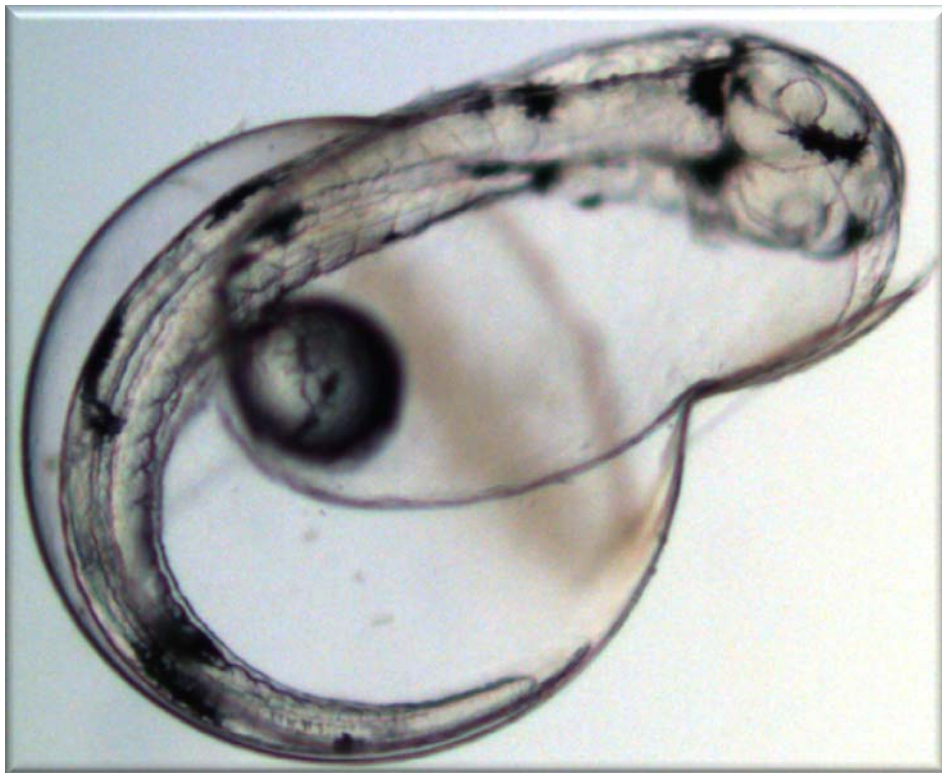


ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ & ΑΛΙΕΥΤΙΚΗΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

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



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ:

ΠΥΡΕΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΤΡΑΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ:

Δρ ΚΛΗΜΟΓΙΑΝΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2010

αφιερώνεται

στις οικογένειες μας

Η συγκεκριμένη πειραματική πτυχιακή εργασία ξεκίνησε στις αρχές Νοεμβρίου του 2009, ενώ διανύαμε το τέταρτο ακαδημαϊκό έτος. Ένας από τους βασικούς λόγους που επιλέξαμε να ασχοληθούμε με την συγκεκριμένη πειραματική εργασία, ήταν ότι θέλαμε να κλείσουμε τον κύκλο σπουδών μας με κάτι ουσιώδες το οποίο θα ήταν πρόκληση για εμάς ενώ ταυτόχρονα θα αποτελούσε ένα σημαντικό εφόδιο για τις μετέπειτα επαγγελματικές μας δραστηριότητες.

Η καθολική συμπαράσταση της επιβλέπουσας καθηγήτριας Dr. Κλημογιάννη ήταν για εμάς πολύ σημαντική. Την ευχαριστούμε για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε, σαν ομάδα, σε όλη τη διάρκεια που χρειάστηκε για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας. Καθώς επίσης και για την συνεχή επιστημονική και ψυχολογική υποστήριξη τόσο κατά της ημέρες και νύχτες που διεξαγόταν το πείραμα όσο και μετέπειτα κατά την συγγραφή της εργασίας. Ο ζήλος της καθώς επίσης και η μεταδοτικότητά της αποτέλεσε για μας πρότυπο ανθρώπου και επιστήμονα και θα μπορούσαμε να πούμε ολοκληρώνοντας ότι χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία δεν θα ήταν υλοποιήσιμη. Την ευχαριστούμε πολύ μέσα από την καρδιά μας, για όλα όσα αποκομίσαμε μέσα από αυτό το μικρό ταξίδι.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Dr Χώτο και τον βοηθό του Msc Βλάχο, καθώς και τον Dr Βιδάλη, καθηγητές και ερευνητές του T.E.I Μεσολογγίου, στο Τμήμα Υδατοκαλλιεργειών & Αλιευτικής Διαχείρισης, για την ανιδιοτελή προσφορά εργαστηριακού εξοπλισμού.

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

Η συγκεκριμένη εργασία μας βοήθησε να έρθουμε λίγο πιο κοντά με το αντικείμενο που σπουδάσαμε και να ανακαλύψουμε εμπειρικά μια ενδιαφέρουσα πτυχή του κλάδου μας που δεν θα μπορούσαμε να κατανοήσουμε πλήρως μόνο μέσα από βιβλία, παρόλο που αυτό που είδαμε δεν ήταν παρά μονό μια μικρή ματιά απ' όλο το φάσμα των υδατοκαλλιεργειών.

Ένα ευχαριστώ στους φίλους μας για την αμέριστη συμπαράσταση τους.

Θέλουμε να ευχαριστήσουμε τη φίλη μας Ευαγγέλια Κυπραίου για την στήριξή της που ήταν πολύ σημαντική για εμάς.

