajuelo *et al.* 2008). Η γενετική ωρίμανση του είδους ξεκινάει από την ηλικία των δυο ετών (Micale *et al.* 1996). Στη Μεσόγειο η περίοδος ωοτοκίας εκτίνεται από τον Σεπτέμβριο έως τον Δεκέμβριο, στα θερμοκρασιακά εύρη των 21.0-18.5°C (Papadaki *et al.* 2008). Μελέτες πάνω στην ποιότητα των γενετικών προϊόντων (Papadaki *et al.* 2008), την αύξηση (Favarolo & Mazzola 2000), την παθολογία (Pellitero *et al.* 2008), τη διατροφή (Merida *et al.* 2009), έχουν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την παραγωγή του είδους σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Αντίθετα, η βιβλιογραφία που αφορά τη μελέτη της οντογένεσης στα αυτότροφα στάδια είναι περιορισμένη. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η περιγραφή της εμβρυακής και λεκιθοφόρας νυμφικής ανάπτυξης στο μυτάκι, ώστε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο τόσο στην επιλογή των κατάλληλων χειριστικών ενεργειών και μεθόδων κατά την εκτροφή του, όσο και στις ιχθυοπλαγκτονικές μελέτες.

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

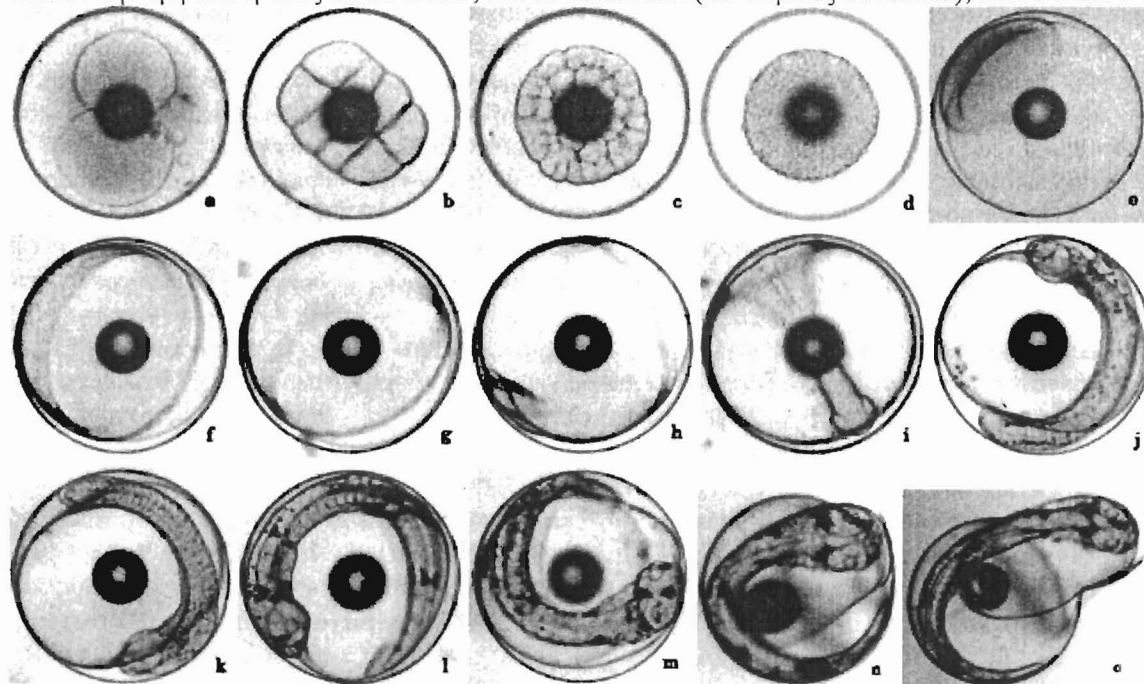
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με αυγά από γεννήτορες του ιχθυογεννητικού σταθμού της εταιρείας Νηρέυς Α.Ε. στη Χιλιαδού Μανάγουλης, Φωκίδας. Το απόθεμα των γεννητόρων απαρτιζόταν από 350 άτομα (1.0 Kg μέσο βάρος), προέλευσης F<sub>1</sub> εκτρεφόμενης γενιάς, τα οποία είχαν αποθεματοποιηθεί σε κυλινδροκωνική δεξαμενή χωρητικότητας 45 m<sup>3</sup>. Η ωοτοκία πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα, κάτω από φυσικές συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας. Αμέσως μετά την ωοτοκία, τα αυγά συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν με συγκέντρωση 500 αυγά l<sup>-1</sup> σε σύστημα τριών γυάλινων ορθογώνιων (διαστάσεων 40x35x30 cm) ενυδρείων, χωρητικότητας 35 l έκαστο. Το νερό, αλατότητας 38psu και θερμοκρασίας 21±0.2°C, φιλτραριζόταν μέσω συστήματος ανακύκλωσης με ρυθμό ανανέωσης 100% την ώρα. Ο φωτισμός κρατήθηκε σε μηδενικά επίπεδα, ενώ ελαφρύς αερισμός (50ml min<sup>-1</sup>) εφαρμόστηκε μόνο στο εμβρυακό στάδιο.

Αρχικά μετρήθηκαν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αυγού όπως, οι διάμετροι του αυγού και της σταγόνας λιπιδίων σε mm (δείγμα 160 αυγών), καθώς και το νοπό βάρος σε mg (έξι δείγματα από 84 έως 200 mg). Η μελέτη του εμβρυακού σταδίου εστιάστηκε κυρίως στην εξέλιξη των αναπτυξιακών γεγονότων, στον προσδιορισμό των αναπτυξιακών χρόνων, και στα ποσοστά εκκόλαψης. Κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο (προνυμφικό) η μελέτη περιλάμβανε, τον προσδιορισμό της μορφολογικής και μορφομετρικής εξέλιξης (Κλημογιάννη 2004), των αναπτυξιακών χρόνων (Divanach 1985), τα ποσοστά επιβίωσης και τη συμπεριφορά. Για την περαίωση των παραπάνω μελετών δείγματα ατόμων (25 αυγά ανά 30 min, και 10 λεκιθοφόρες νύμφες ανά 4 ώρες), φωτογραφήθηκαν με τη χρήση ψηφιακής κάμερας (Leica DM100) προσαρμοσμένης σε μικροσκόπιο (Leica ICCA). Για τη μορφομετρία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα (ImageJ).

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το αυγό στο μυτάκι είναι σφαιρικό και διαφανές και έχει διάμετρο που κυμαίνεται από 0.845 έως 0.885 mm (μέση τιμή  $0.868 \pm 0.009$  mm). Εσωτερικά φέρει επίσης μια διαφανή σταγόνα λιπιδίων κοντά στην περιφέρειά του με διάμετρο από 0.222 έως 0.248 mm (μέση τιμή  $0.237 \pm 0.007$  mm). Το νοπό βάρος βρέθηκε μεταξύ 0.326 και 0.363 mg (μέση τιμή  $0.349 \pm 0.014$  mg).

Μία ώρα και δέκα λεπτά μετά τη γονιμοποίηση (ΜΓ), πραγματοποιήθηκε η πρώτη αυλάκωση. Οι διαιρέσεις των κυττάρων συνεχίστηκαν με τα κύτταρα να φαίνονται καθαρά (4 κύτταρα σε χρόνο 1:30 h ΜΓ, 8 κύτταρα σε 2:30 h ΜΓ, 18-32 κύτταρα σε 3:30 h ΜΓ). Το στάδιο του μοριδίου σημειώθηκε 4:30 h ΜΓ και το στάδιο του βλαστιδίου 7:30 h ΜΓ. Καθώς η εμβρυογένεση μπήκε στο στάδιο του γαστριδίου (9:30 h ΜΓ), ξεκίνησε η μετανάστευση των κυττάρων στην περιφέρεια της λεκίθου (επιβολή), όπου μετά από 7 ώρες είχε ολοκληρωθεί. Η έναρξη της νευριδίωσης σηματοδοτήθηκε με την εμφάνιση της νευρικής αύλακας (16:30 h ΜΓ), ενώ η λήξη της με το κλείσιμο του βλαστοπόρου (18:00 h ΜΓ). Οι πρώτοι σωμίτες έκαναν την εμφάνισή τους 18:30 h ΜΓ, και οι τελευταίοι (22 σωμίτες συνολικά), 28:30 h ΜΓ.