Στις οικογένειες μας, ένα μεγάλο ευχαριστώ, που όλα αυτά τα χρόνια βρίσκονται δίπλα μας στα εύκολα και τα 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	27
2.3.1 Επιβίωση	29
2.3.2 Αναπτυξιακοί χρόνοι	29
2.3.3 Μορφολογική ανάπτυξη	29
2.3.4 Μορφομετρική εξέλιξη	30
2.3.5 Συμπεριφορά	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μορφολογική ανάπτυξη των λεκιθοφόρων νυμφών του <i>D. puntazzo</i>	35
3.2 Μορφομετρική ανάπτυξη των λεκιθοφόρων νυμφών του <i>D. puntazzo</i>	37
3.3 Ποσοστά επιβίωσης και συμπεριφορά	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Οντογένεση	55
4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας	57
4.2.1 Από την έρευνα στην εφαρμογή	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ABSTRACT / ΠΕΡΙΛΗΨΗ	67
---------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Ανακοίνωση στο 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

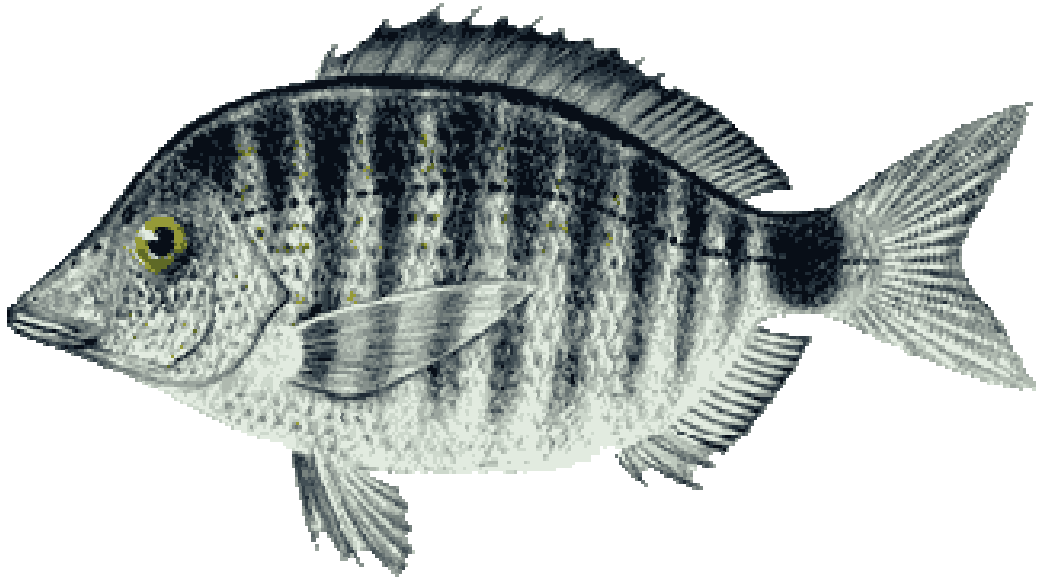
Άρθρο στο Journal of Fisheries and Aquatic Science

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).

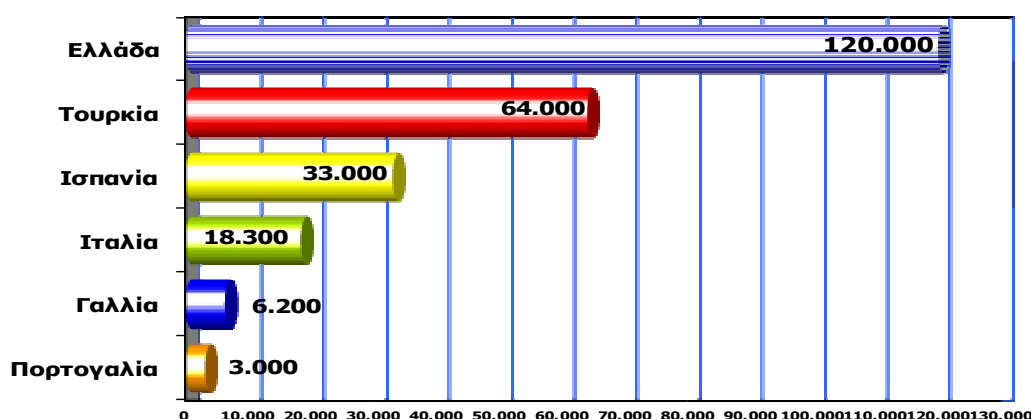
Αλιευτική Παραγωγή στη Μεσόγειο - Μαύρη Θάλασσα			
(ποσότητα: τόνοι)			
Χώρες	2005	2006	2007
ΕΕ(27)	516089	563.519	532.786
ΕΕ (25)	510665	557.274	524.460
ΕΕ (15)	506444	552.895	520.095
Βουλγαρία	3.408	5.630	7.808
Γαλλία	30802	32.294	37.784
Ελλάδα	87.899	92.418	90.345
Ιταλία	279.866	297.427	273.256
Ισπανία	107.779	130.702	119.094
Κύπρος	1850	2.098	2.205
Μάλτα	1336	13.348	1.245
Ρουμανία	2026	615	518
Σλοβενία	1025	933	915
Κροατία	34650	37830	40145
Τουρκία	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 ιχθυοσυμψύκτων, 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^η - 10^η ημέρα στην τσιπούρα και 9^η - 11^η 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^η 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 (A₀) και από *Artemia* Instar II (A₁) 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^η έως 5^η 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^η-50^η 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°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

2.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η παρούσα μελέτη πάνω στην οντογένεση του λεκιθοφόρου νυμφικού 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.

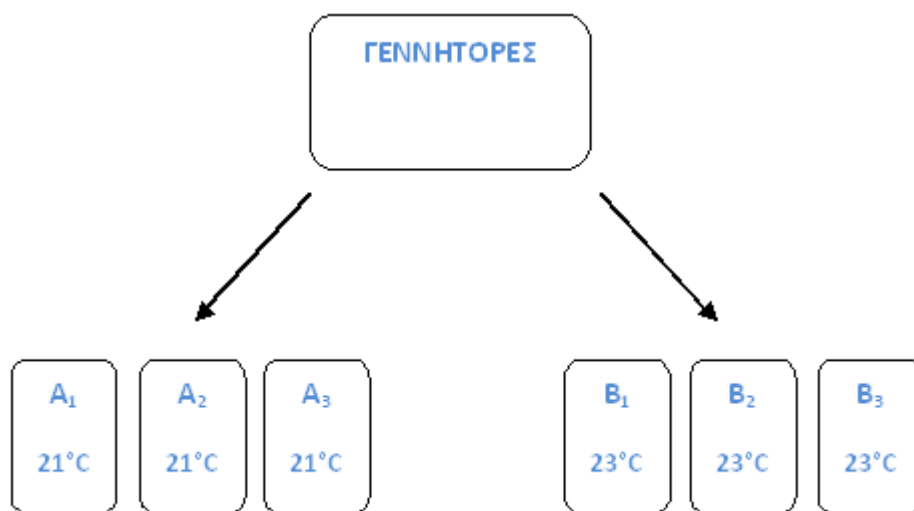
Το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από έξι δεξαμενές-ενυδρεία των 35 l ωφέλιμου όγκου. Η διάταξη των δεξαμενών δίνεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.1**, η διαχείριση των οποίων περιγράφεται διεξοδικά στη συνέχεια του κεφαλαίου.

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

Η παρούσα 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), προέλευσης F_1 εκτρεφόμενης γενιάς, τα οποία είχαν αποθεματοποιηθεί σε κυλινδροκωνική δεξαμενή χωρητικότητας 45 m³.

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 m³/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 ωτοκίας 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 ωτοκία. 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, εφοδιασμένη με πλαγκτονικό δίκτυο 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 ωτοκίας, καθόρισαν την επιλογή των θερμοκρασιακών συνθηκών που επιλέχθηκαν στο παρόν πείραμα (21 και 23°C).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, το παρόν πείραμα αποτέλεσε συνέχεια πειράματος πάνω στη μελέτη της οντογένεσης του εμβρυακού σταδίου και την επίδραση της θερμοκρασίας στην οντογένεση, στο μυτάκι. Στο πρώτο πείραμα εμφανίσθηκε μεγάλη θνησιμότητα (μέση τιμή θνησιμότητας 53% περίπου), στην ανώτερη θερμοκρασιακή συνθήκη (ο πρώτος πειραματισμός πραγματοποιήθηκε στους 21 και 24°C). Το γεγονός αυτό και σε συνδυασμό με την αδυναμία διατήρησης της θερμοκρασίας σταθερά στους 24°C, οδήγησαν στην επιλογή των 23°C για το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο.

2.2.1 Αποθεματοποίηση πειραματικών δεξαμενών

Η μελέτη της οντογένεσης του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου στο μυτάκι πραγματοποιήθηκε κάτω από δυο θερμοκρασιακές συνθήκες ($21\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ και $23\pm 0.2^{\circ}\text{C}$).

Το πειραματικό σύστημα μελέτης του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου του μυτακιού αποτελούνταν από 6 (A_1, A_2, A_3 για τους 21°C και B_1, B_2, B_3 για τους 23°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 δίχτυ 400 μm για την αποφυγή διαρροής του πληθυσμού. Ο φωτισμός κρατήθηκε σε μηδενικά επίπεδα, ενώ στο στάδιο αυτό δεν εφαρμόστηκε αερισμός.

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 εικοσιτετραώρου 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 98% για το διαλυμένο οξυγόνο και 8,1 για το pH. Τέλος, ο πυθμένας κάθε δεξαμενής καθημερινώς καθαριζόταν με σιφωνισμό και την απομάκρυνση των νεκρών ατόμων.



Εικόνα 2.3 Φωτογραφική απεικόνιση του φίλτρου των δεξαμενών.

Ο αριθμός των λεκιθοφόρων νυμφών που καταμετρήθηκαν στην αρχή της παρούσας μελέτης (και που ήταν αυτές που επιβίωσαν από το πρώτο πείραμα του εμβρυακού σταδίου) κυμάνθηκαν από 14.350, 14.875, και 15.925 (A_1 , A_2 , A_3 αντίστοιχα για τους 21°C) έως 8.925, 9.450 και 9.625 (B_1 , B_2 , B_3 αντίστοιχα για τους 23°C).

2.3 Παράμετροι που παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν

Η μελέτη του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου εστιάστηκε κυρίως στην παρατήρηση και τον προσδιορισμό των : **1.** επιβίωσης **2.** αναπτυξιακών χρόνων, **3.** μορφολογικής ανάπτυξης **4.** μορφομετρικής εξέλιξης και **5.** συμπεριφοράς.

2.3.1 Επιβίωση

Τα ποσοστά επιβίωσης των δεξαμενών ανά θερμοκρασιακή συνθήκη υπολογίσθηκαν στο τέλος του πειράματος (τελική επιβίωση του σταδίου), με ατομικές (κάθε δεξαμενή χωριστά) δειγματοληπτικές καταμετρήσεις. Συγκεκριμένα, πιπέτα των 20 ml βυθιζόταν στην δεξαμενή παίρνοντας δείγμα από όλη την κολώνα του νερού. Σε κάθε δεξαμενή πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες (από πέντε διαφορετικά σημεία κάθε φορά), και η τελική επιβίωση αφορούσε το μέσο όρο των δειγματοληψιών.