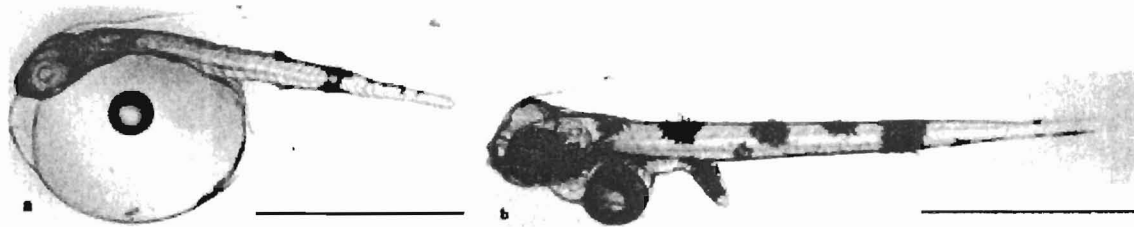


Εικ. 1: Εμβρυακή ανάπτυξη του *D. puntazzo* στους 21°C: a. 2 κύτταρα, b. 8 κύτταρα, c. μοριδίο, d. βλαστίδιο. e. πρώιμο γαστρίδιο, f. 1/4 επιβολή, g. 1/2 επιβολή, h. πρώιμο νευρίδιο. i. κλείσιμο βλαστοπόρου, j. 6 σωμίτες, k. 18 σωμίτες, l. 22 σωμίτες, m. δραστήριο έμβρυο, n. και o. εκκόλαψη.

Fig. 1: Embryonic development of *D. puntazzo* at 21°C: a. 2 cells, b. 8 cells, c. morula, d. blastula, e. early gastrula, f. 1/4 epiboly, g. 1/2 epiboly, h. early neurula, i. blastopore closed, j. 6 somites, k. 18 somites, l. 22 somites, m. activated embryo, n. and o. hatching.

Παράλληλα με το σχηματισμό των σωματιών, παρατηρήθηκε εκτεταμένη οργανογένεση και αύξηση του μήκους του εμβρύου. Η καρδιά σχηματίστηκε 23:30 h MI για να γίνει λειτουργική μετά από πέντε ώρες. Το έμβryo κάλυψε σε μήκος ολόκληρη την περιφέρεια της λεκίθου σε 34:00 h MI ενώ παράλληλα εκδήλωσε κινητικότητα. Σε σαράντα ώρες και τριάντα λεπτά μετά την γονιμοποίηση ξεκίνησε η εκκόλαψη των πρώτων αυγών, ενώ σε τριάντα λεπτά είχαν εκκολληθεί το 50% του συνόλου των αυγών. Στην Εικ. 1 παρουσιάζεται η ανάπτυξη αυτή.

Λιμέσως μετά την εκκόλαψη η λεκιθοφόρα νύμφη (προνύμφη) του μυτακιού φέρει έναν ευμεγέθη λεκιθικό σάκο που καταλαμβάνει περίπου το πρόσθιο μισό του ολικού μήκους (Εικ. 2). Συγκεκριμένα, ο λεκιθικός σάκος στην εκκόλαψη βρέθηκε να έχει μήκος από 1.046 έως 1.080 mm (μέση τιμή  $1.065 \pm 0.014$  mm), ύψος από 0.775 έως 0.819 mm (μέση τιμή  $0.802 \pm 0.016$  mm) και όγκο  $0.359 \pm 0.017$  mm<sup>3</sup>. Το σώμα σε όλο σχεδόν το μήκος του, από την κορυφή της κεφαλής μέχρι το οπίσθιο άκρο του λεκιθικού σάκου, περιβάλλεται από πλατιά και διαφανή πρωτογενή περιφερειακή πτερυγιοπτυχή. Το πρόσθιο τμήμα του σώματος είναι κεκαμένο προς τα κάτω, εξαιτίας της στενής επαφής του με το λεκιθικό σάκο. Οι οφθαλμοί (άχρωμοι), οι ακουστικές κοιλότητες, οι ρινικές κοιλότητες είναι καλά σχηματισμένες. Η νεοεκκολλαπτόμενη νύμφη στο μυτάκι δεν φέρει κανένα σχηματισμένο πτερύγιο, ενώ διαθέτει 26 μυομερή (11:25 προ:μεταεδρικά, αντίστοιχα). Τα πρώτα χρωματοφόρα κύτταρα στην επιφάνεια των οφθαλμών εμφανίστηκαν 4 ώρες μετά την εκκόλαψη (ME) και σταδιακά κάλυψαν ολόκληρη την επιφάνειά τους (60 h MI). Η σταγόνα λιπιδίων προσκολλήθηκε στον κορμό 24 h ME. Τον ίδιο χρόνο άρχισε και ο σχηματισμός των θωρακικών πτερυγίων, των μοναδικών πτερυγίων που σχηματίστηκαν στο αυτότροφο στάδιο. Όσον αφορά τη διαφοροποίηση του πεπτικού συστήματος, αρχικά σχηματίστηκε ο εντερικός αυλός (16 h ME), και στη συνέχεια έλαβαν μέρος ο σχηματισμός του ουρητήρα (24 h ME), του εντερικού βρόγχου (32 h ME), η εμφάνιση της κάτω σιαγόνας (36 h ME), το άνοιγμα του στόματος (48 h ME), η έναρξη του σχηματισμού του ήπατος (52 h ME), το άνοιγμα της έδρας (60 h ME). Η λήξη του σταδίου σηματοδοτήθηκε με την πλήρη απορρόφηση των λεκιθικών αποθεμάτων (64 h ME).



Εικ. 2. Φωτογραφική απεικόνιση της λεκιθοφόρας νύμφης του *D. puntazzo*, στην αρχή (a) και το τέλος του αυτότροφου σταδίου (b).

Fig. 2: Photograph images of yolk-sac larvae of *D. puntazzo*, at the beginning (a) and at the end (b) of the autotrophic stage.

Η μορφομετρική μελέτη έδειξε ότι, μετά την εκκόλαψη οι προνύμφες στο μυτάκι έχουν ολικό μήκος (TL)  $2.179 \pm 0.019$  mm. Μέχρι τις 24 h ME το ολικό μήκος παρουσίασε ταχύτερη αύξηση, ενώ όσο προχωρούσε το στάδιο ο ρυθμός της αύξησης μειώθηκε για να μηδενιστεί σχεδόν μέχρι το τέλος της αυτότροφης φάσης ( $3.102 \pm 0.046$  mm TL) (Πίνακας I). Παρόμοιο ρυθμό αύξησης παρουσίασε και το μήκος της νωτοχορδής (NL). Η μείωση του όγκου του λεκιθικού σάκου ακολούθησε και αυτή εκθετικό πρότυπο εξέλιξης, ενώ έφτασε στο 50% του αρχικού όγκου μόλις 8h ME. Η προσκόλληση της σταγόνας των λιπιδίων στον κορμό του σώματος εμφάνισε χρονική καθυστέρηση σε σχέση με τα υπόλοιπα Sparidae (Klimogianni *et al.* 2004) γεγονός που οδήγησε σε ευμεγέθη σταγόνα στο τέλος του σταδίου (η διάμετρος της σταγόνας ή LD διαμορφώθηκε από  $0.219 \pm 0.006$  σε  $0.191 \pm 0.005$  mm) συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη. Η εξέταση των μεταβολών του προεδρικού και μεταεδρικού τμήματος του σώματος, φανερόνουν ότι η αύξηση του ολικού μήκους κατά την πρόοδο του χρόνου εκδηλώνεται κυρίως στο μεταεδρικό τμήμα. Τέλος, το ύψος του σώματος (BD) παρέμεινε σχετικά σταθερό, γεγονός που οφείλεται στο μεγάλο πλάτος της πτερυγιοπτυχής στο νωτιαίο τμήμα του σώματος και κοντά στην έδρα κατά την αρχή κυρίως του σταδίου.