2.3.2 Αναπτυξιακοί χρόνοι

Οι χρόνοι στους οποίους έλαβαν χώρα τα διάφορα αναπτυξιακά γεγονότα του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου στο μυτάκι εκφράστηκαν τόσο ως απόλυτες (ώρες μετά τη γονιμοποίηση) όσο 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)

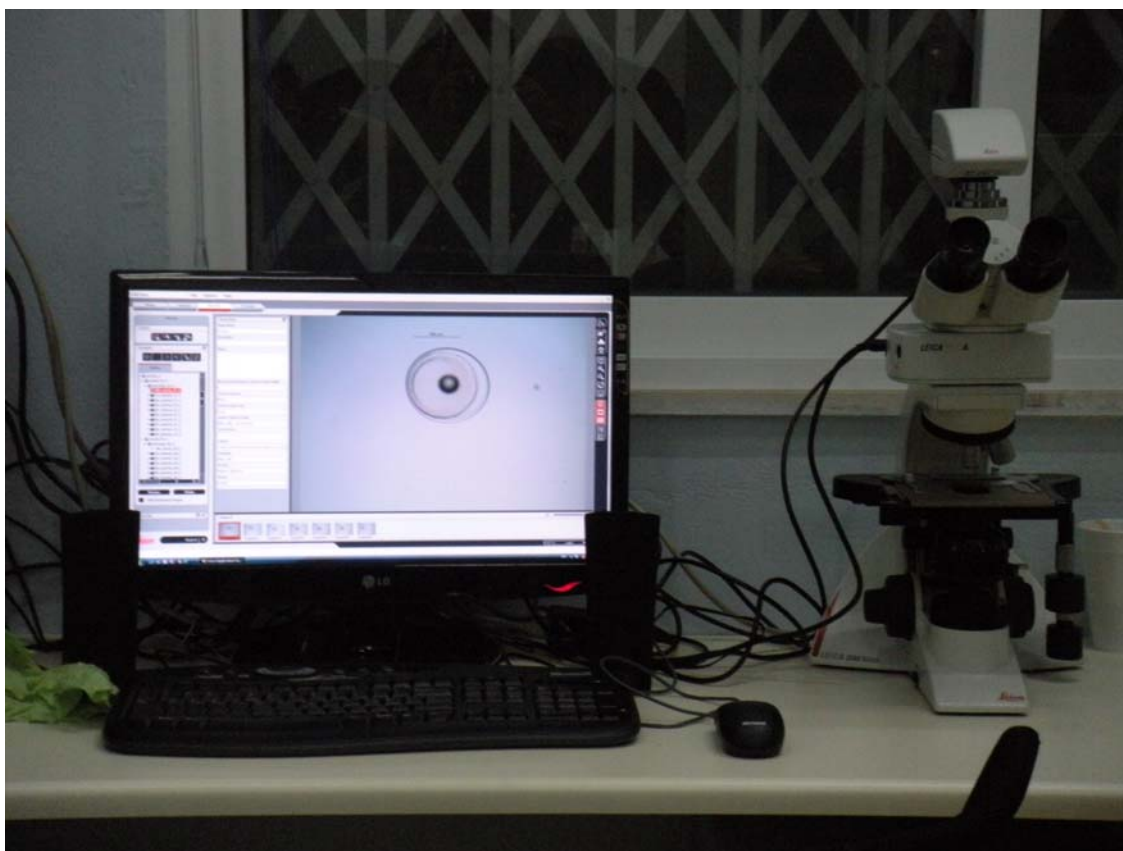
t_i : το χρονικό διάστημα από το t_0 μέχρι το i αναπτυξιακό γεγονός (ώρες)

T_{sd} : η συνολική διάρκεια του σταδίου (ώρες).

Ως σημείο έναρξης του χρόνου του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου θεωρήθηκε ο χρόνος στον οποίο το 50% των αυγών είχε εκκολαφθεί, ενώ το τέλος του σταδίου ορίστηκε στο χρονικό σημείο όπου τα λεκιθικά αποθέματα είχαν εξαντληθεί πλήρως (Kendall *et al.*, 1984).

2.3.3 Μορφολογική ανάπτυξη

Η μορφολογική εξέλιξη στο λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο μελετήθηκε επισταμένα σε όλη τη διάρκειά του και στις δύο θερμοκρασίες (21 και 24°C). Για τον σκοπό αυτό η παρατήρηση έγινε in vivo με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Leica ICCA), ενώ επίσης κάθε δείγμα φωτογραφήθηκε με τη χρήση της ψηφιακής κάμερας (Leica DM 100) προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο (Εικόνα 2.4).



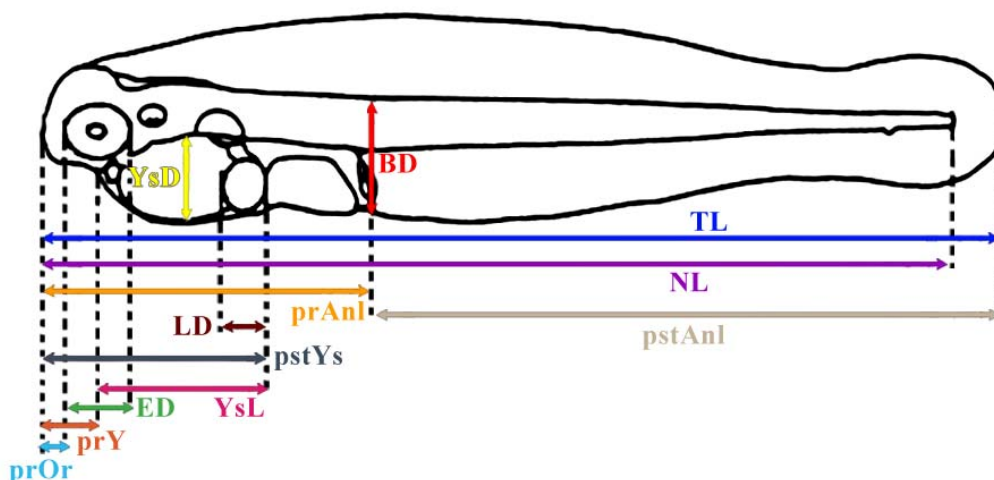
Εικόνα 2.4 Σύστημα μικροσκοπίου και ψηφιακής κάμερας.

Ξεκινώντας από την εκκόλαψη, δείγμα των 10 ατόμων ανά θερμοκρασιακή συνθήκη λαμβανόταν κάθε 4 ώρες, μέχρι και το τέλος του σταδίου. Ο προσδιορισμός των λεκιθοφόρων νυμφικών σταδίων του μυτακιού σε κάθε θερμοκρασία, πραγματοποιούταν βάσει της πλειοψηφίας των ατόμων κάθε δείγματος. Γενικά, φάνηκε ότι η λεκιθοφόρα ανάπτυξη των ατόμων κάθε δείγματος ήταν σχεδόν σύγχρονη, επιτρέποντας έτσι τον ακριβή προσδιορισμό των σταδίων κάθε φορά.

2.3.4 Μορφομετρική εξέλιξη

Στο λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στην εξέταση των μετρικών χαρακτηριστικών των ατόμων του μυτακιού η οποία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ στο φωτογραφικό υλικό που συλλέχθηκε από αυτό το στάδιο και στις δύο θερμοκρασίες (βλ. παράγραφος 2.3.3).

Έτσι, κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο εξετάστηκε η εξέλιξη των εξής μετρικών χαρακτηριστικών(Εικόνα 2.5):



Εικόνα 2.5. Μορφομετρική χαρακτήρες που εξετάστηκαν κατά το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο στο μυτάκι. Οι αποδόσεις των συντομογραφιών των χαρακτήρων παραθέτονται στην παράγραφο 2.3.4 (Κλημογιάννη, 2004).

Ολικό Μήκος ή TL: από το ρύγχος ως το τέλος του σώματος

Μήκος Νωτοχορδής ή NL: από το ρύγχος ως το τέλος της νωτοχορδής

Ύψος σώματος ή BD: από το κατώτερο άκρο του εντέρου ως το ανώτερο σημείο του κορμού του σώματος

Προεδρικό Μήκος ή prAnl: από το ρύγχος ως το σημείο τομής του εντέρου με την πρωτογενή περιφερειακή πτερυγιοπτυχή

Μεταεδρικό Μήκος ή pstAnl: από το σημείο τομής του εντέρου με την πρωτογενή πτερυγιοπτυχή ως το τέλος του σώματος

Πρόσθιο Άκρο Λεκιθικού Σάκου ή prYs: από το ρύγχος ως το πρόσθιο άκρο του λεκιθικού σάκου

Οπίσθιο Άκρο Λεκιθικού Σάκου ή pstYs: από το ρύγχος ως το οπίσθιο άκρο του λεκιθικού σάκου

Μήκος Λεκιθικού Σάκου ή YsL: από το πρόσθιο ως το οπίσθιο άκρο του λεκιθικού σάκου

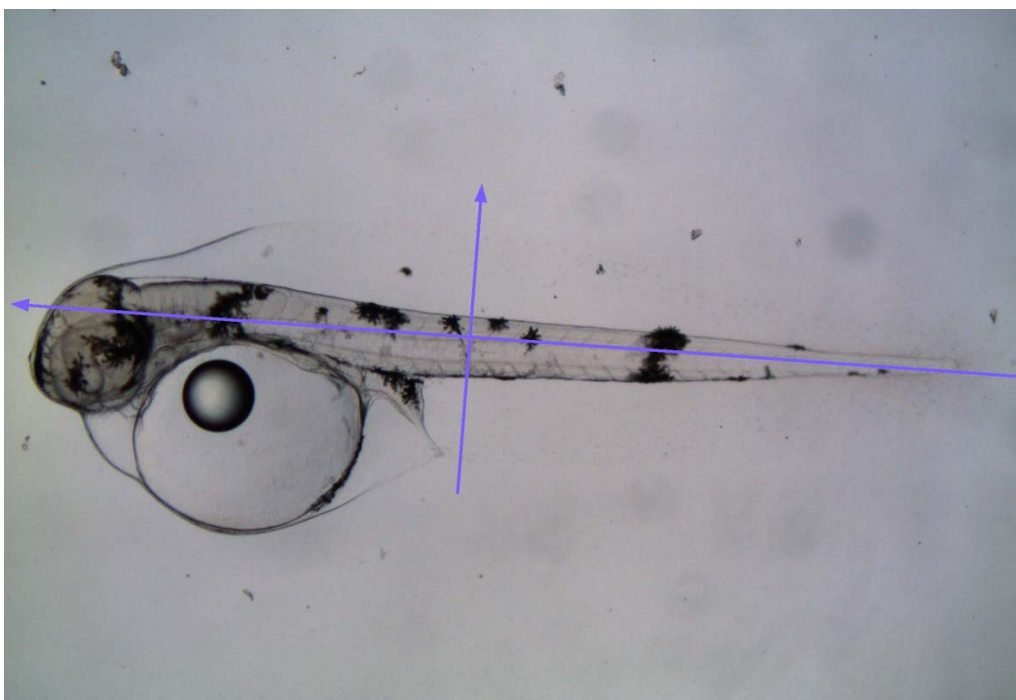
Ύψος Λεκιθικού Σάκου ή YsD: το μέγιστο ύψος του λεκιθικού σάκου

Διάμετρος Σταγόνας Λιπιδίων ή LD: η μέση διάμετρος

Προκογχικό Μήκος ή prOr: από το ρύγχος ως το πρόσθιο άκρο του οφθαλμού

Διάμετρος Οφθαλμού ή ED: η μέση διάμετρος

Όλα τα μήκη μετρήθηκαν παράλληλα με τον νοητό επιμήκη άξονα του σώματος, ενώ όλα τα ύψη κάθετα στον ίδιο άξονα (**Εικόνα 2.5**) και (**Εικόνα 2.6**).



Εικόνα 2.6. Φωτογραφική απεικόνιση των κάθετων αξόνων μορφομετρίας με το ImageJ.