Πίνακας I. Εξέλιξη (AVER.: μέση τιμή, S.D.: τυπική απόκλιση) των μορφομετρικών χαρακτήρων των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo*. Οι χρόνοι δίνονται σε ώρες μετά την εκκόλαψη.

Table I. Evolution of morphometric characters (average and standard deviation) of yolk-sac larvae of *D. puntazzo*. Time projected in hours after hatching.

ΩΡΕΣ Μ.Ε.	0		8		16		24		32		40		48		56		64	
ΜΟΡΦ.																		
ΧΑΡΑΚΤ. (mm)	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.
TL	2.176	0.019	2.453	0.083	2.728	0.042	2.845	0.053	2.916	0.044	2.959	0.032	3.031	0.027	3.074	0.015	3.102	0.046
NL	2.080	0.016	2.345	0.072	2.617	0.038	2.716	0.058	2.803	0.052	2.825	0.042	2.908	0.035	2.920	0.023	2.943	0.061
BD	0.416	0.008	0.377	0.025	0.390	0.013	0.406	0.029	0.397	0.007	0.384	0.010	0.389	0.016	0.384	0.009	0.392	0.014
ED	0.206	0.022	0.204	0.006	0.234	0.009	0.254	0.016	0.246	0.006	0.240	0.011	0.262	0.008	0.238	0.007	0.250	0.007
prOr	0.041	0.006	0.061	0.004	0.063	0.007	0.065	0.005	0.076	0.011	0.084	0.008	0.082	0.007	0.100	0.001	0.106	0.004
prAnl	1.085	0.007	1.091	0.023	1.132	0.025	1.132	0.022	1.142	0.042	1.138	0.035	1.137	0.027	1.124	0.025	1.129	0.032
pstAnl	1.094	0.014	1.362	0.081	1.596	0.056	1.713	0.067	1.774	0.061	1.821	0.084	1.894	0.033	1.950	0.025	1.973	0.031
prYs	0.034	0.009	0.147	0.021	0.218	0.028	0.272	0.013	0.320	0.013	0.368	0.044	0.382	0.014	0.429	0.030	0.432	0.020
pstYs	1.081	0.007	0.997	0.039	0.989	0.014	0.953	0.032	0.859	0.068	0.801	0.048	0.782	0.025	0.748	0.013	0.748	0.021
YsL	1.065	0.014	0.843	0.040	0.784	0.027	0.716	0.038	0.543	0.050	0.440	0.032	0.394	0.017	0.318	0.012	0.304	0.015
YsD	0.802	0.016	0.571	0.066	0.556	0.021	0.530	0.021	0.431	0.033	0.366	0.043	0.370	0.021	0.300	0.026	0.283	0.008
YsV	0.359	0.017	0.147	0.039	0.127	0.010	0.106	0.013	0.054	0.012	0.032	0.010	0.028	0.004	0.015	0.003	0.013	0.001
LD	0.219	0.006	0.215	0.006	0.213	0.006	0.209	0.005	0.204	0.003	0.202	0.007	0.198	0.004	0.197	0.003	0.191	0.003
LV	0.006	0.000	0.005	0.000	0.005	0.000	0.005	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000
n	10		10		10		10		10		10		10		10		10	

TL: ολικό μ., NL: μ. νωτοχορδής, BD: ύψος σώματος, ED: διάμετρος οφθαλμού, prOr: προκογχικό μ., prAnl: προεδρικό μ., pstAnl: μεταεδρικό μ., prYs: πρόσθιο άκρο λεκιθικού, pstYs: οπίσθιο άκρο λεκιθικού, YsL: μ. λεκιθικού, YsD: ύψος λεκιθικού, YsV: όγκος λεκιθικού, LD: διάμετρος σταγόνας λιπιδίων, LV: όγκος σταγόνας λιπιδίων, n: μέγεθος δείγματος

Η εκτίμηση του αριθμού των προνυμφών αμέσως μετά την ολοκλήρωση της εκκόλαψης για κάθε ενυδρείο χωριστά, έδειξε ποσοστά εκκόλαψης (μέση τιμή) από 82, 85 έως 91%, ενώ τα ποσοστά επιβίωσης (μέση τιμή) των προνυμφών στο τέλος του σταδίου εκτιμήθηκαν στα 75, 78 και 81%. Οι προνύμφες του είδους, έδειξαν να αντιδρούν στα μηχανικά ερεθίσματα από την πρώτη ημέρα του σταδίου.

Το μυτάκι αποτελεί είδος υπό μελέτη για τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας, του οποίου η προοπτική βελτίωσης της μαζικής παραγωγής προϋποθέτει προσδιορισμό και ικανοποίηση των βιολογικών του απαιτήσεων. Η μορφολογική ταυτοποίηση του είδους μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στην επιλογή κατάλληλων διαχειριστικών ενεργειών κατά την εκτροφή του.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Divanach P., 1985. In: Contribution de la Biologie et de l'Elevage de 6 Sparides Mediterraneens: Sparus aurata, Diplodus sargus, Diplodus vulgaris, Diplodus annularis, Lithognathus mormyrus, Puntazzo puntazzo (Poissons Teleosteens). These d'Etat, Universite des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier.
- Favarolo E. & A. Mazzola, 2000. Meristic character analysis and skeletal anomalies during growth in reared sharpsnout seabream. *Aquaculture International* 8: 417-430
- Κλημογιάννη Α., 2004. Μελέτη της οντογένεσης του λιθρινιού (*Pagellus erythrinus* L. 1758) και η επίδραση της θερμοκρασίας στα επιμέρους αναπτυξιακά στάδια σε συνθήκες εντατικής εκτροφής. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
- Klimogianni A., G. Koumoundouros, P. Kaspiris, M. Kentouri, 2004. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*. *Marine Biology* 145: 1015-1022
- Merida S.N., A.T. Videll, S.M. Iliorens, M.J. Cerda, 2009. Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diets: Amino acid retention, gut and liver histology. *Aquaculture*, in print (28 October 2009 accepted)
- Micale V., F. Perdichizzi, G. Basciano, 1996. Aspects of the reproductive biology of the sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). I. gametogenesis and gonadal cycle in captivity during the third year of life. *Aquaculture* 140: 281-291
- Pajuelo J.G., J.M. Lorenzo, R. Dominguez-Seoane, 2008. Gonadal development and spawning cycle in the digynic hermaphrodite sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Sparidae) off the Canary Island, northwest of Africa. *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 68-76
- Papadaki M., M. Papadopoulou, I. Siggelaki, C.C. Mylonas, 2008. Egg and sperm production and quality of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) in captivity. *Aquaculture* 276: 187-197
- Pellitero P.A., O. Palenzuela, A.S. Bobadilla, 2008. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infection of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitology International* 57: 110-120





## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

---

## **Ontogeny of Embryonic and Yolk-Sac Larval Stage of the Sparid Sharpnout Sea Bream (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777)**

A. Klimogianni, M. Kalanji, G. Pyrenis, A. Zoulioti and G. Trakos  
Technological Education Institution of Messolonghi,  
Aquaculture and Fisheries Management, Nea Ktiria, 30200, Messolonghi, Greece

---

**Abstract:** In the present study the embryonic and yolk-sac larval growth and development of common sharpnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777), are described and illustrated. The eggs were obtained from captive broodstock (F<sub>1</sub> generation cultured specimens) in October of 2009. Egg incubation and yolk-sac larval development was performed in three laboratory tanks (of 35 l each) at temperature condition of 21°C. For the study of ontogeny, were sampled in the embryonic stage 25 eggs every 30 min and in yolk-sac larval stage, 10 specimens every 4 h. Eggs of *D. puntazzo* are typical sparid eggs whose presented a diameter of  $0.868 \pm 0.009 \mu\text{m}$  and a wet weight of  $0.349 \pm 0.014 \text{mg}$ , while contain a lipid globule of  $0.237 \pm 0.007 \mu\text{m}$  diameter. At hatching (41 h after fertilization) the larvae of *D. puntazzo* measured  $2.179 \pm 0.019 \text{mm TL}$ . The yolk sac resorbed 64 h after hatching (autotrophic phase ends), when the larvae reached  $3.102 \pm 0.046 \text{mm TL}$ . The aim of the present study was to acquire further knowledge on the autotrophic ontogeny of *D. puntazzo*, to help both commercial aquaculture and ichthyoplankton studies.