Επίσης, υπολογίσθηκε και ο όγκος τόσο του λεκιθικού σάκου όσο και της σταγόνας λιπιδίων. Για τον πρώτο όγκο χρησιμοποιήθηκε ο τύπος κατά Blaxter and Hempel (1963):

$$YsV = (\pi/6) * YsL * YsD^2$$

Ο όγκος της σταγόνας λιπιδίων υπολογίσθηκε από τον τύπο του όγκου της σφαίρας, ο οποίος δίνεται από την εξίσωση:

$$LV = (4/3) * \pi * LD^3$$

2.3.5 Συμπεριφορά

Από την εκκόλαψη μέχρι και την ολοκλήρωση του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου πραγματοποιήθηκε προσπάθεια παρακολούθησης της συμπεριφοράς των ατόμων του μυτακιού. Κυρίως μελετήθηκε η κατανομή των λεκιθοφόρων νυμφών στη στήλη του νερού των πειραματικών ενυδρείων καθώς και η αντίδραση τους σε μηχανικά ερεθίσματα.

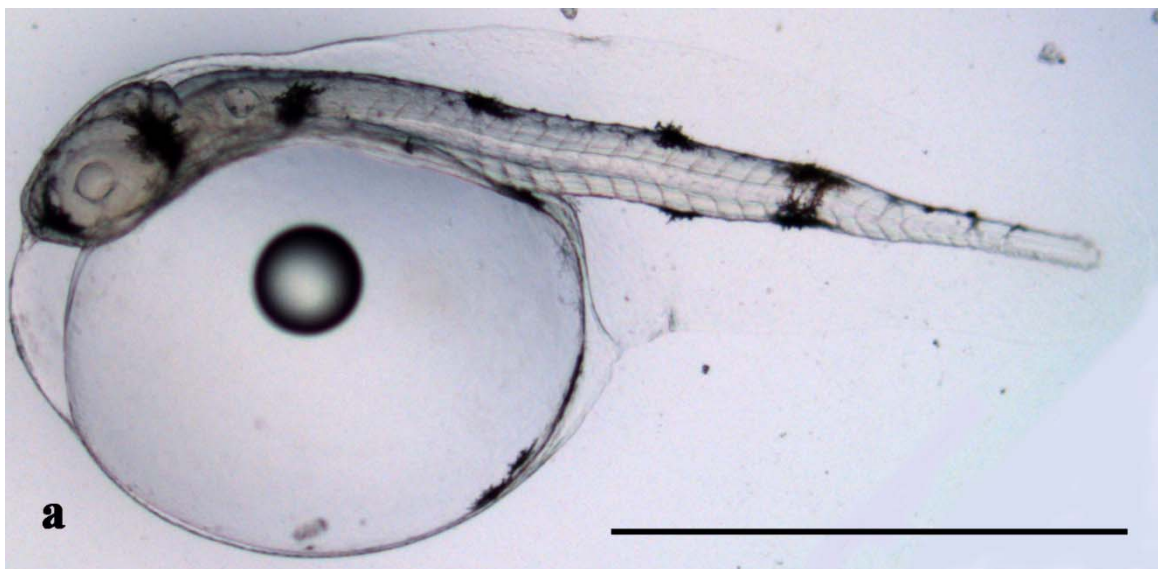
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μορφολογική ανάπτυξη των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo*

Κατά την έναρξη του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου (yolk sac stage), τα άτομα του μυτακιού δεν διαφέρουν από τα έμβρυα λίγο πριν από την εκκόλαψη. Έτσι αμέσως μετά την εκκόλαψη οι νύμφες του μυτακιού φέρουν ένα λεκιθικό σάκο, ωοειδούς σχήματος, στην πρόσθια και κοιλιακή περιοχή του σώματος, που εκτείνεται από το ρύγχος της κεφαλής μέχρι και την έδρα (**Εικόνα 3.1**). Ο λεκιθικός σάκος καταλαμβάνει περίπου το μισό του ολικού μήκους της νεο-εκκολαπτόμενης νύμφης, ενώ έχει περίπου κατά δύο φορές μεγαλύτερο ύψος από το σωματικό ύψος της νύμφης (YsL/TL ίσο με 0,49 και YsD/BD ίσο με 1.93, αντίστοιχα).

Η λέκιθος είναι ομογενής, άχρωμη και διαφανής, η δε σταγόνα των λιπιδίων βρίσκεται εντός του λεκιθικού σάκου. Όπως και στα αυγά, η περιφέρεια της σταγόνας των λιπιδίων σε μικροσκοπική παρατήρηση αλλά και στις φωτογραφίες, φέρει μαύρο δακτύλιο εξαιτίας υψηλής διαθλαστικότητας.



Εικόνα 3.1 Φωτογραφική απεικόνιση νύμφης του *D. puntazzo*, μετά την εκκόλαψη.

Το σώμα, σε όλο σχεδόν το μήκος του, από την κορυφή της κεφαλής (στο ύψος των οφθαλμών) μέχρι το ουραίο τμήμα, γύρω από αυτό και προσθίως του κορμού μέχρι το οπίσθιο άκρο του λεκιθικού σάκου, περιβάλλεται από την πρωτογενή περιφερειακή πτερυγιοπτυχή. Αυτή είναι διαφανής και λεπτή. Το πρόσθιο τμήμα του σώματος είναι κεκαμμένο προς τα κάτω, εξαιτίας της στενής επαφής της περιοχής της κεφαλής με το λεκιθικό σάκο. Οι οφθαλμοί είναι άχρωμοι και στο κέντρο τους διακρίνονται οι καλά σχηματισμένοι φακοί κρυσταλλίνης.

Το πεπτικό σύστημα της νεο-εκκολαπτόμενης νύμφης του μυτακιού αποτελείται από κλειστή στοματική κοιλότητα υπό κατασκευή, αδιαμόρφωτο και ευθυτενή γαστρικό σωλήνα που εκτείνεται μέχρι πίσω από το λεκιθικό σάκο, διακόπτοντας την πτερυγιοπτυχή, για να καταλήξει στην έδρα η οποία είναι ακόμη κλειστή. Η νηκτική κύστη (swim bladder) είναι καλά σχηματισμένη χωρίς να έχει πληρωθεί με αέρα, ενώ βρίσκεται σε στενή επαφή με το γαστρικό σωλήνα.