**Key words:** *Diplodus*, ontogeny, embryo, yolk-sac larvae

---

### **INTRODUCTION**

Common sharpnout sea bream, *Diplodus puntazzo* (Sparidae), is a demersal sparid teleost marine fish, inhabiting at depths up to 150 m and widely distributed from the Black and Mediterranean Seas, to European and African coasts of Atlantic Ocean (from Bay of Biscay to Sierra Leone, the Canary Islands and Cape Verde). *D. puntazzo* is one of the target species of the commercial fisheries and a promising candidate for Mediterranean marine aquaculture (Abellan and Basurco, 1999; Favalaro *et al.*, 2002), due to its high growth rate and food conversion efficiency (Hernandez *et al.*, 2003).

This species is a rudimentary hermaphrodite fish with partial protandry (Pajuelo *et al.*, 2008), whose puberty is reached at 2 years old (Georgiou and Stephanou, 1995). The spawning period extend from September to November (Marangos, 1995), with an optimum temperature at  $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (Micale *et al.*, 1996). Studies on egg and sperm production and quality (Lahnsteiner and Patarnello, 2005; Papadaki *et al.*, 2008), larval rearing and development (Boglione *et al.*, 2003; Palma and Andrade, 2002), growth and nutrition quality (Sara *et al.*, 1999; Orban *et al.*, 2000), digestive and pathology (Suzer *et al.*, 2007; Pellitero *et al.*, 2008) have provided information on the performance of this species in captivity. In addition, there is limited information on ontogeny of autotrophic stages.

---

**Corresponding Author:** A. Klimogianni, Technological Education Institution of Messolonghi, Aquaculture and Fisheries Management, Nea Ktiria, 30200, Messolonghi, Greece

The recording of growth and development (ontogeny), of a species provide major information's about the ecological patterns of habitats (Holmes and McCormick, 2010), behavior and swimming activity (Utne-palm and Stiansen, 2002; Georgalas *et al.*, 2007), physiology (Zapata *et al.*, 2006; Mazon *et al.*, 2007), nutrition (Zouiten *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010), while the morphological description offers taxonomic criteria for systematic diagnosis during the analysis of ichthyoplankton samples (Kimura *et al.*, 2004; Turan *et al.*, 2006). The ontogeny analysis, provide the possibility of identification on critical developmental stages and also can be used as a tool for developmental definition in morpho-anatomic abnormalities (Koumoundouros *et al.*, 2002; Estevao *et al.*, 2005). The above mentioned parameters can be used as section criteria of the type cultured manipulations while offer solutions on quality issues of fish production.

In the present study, described the embryonic and yolk-sac larval ontogeny (growth and development), of common sharpnout sea bream (*Diplodus puntazzo*), with aim of both giving solutions on commercial rearing systems and contribution to ichthyoplankton studies.

## MATERIALS AND METHODS

Experiment was performed on October of 2009, when the natural temperature of the seawater was 21°C, with eggs from commercial hatchery of Nireus S.A. Company in Hiliadou Managouli Doridos, Greece. The eggs (52.500 in number) were collected from captive broodstocks, descended from culture specimens (F<sub>1</sub> generation). Maturation and spawning were performed spontaneously under natural photoperiod and temperature conditions. A total of 350 breeders were held in one outdoor polyester cyliandroconical tank of 45 m<sup>3</sup> volume (with fish density: 8 kg m<sup>-3</sup>), supplied with filtered (drum filter, UV) seawater, at a constant flow rate of 50% h<sup>-1</sup>. Breeders fed on newly frozen fish and cuttlefish, *ad libitum*.

When eggs were sampled from natural mass spawning via overflow collectors, were disinfected with iodine and immediately removed in Technological Education Institution of Messolonghi. With density of 500 eggs L<sup>-1</sup> (17.500 eggs per tank) the eggs were placed in three tanks (triplicate) 35 l water volume each. In these tanks applied water exchange rate of 50% of the tank volume per hour, via recycled system. Temperature was kept at 21±0.2°C and salinity at 38 ppt. The experiment was placed under darkness. Also, gently aeration was applied only in embryonic stage.

Three early life history traits were measured: egg diameter and lipid globule diameter (samples of 160 eggs) and number of eggs per gram of wet weight (6 samples of 84 to 200 mg). Definition of the stages followed by Cassie (1956).

The egg and yolk-sac larval development of *D. puntazzo* was studied *in vivo* using a stereoscopic microscope (Leica ICCA), while morphometric character with photographs via digital camera (Leica DM100) adapted at microscope. For the embryonic stage, 25 eggs were sampled every 30 min. Every sample was examined in respect to the developmental stage of the majority (>50%), of the individuals and to the related developmental events of each stage. In the yolk-sac larval stage, 10 specimens were sampled and photographed every 4 h. On these photographs, twelve morphometric characters (TL, NL, prOr, prAnl, pstAnl, prYs, pstYs, YsL, YsD, BD, ED and LD) were measured (with the program ImageJ) to the nearest 0.001 mm, while YsV and LV, were estimated (Table 1). All lengths were measured parallel to the longitudinal axis of the body and all depths, perpendicular to this axis.

During both embryonic and yolk-sac larval stage, all time intervals were measured from fertilization of approximately 50% of hatching, respectively (t<sub>0</sub> = 0 h). Also, estimated the

Table 1: Morphometric characters measured in the present study

Abbreviation	Character	Description
TL	Total length	From tip of snout to the posterior margin of body
NL	Notochord length	From tip of snout to the posterior margin of notochord
prOr	Pre-orbital length	From tip of snout to the anterior margin of eye
prAnl	Pre-anal length	From tip of snout to anus
pstAnl	Post-anal length	From anus to posterior margin of body
prYs	Pre-yolk-sac length	From tip of snout to the anterior margin of yolk-sac
pstYs	Post-yolk-sac length	From tip of snout to the posterior margin of yolk-sac
YsD	Yolk-sac depth	Maximum
YsL	Yolk-sac length	Maximum
BD	Body depth	Posterior to anus
ED	Eye diameter	(Maximum -minimum)/2
LD	Lipid globule diameter	Maximum
YsV	Yolk-sac volume	$(\pi/6) YsL \times YsD^2$ (Blaxter and Hempel, 1963)
LV	Lipid globule volume	$(4/3) \times \pi \times (LD/2)^3$

relative time ( $RT_i$ ) of each developmental event  $i$  as  $RT_i = (t_i/Tsd) \times 100$ , where,  $t_i$  is the time interval from  $t_0$  to developmental event  $i$  and  $Tsd$  is the total duration of the autotrophic stages.

## RESULTS

### Embryonic Development

At 38 ppt salinity, the newly fertilized eggs of *Diplodus puntazzo* floated. These eggs were telolecithal, spherical in shape and transparent, with a homogeneous and un-segmented vitellus. They contained a single un-pigmented lipid globule of 0.222 to 0.248 mm ( $0.237 \pm 0.007$  mm) diameter. Eggs presented a diameter of 0.845 to 0.885 mm ( $0.868 \pm 0.009$  mm) and a wet weight of 0.326 to 0.363 mg ( $0.349 \pm 0.014$  mg).

Soon after fertilization, a small perivitelline space developed. The first meroblastic cleavage occurred 1:00' h after fertilization (AF), the second 1:30' h, the third 2:30' h and the fourth 3:30' h AF (Fig. 1a-d, respectively) (Table 2). The morula stage was attained 4:30' h AF (Fig. 1e), while the blastula stage 7:30' h AF (Fig. 1f, g). 9:30' h AF, pre-early gastrula stage was determined (Figure 1h) and blastoderm started flattened. Early gastrula was observed 12:30' h AF, where blastoderm started to expand over the surface of yolk mass (epiboly) cover it about  $1/4$  (Fig. 1i). Epiboly progressively advanced and the blastoderm covered the  $1/3$  (pre-middle gastrula) (Fig. 1j), the  $1/2$  (middle gastrula) (Fig. 1k) and the  $3/4$  (late gastrula) (Fig. 1l) of the yolk mass 14:00' h, 15:00' h and 15:30' h AF, respectively. Early neurula stage was observed 16:30' h AF (Fig. 1m) where, neural groove formation started with a mass of cells clearly visible in the anterior side of blastopore. Kupffer's vesicle was formed near to the caudal end of the body (near to the blastopore) 30 min later (Fig. 1n). The blastopore was completely closed 18:00' h AF.

Following the series of events described in Table 1, the first somites developed 30 min to the blastopore closure. One hour after, the optic vesicles were developed in the head region, while the number of somites was 4 (Fig. 1o). 20:30' h AF embryo was covered the  $1/2$  of the yolk surface, while the number of somites reached the 6 (Fig. 1p). Pigment started forms in dorsal area of head 21:30' - 22:30' h AF (8 - 10 somites were observed) (Fig. 1q). When appeared 12 somites (23:30' h AF), the heart started formation. Fourteen somites were determined 24:00' h AF (Fig. 1r) and sixteen somites 25:00' h AF. In the second time, disappearance of Kupffer's vesicle was observed, while the primordial fin observed visible.

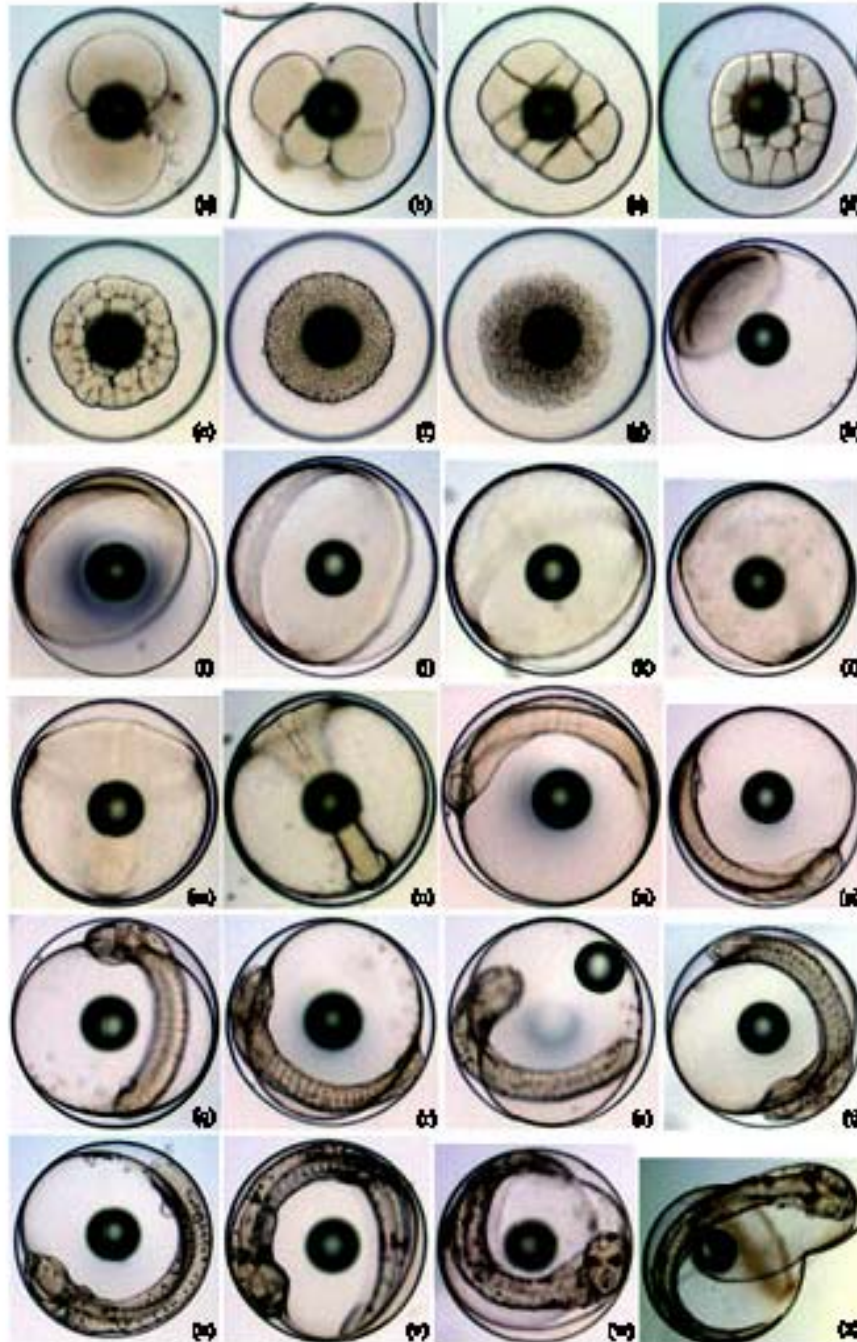


Fig. 1: Embryonic development of *D. puxtanzo* at 21°C; (a) 2 cells, (b) 4 cells, (c) 8 cells, (d) 16 cells, (e) morula, (f) early blastula, (g) late blastula, (h) pre-early gastrula, (i) early gastrula, (j) pre middle gastrula, (k) middle gastrula, (l) late gastrula, (m) early neurula, (n) late neurula, (o) 4 somites, (p) 6 somites, (q) 10 somites, (r) 14 somites, (s) 18 somites, (t) 20 somites, (u) 22 somites, (v) ¼ embryo, (w) too active embryo and (x) hatching

Table 2: Chronological embryonic development of *D. puntazzo* at 21°C

Stage	Description	Hours	RT <sub>1</sub>
Fertilization		0:00'	0.00
Cleavage	First cleavage, 2 cells	1:00'	2.44
	Second cleavage, 4 cells	1:30'	3.66
	Third cleavage, 8 cells	2:30'	6.10
	Fourth-fifth cleavage, 16-32 cells	3:30'	8.54
Morula	Much more cells	4:30'	10.98
Blastula	Blastodisc formation	7:30'	18.29
Gastrula	Pre-early gastrula	9:30'	23.17
	Early gastrula, 1/4 epiboly	12:30'	30.49
	Pre-middle gastrula, 1/3 epiboly	14:00'	34.15
	Middle gastrula, 1/2 epiboly	15:00'	36.59
	Late gastrula, 3/4 epiboly	15:30'	37.80
Neurula	Early neurula, neural groove formation	16:30'	40.24
	Kupffer's vesicle forms	17:00'	41.46
	Late neurula	17:30'	42.68
	Blastopore closed	18:00'	43.90
Embryo	2 somits, optic vesicle developed	18:30'	45.12
	4 somits	19:30'	47.56
	6 somits, embryo surrounds 1/2 of yolk	20:30'	50.00
	8 somits	21:30'	52.44
	10-11 somits	22:30'	54.88
	12 somits, heart formation	23:30'	57.32
	14 somits	24:00'	58.54
	16 somits, Kupffer's disappears, primordial fin formation	25:00'	60.98
	18 somits, 2/3 embryo, optic lens formation	26:30'	64.63
	20 somits, otoliths formation, heart increased	28:00'	68.29
	22 somits, caudal fin independent from yolk-sac	28:30'	69.51
3/4 embryo, activated embryo	34:00'	82.93	
Too activated embryo, head extremely developed	39:00'	95.12	
Hatching	Start hatching	40:30'	98.78
	50% hatching	41:00'	100.00

After one hour and thirty minutes embryo was covered the 2/3 of the yolk surface, while 18 somites were observed and optic lens were formed in optic vesicle (Fig. 1s). The pigmentation increased at all the surface of the body, with small mass of cells to be arterial and posterior of eyes. Otoliths were developed 28:00' h AF and the heart increased in volume (Fig. 1t). The caudal fin was determined separately from yolk-sac 30 min after, where 22 somites were visible (Fig. 1u). The body increase was continuous and embryo was covered the 3/4 of the yolk surface 34:00' h AF (Fig. 1v). At the same time, the activity of embryo started. Mass of pigment cells was observed in posterior area of otoliths, while three h later pigment cells increased near to the tail. After five hours this activity was very high and the head region show extremely increased (Fig. 1w).