Η καρδιά που είναι ήδη λειτουργική από το εμβρυακό στάδιο, είναι τοποθετημένη πρόσθια και ραχιαία του λεκιθικού σάκου. Το οπίσθιο άκρο της, μέσω του περικαρδίου και της περιλεκιθικής μεμβράνης, επικοινωνεί με εκτεταμένο δίκτυο αγγείων που είναι αναπτυγμένο στο εσωτερικό του λεκιθικού σάκου (Russell, 1976). Η αναπνοή στο στάδιο αυτό είναι δερμική και πραγματοποιείται κυρίως με τη βοήθεια της πρωτογενούς περιφερειακής πτερυγιοπτυχής μιας και, τόσο τα βραγχιακά τόξα (gill arches) όσο και τα βραγχιακά νημάτια (gill filaments), δεν είναι πλήρως σχηματισμένα (Jobling, 1995). Η πρωτογενής περιφερειακή πτερυγιοπτυχή δομείται από κύτταρα με λεπτά τοιχώματα τα οποία επιτρέπουν τη διόδο των αερίων κατά την ανταλλαγή τους (Jobling, 1995).

Στο πρόσθιο τμήμα της κεφαλής, μπροστά από τους οφθαλμούς και κοντά στο ρύγχος, βρίσκονται οι οσφρητικές ή ρινικές κοιλότητες (nostrils). Οι δομές των αισθητήριων των μηχανικών ερεθισμάτων που θα συνδεθούν αργότερα με την πλευρική γραμμή και το εσωτερικό της ακουστικής κοιλότητας, είναι σχηματισμένες από την αρχή του σταδίου.

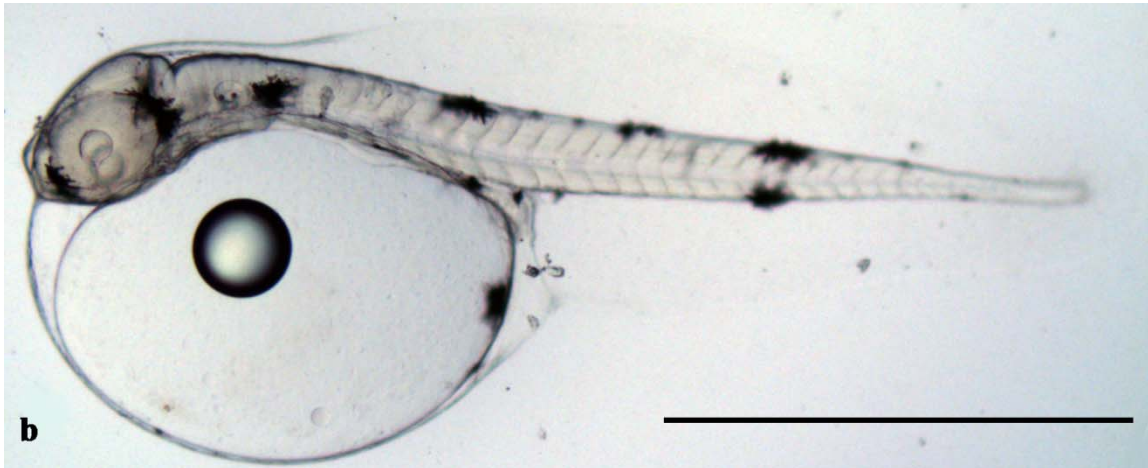
Τέλος, η νεοεκκολαπτόμενη νύμφη του μυτακιού δεν φέρει κανένα σχηματισμένο πτερύγιο. Ο συνολικός αριθμός των μυομερών (myomere) κυμάνθηκε από 24 έως 26, με τους 9-10 να βρίσκονται στο προεδρικό τμήμα του κορμού.

Στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εκκόλαψη μέχρι και το τέλος του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου, μια σειρά από μορφολογικές αλλαγές και λειτουργικές αναβαθμίσεις οργάνων λαμβάνει χώρα. Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιούνται έχοντας ουσιαστικά σαν στόχο την προετοιμασία της λεκιθοφόρας νύμφης του μυτακιού για την έναρξη της εξωγενούς θρέψης. Όπως και στο εμβρυικό στάδιο, έτσι και στις λεκιθοφόρες νύμφες του μυτακιού βρέθηκε ότι η θερμοκρασία επηρεάζει τον χρόνο εμφάνισης ενός αναπτυξιακού γεγονότος όταν αυτός εκφράζεται σε απόλυτες τιμές (ώρες μετά την εκκόλαψη – Μ.Ε.) (Πίνακας 3.1). Αντίθετα, με την έκφραση του χρόνου ως RT_i (% ποσοστό του ολικού χρόνου του σταδίου) η εξέλιξη του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου του μυτακιού φάνηκε να είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας.

Πίνακας 3.1 Λεκιθοφόρα νυμφική ανάπτυξη του *D. puntazzo* στους 21 και 23°C.

ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ	21°C		23°C	
	ΧΡΟΝΟΣ (h)	Rti (%)	ΧΡΟΝΟΣ (h)	Rti (%)
Εκκόλαψη	0.00'	0,00	0.00'	0,00
Έναρξη χρωματισμού των οφθαλμών	4.00'	6,25	4.00'	7,69
Εντερικός αυλός	16.00'	25,00	12.00'	23,08
Προσκόλληση σταγόνας λιπιδίων	24.00'	37,50	20.00'	38,46
Ουρητήρας	24.00'	37,50	20.00'	38,46
Σχηματισμός θωρακικών πτερυγίων	32.00'	50,00	28.00'	53,85
Εντερικός βρόγχος	32.00'	50,00	28.00'	53,85
Εμφάνιση κάτω σιαγόνας	36.00'	56,25	28.00'	53,85
Έναρξη ανάπτυξης ήπατος	52.00'	81,25	40.00'	76,92
Λειτουργικό στόμα	56.00'	87,50	44.00'	84,62
Άνοιγμα στόματος	56.00'	87,50	44.00'	84,62
Στομάχι	56.00'	87,50	44.00'	84,62
Μαύρισμα οφθαλμών	60.00'	93,75	48.00'	92,31
Άνοιγμα έδρας	60.00'	93,75	48.00'	92,31
Απορρόφηση λεκιθικών απόθεματων	64.00'	100,00	52.00'	100,00
Τέλος σταδίου	64.00'	100,00	52.00'	100,00

Σε χρόνο 4h μετά τη γονιμοποίηση ή Μ.Γ. για τους 21°C και τους 23°C ή 6.25% και 7.69% RT_i, αντίστοιχα, κάνουν την εμφάνισή τους τα πρώτα χρωματοφόρα κύτταρα στην επιφάνια των οφθαλμών τους (**Εικόνα 3.2**).