Before the hatching, the pattern of pigmentation included big mass of pigment cells in the areas of arterial and posterior of eyes, posterior of otoliths, dorsal and vertical of body at 5-6th somites (near to the anus), dorsal and vertical of body at 12-13th somites and dorsal and vertical of body at 17-18th somites. The first hatching occurred 40 h and 30 min after fertilization, while after thirty minutes (41 h AF) the 50% of eggs were hatched (Fig. 1x).

### Yolk-Sac Larval Development

The newly hatched larvae of *Diplodus puntazzo* were transparent and floated at the surface of the water. The total length was measured  $2.179 \pm 0.019$  mm (range 2.198-2.147 mm). They were characterized by a large yolk sac extending from the tip of snout to the middle of the body (Fig. 2a), with mean length of  $1.065 \pm 0.014$  mm (range 1.046-1.080 mm), mean width  $0.802 \pm 0.016$  mm (range 0.775-0.819 mm) and mean volume of  $0.359 \pm 0.017$  mm<sup>3</sup>. A lipid globule



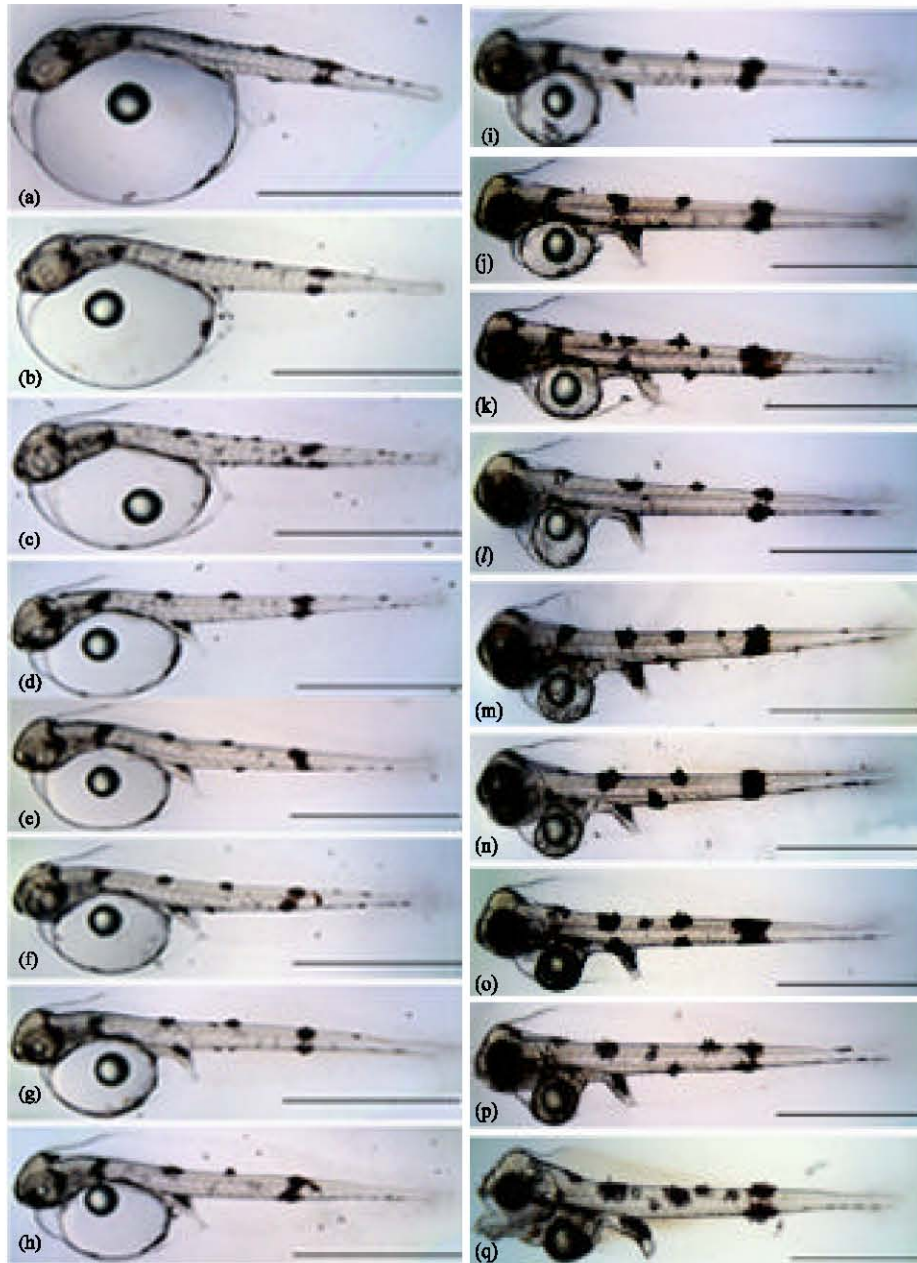


Fig. 2: Yolk-sac larval development of *D. puntazzo* at 21°C; (a) 0 (b) 4 (c) 8 (d) 12 (e) 16 (f) 20 (g) 24 (h) 28, (i) 32 (j) 36 (k) 40, (l) 44 (m) 48 (n) 52 (o) 56 (p) 60 and (q) 64 h after hatching

of  $0.219 \pm 0.006$  mm mean diameter and  $0.006 \pm 0.000$  mm<sup>3</sup> mean volume was presented in the middle of the yolk sac. The head and anterior part of the body were curved around the yolk sac and the primordial marginal finfold surrounds the body from the dorsal part of the head to the posterior margin of the yolk sac. The intestine was undeveloped, with mouth and anus



Table 3: Chronological yolk-sac larval development of *D. puntazzo* at 21°C

Developmental character	Hours	RT <sub>1</sub>
Hatching	0:00'	0.00
Onset of eye pigmentation	4:00'	6.25
Intestinal canal	16:00'	25.00
Lipid globule adherence	24:00'	37.50
Ureter	24:00'	37.50
Pectoral fin formation	32:00'	50.00
Intestinal loop	32:00'	50.00
Lower jaw appearance	36:00'	56.25
Liver formation	52:00'	81.25
Mouth opening	52:00'	81.25
Functional mouth	56:00'	87.50
Stomach formed	56:00'	87.50
Black eyes	60:00'	93.75
Anus opening	60:00'	93.75
Absorption of vitelline reserves	64:00'	100.00

(this is situated behind the 6-7th somites) closed, while a simple straight tubular gut was observed. Initially, this gut was in close contact with the posterior part of the yolk sac, but 4 h later it detached (Fig. 2b).

Eye pigmentation started four h after hatching (AH), (Fig. 2b) (Table 3), with the number of pigment cells increased gradually in eye surface (Fig. 2c, d). The intestinal canal started the formation 16-20 h AH (Fig. 2e, f). In the next stages, the lipid globule leaved from the yolk sac and was adherence on the body of the larvae, while the same time the ureter was observed (24 -28 h AH) (Fig. 2g, h). In this time, the pattern of pigmentation was the same with the end of embryonic stage, while the only different was the increased number of pigment cells at the same areas, especially at 17-18th somites, forming a spot. The formation of the pectoral fins completed at the middle of the stage (32 h AH) (Fig. 2i).

The development of the alimentary system started with the formation of the intestinal loop (32 h AH) and lower jaw (36 h AH) (Fig. 2j), continued with liver formation (52 h AH) (Fig. 2n) and finished with the stomach formation and faction of the mouth (56 h AH) (Fig. 2o) and anus formation (60 h AH) (Fig. 2p). At the middle of the yolk-sac larval stage (32 h AH), the intestinal canal was slowly covered with pigmentation cells. Near to the end of the yolk-sac larval stage (60 h AH), the eyes were pigmented black and also the oil globule was pigmented. The pattern of pigmentation is demonstrated gradually in all parts of Fig. 2a-q.

The autotrophic phase of *D. puntazzo* at 21°C ended 64 h after hatching (Fig. 2q), where the vitelline reserves were fully absorbed, while the oil globule was still present (with a mean diameter of 0.191±0.005 mm). The TL at feeding onset was measured 3.102±0.046 mm (range 3.045-3.160 mm).

During the yolk-sac larval stage, TL increased rapidly up to approximately 16 h after hatching, followed a slow growth rate to 44 h AH and then kept almost constant up to the end of yolk-sac larval stage (Fig. 3a-h). The same pattern of growth was followed from the NL also. The BD was presented constant for all the pre-larval stage. Specifically, the primordial marginal finfold at the anus area was observed thick at the begging of pre-larval stage and as the development occurred, this depth was reduced while at the same time the depth of body trunk increased. During this stage, the prAnl kept constant rate, while the pstAnl was continuously increased. prOr increased as pre-larval stage developed, while the ED increased with variation. This variation seemed to depend from the degree of the eye pigmentation. The consumption of vitelline reserves was rapidly increased the first eight h after hatching (the YsV was decreased approximately up to 60%), followed a slower rate for another 20 h (the YsV was decreased 28 h AH up to 80%), to consumed totally at the end of

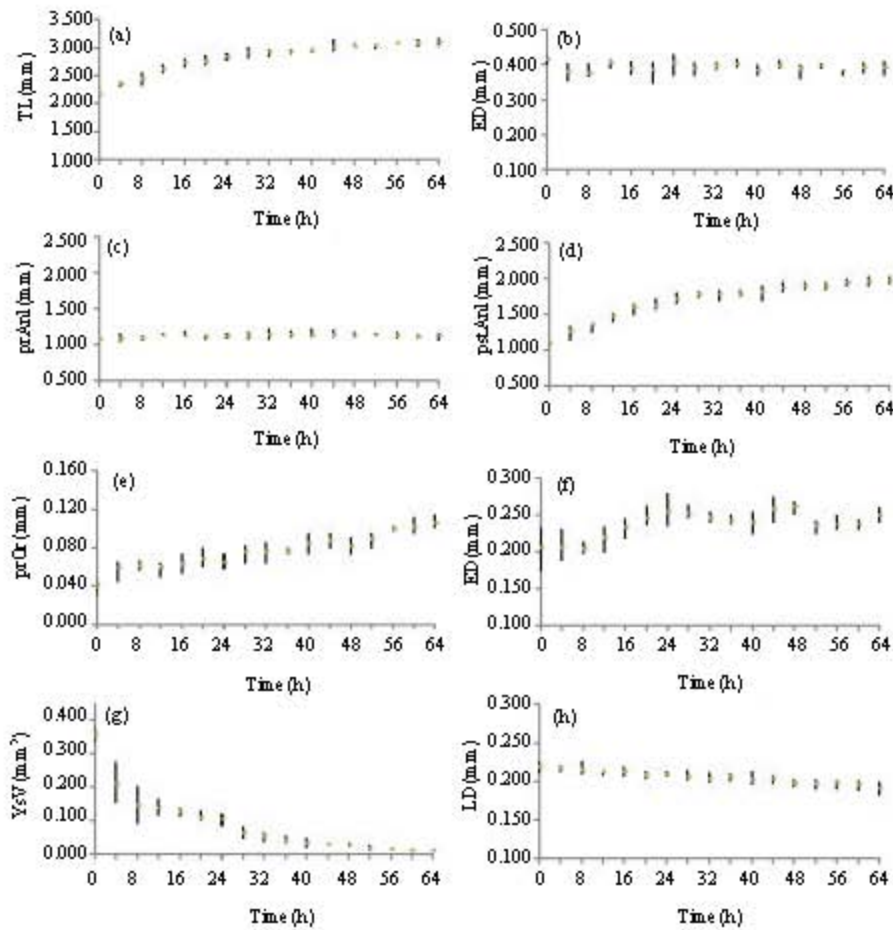


Fig. 3: Evolution of the (a) total length (TL) (b) body depth (BD) (c) pre and (d) post anal length (prAnl, (e) pstAnl), pre-orbit length (prOr) (f) eye diameter (ED) (g) yolk-sac and (h) lipid globule volume (YsV, LV), of *D. puntazzo* yolk-sac larvae, in relation to the time (hours after hatching)

Table 4: Egg and lipid globule diameter of different sparid species

Species	Egg diameter (mm)	Lip. glob. diameter (mm)	Reference
<i>Sparus aurata</i>	0.92-1.04	0.18-0.26	Kentouri (1985)
<i>Diploodus armularis</i>	0.71-0.81	0.18-0.22	Divanach (1985)
<i>Diploodus sargus</i>	0.90-1.16	0.18-0.26	Divanach (1985)
<i>Diploodus vulgaris</i>	0.88-1.04	0.18-0.26	Divanach (1985)
<i>Dentex dentex</i>	0.94-0.96	0.19-0.21	Jug-Dujakovic <i>et al.</i> (1995)
<i>Dentex gibbosus</i>	0.94-0.98	0.18	Fernandez-Palacios <i>et al.</i> (1994)
<i>Lithognathus mormyrus</i>	0.70-0.82	0.16-0.22	Kentouri (1985)
<i>Pagrus pagrus</i>	0.99-1.09	0.24	Mihelkakis <i>et al.</i> (2001)
<i>Pageillus erythrinus</i>	0.74-0.80	0.18-0.19	Klimogianni (2004)
<i>Diploodus puntazzo</i>	0.85-0.89	0.22-0.25	

the stage. In contrast, the consumption of lipid reserves was slowly increased during the yolk-sac larval stage, while the lipid globule volume was decreased after 64 h approximately up to 35%.

## DISCUSSION

In the present study, we studied the egg and yolk-sac larval growth and development of *Diplodus puntazzo*. As many studies have shown, the spawning period of this species extend from September to November, with an optimum temperature at  $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . This is the reason for the chosen experimental period and temperature condition.

The ontogeny study of *D. puntazzo*, from fertilization to the full consumption of vitelline reserves seems a typical Sparidae. It is difficult to identify morphological characteristics by which the eggs of this species differ from those of *Sparus aurata* (Kentouri, 1985), *Diplodus annularis* (Divanach, 1985), *Dentex dentex* (Jug-Dujakovic *et al.*, 1995) and *Pagellus erythrinus* (Klimogianni, 2004). Actually, the comparison of the embryonic stage between *D. puntazzo* and the above sparid species showed same ontogenetic pattern, with similar estimated relative time of each developmental event.

Egg diameter and lipid globule diameter of sparid species are compared in Table 4. The *D. puntazzo* egg appeared with bigger diameter from *L. mormyrus*, *D. annularis* and *P. erythrinus* and smaller egg diameter from *D. vulgaris*, *D. sargus*, *S. aurata*, *D. gibbosus* and *P. pagrus*. Only theoretically the egg diameter can be identified on Sparidae species, because in practice the egg size can differ among females of the same species, while seems too dependent upon age, spawning time and geographical origin, nutrition (Kjorvik *et al.*, 1990).

The total length of newly hatched larvae of common sharpsnout seabream is significantly less than those of the rest studied sparid species, except of *Pagellus erythrinus*, with the total length at feeding onset being very close to these of common pandora (Klimogianni *et al.*, 2004). It is suggested that increase in total length is a biologically important aspect of the yolk-sac larval stages (Peterson *et al.*, 1996). In *D. puntazzo* this increase occurs mostly in post anal area. As TL is directly related to the mouth opening and the pray size that larvae are able to consume (Kentouri, 1985), the small size of first-feeding *D. puntazzo* should be taken into account for successful rearing of larvae, with the use of appropriate strains of small rotifers. The TL of newly hatched larvae of *D. puntazzo* may assist in identifying; however, it would be of limited value since during the first few hours after hatching this species show rapidly growth and length change immediately.

Because the rapidly increase of TL at the begging of yolk-sac larval stage, the consumption of vitelline reserves is damage higher in the same period. On the other side, the estimated volume of oil globule is not observed with high decreased. Indeed, the oil globule consumption in yolk-sac larvae stage of *D. puntazzo* seems lower comparative with other Sparidae species (Kentouri, 1985; Divanach, 1985; Klimogianni, 2004). A reasonable probable cause on this fact seems to be the delay of oil globule adherence from yolk-sac to the larvae body. In this study the adherence occurred to *D. puntazzo* 24 to 28 h after hatching, while to the rest searching sparid species found to occur 4 to 6 h after hatching.

Ranzi (1930) suggested the pattern of pigmentation and melanophores distribution as the starting point in diversification of early stages of sparid species. But attention is required as there are many examples of yolk-sac larval samples showed different pigmentation intensity in the same age and length. However, a valid display of pigment cells pattern and their distribution during early developmental stages, can offer previous idea of identification between species of the same family.

The sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*, has been rearing in Mediterranean aquaculture for more than ten years appearing high levels on survival and growth rate. The next important step is to improve the accuracy on culture manipulation. The study of

ontogeny offer knowledge to approach the previous view and the same time to advance the identification in ichthyoplankton studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the staff of the hatchery in Hiliadou for the egg offers. Also, Dr Hotos and his assistant Msc Vlahos and Dr Vidalis, teachers and important researchers in Department of Aquaculture and Fisheries Management at Technological Education Institution of Messolonghi, for the disinterested offering of laboratory equipment.

#### REFERENCES

- Abellan, E. and B. Basurco, 1999. Options Mediterranean's. In: Marine Finfish Species Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture, CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp: 1-139.
- Blaxter, J.H.S. and G. Hempel, 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus*). ICES J. Mar. Sci., 28: 211-240.
- Boglione, C., M. Giganti, C. Selmo and S. Cataudella, 2003. Morphoecology in larval fin-fish: A new candidate species for aquaculture, *Diplodus puntazzo* (Sparidae). Aquac. Int., 11: 17-41.
- Cassie, R.M., 1956. Early development of the snapper, *Chrysophrys auratus* forster. Trans. R. Soc. N. Z., 83: 705-713.
- Divanach, P., 1985. Contribution de la biologie et de l' élevage de 6 sparides mediterraneens: *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (poissons teleosteens). Ph.D. Thesis, Universite des Scinces et Techniques, Languedoc.
- Estevao, M.D., B. Redruello, A.V.M. Canario and D.M. Power, 2005. Ontogeny of osteonectin expression in embryos and larvae of sea bream (*Sparus auratus*). Generation Comput. End., 142: 155-162.
- Favaloro, E., I. Lopiano and A. Mazzola, 2002. Rearing of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) in a Mediterranean fish farm: Monoculture versus polyculture. Aquacult. Res., 33: 137-140.
- Fernandez-Palacios, H., D. Montero, J. Socorro, M.S. Izquierdo and J.M. Vergara, 1994. First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex gibbosus* (Rafinesque, 1810) (Osteichthyes, Sparidae) under controlled conditions. Aquaculture, 122: 63-73.
- Georgalas, V., S. Malavasi, P. Franzoi and P. Torricelli, 2007. Swimming activity and feeding behaviour of larval European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Effects of ontogeny and increasing food density. Aquaculture, 264: 418-427.
- Georgiou, G. and D. Stephanou, 1995. Contribution to the Study of Maturation and Spawning Problems of the Sharpsnout Seabream (*Puntazzo puntazzo*). CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp: 47-50.
- Hernandez, M.D., M.A. Egea, F.M. Rueda, F.J. Martinez and B.G. Garcia, 2003. Seasonal condition and body composition changes in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) raised in captivity. Aquaculture, 220: 569-580.
- Holmes, T.H. and M.I. McCormick, 2010. Smell, learn and live: The role of chemical alarm cues in predator learning during early life history in a marine fish. Behav. Processes, 83: 299-305.

- Jug-Dujakovic, J., J. Dulcic and I. Katavic, 1995. Embryonic and yolk-sac larval development of the sparid *Dentex (Dentex) dentex* (Linnaeus, 1758). *Fish. Res.*, 24: 91-97.
- Kentouri, M., 1985. Comportement larvaire de 4 mediterraneens en elevage *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (poissons teleosteens). Ph.D. Thesis, Universite des Scinces et Techniques, Languedoc.
- Kimura, Y., S. Ishikawa, T. Tokai, M. Nishida and K. Tsukamoto, 2004. Early life history characteristics and genetic homogeneity of *Conger myriaster* leptocephali along the east coast of central Japan. *Fish. Res.*, 70: 61-69.
- Kjorsvik, E., A. Mangor-Jensen and I. Holmefjord, 1990. Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.*, 26: 71-113.
- Klimogianni, A., 2004. Study on the ontogeny of common pandora (*Pagellus erythrinus*, L. 1758) and effect of temperature on early developmental stages, under intensive rearing conditions. Ph.D. Thesis, University of Patras, Department of Biology, Greece.
- Klimogianni, A., G. Koumoundouros, P. Kaspiris and M. Kentouri, 2004. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*. *Mar. Biol.*, 145: 1015-1022.
- Koumoundouros, G., E. Maingot, P. Divanach and M. Kentouri, 2002. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture*, 209: 49-58.
- Lahnsteiner, F. and P. Patarnello, 2005. The shape of the lipid vesicle is a potential market for egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata* and in the sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*. *Aquaculture*, 246: 423-435.
- Marangos, C., 1995. Larviculture of the Sheepshead Seabream, *Puntazzo puntazzo* (Pisces, Sparidae). CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp: 41-46.
- Mazon, A.F., M.O. Huising, A.J. Taverne-Thiele, J. Bastiaans and B.M.L.V. van Kemenade, 2007. The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 27-37.
- Micale, V., F. Perdichizzi and G. Basciano, 1996. Aspects of the reproduction biology of the sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti 1777). I. Gametogenesis and gonadal cycle in captivity during the third year of life. *Aquaculture*, 140: 281-291.
- Mihelakakis, A., T. Yoshimatsu and C. Tsolkas, 2001. Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 199: 333-352.
- Orban, E., G.D. Lena, A. Ricelli, F. Paoletti, I. Casini, L. Gambelli and R. Caproni, 2000. Quality characteristics of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. *Food Chem.*, 70: 27-32.
- Pajuelo, J.G., J.M. Lorenzo and R. Dominguez-Seoane, 2008. Gonadal development and spawning cycle in the digynic hermaphrodite sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Sparidae) off the Canary Island, Northwest of Africa. *J. Applied Ichthyol.*, 24: 68-76.
- Palma, J. and J.P. Andrade, 2002. Morphological study of *Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo* and *Lithognathus mormyrus* (Sparidae) in the Eastern Atlantic and Mediterranean Sea. *Fish. Res.*, 57: 1-8.
- Papadaki, M., M. Papadopoulou, I. Siggelaki and C.C. Mylonas, 2008. Egg and sperm production and quality of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity. *Aquaculture*, 276: 187-197.
- Pellitero, P.A., O. Palenzuela and A.S. Bobadilla, 2008. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol. Int.*, 57: 110-120.

- Peterson, R.H., D.J. Martin-Robichaud and A. Berge, 1996. Influence of temperature and salinity on length and yolk utilization of striped bass larvae. *Aquacult. Int.*, 4: 89-103.
- Ranzi, S., 1930. Stadi giovanili di Sparidi del golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Neapel.*, 8: 1-1.
- Sara, M., E. Favalaro and A. Mazzola, 1999. Comparative morphometrics of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777), reared in different conditions. *Aquacult. Eng.*, 19: 195-209.
- Suzer, C., S. Aktulun, D. Coban, H.O. Kamaci, S. Saka, K. Firat and A. Alpbaz, 2007. Digestive enzyme activities in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 148: 470-477.
- Turan, C., M. Oral, B. Ozturk and E. Duzgunes, 2006. Morphometric and meristic variation between stocks of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the Black, Marmara, Aegean and Northeastern Mediterranean seas. *Fish. Res.*, 79: 139-147.
- Utne-Palm, A.C. and J.E. Stiansen, 2002. Effect of larval ontogeny, turbulence and light on prey attack rate and swimming activity in herring larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 268: 147-170.
- Yang, R., C. Xie, Q. Fan, C. Gao and L. Fang, 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 302: 112-123.
- Zapata, A., B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutierrez-de Fri-as and A. Cortes, 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish. Shellfish Immunol.*, 20: 126-136.
- Zouiten, D., I.B. Khemis, R. Besbes and C. Cahu, 2008. Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in mesocosms. *Aquaculture*, 279: 166-172.