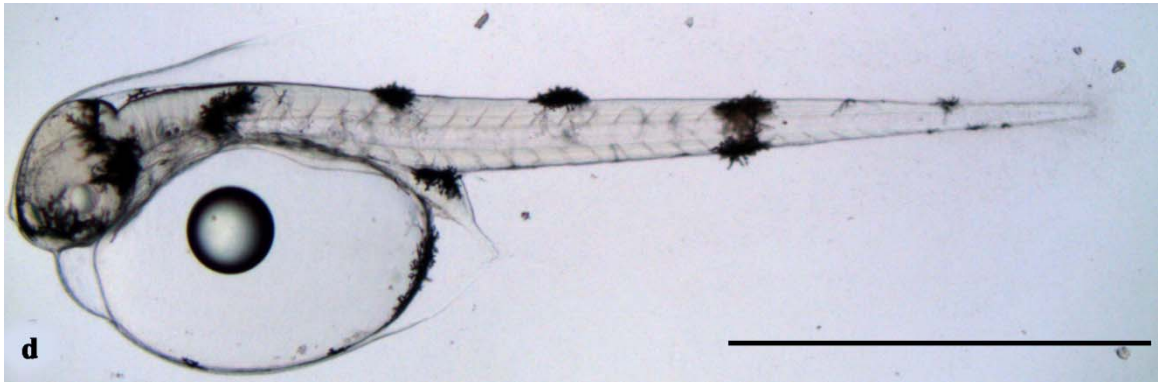


Εικόνα 3.2 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 4 hours M.E., στους 21°C.

Με την εξέλιξη του σταδίου ο αριθμός τους θα αυξάνεται (**Εικόνα 3.3 και 3.4**), μέχρι που θα καταλάβουν ολόκληρη την επιφάνειά τους (στο τέλος του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου).

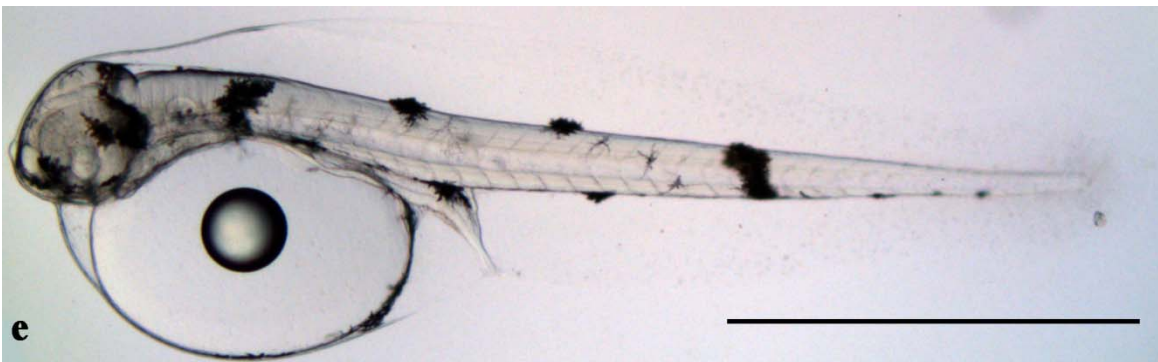


Εικόνα 3.3 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 8 hours M.E., στους 21°C.

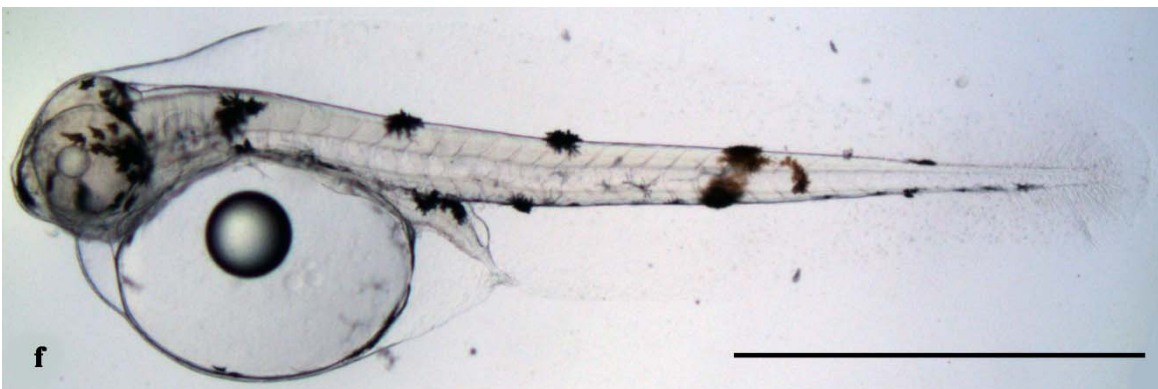


Εικόνα 3.4 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 12 hours M.E., στους 21°C.

Ο γαστρικός σωλήνας ξεκίνησε να διαφοροποιείται, αρχής γενομένης με το τμήμα του εντέρου και το σχηματισμό του εντερικού αυλού 16-20h M.E. για τους 21°C και 12-16h Μ.Γ. για τους 23°C ή 25.00-31.25% και 23.08-30.77% RT_i, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.5 και 3.6**).

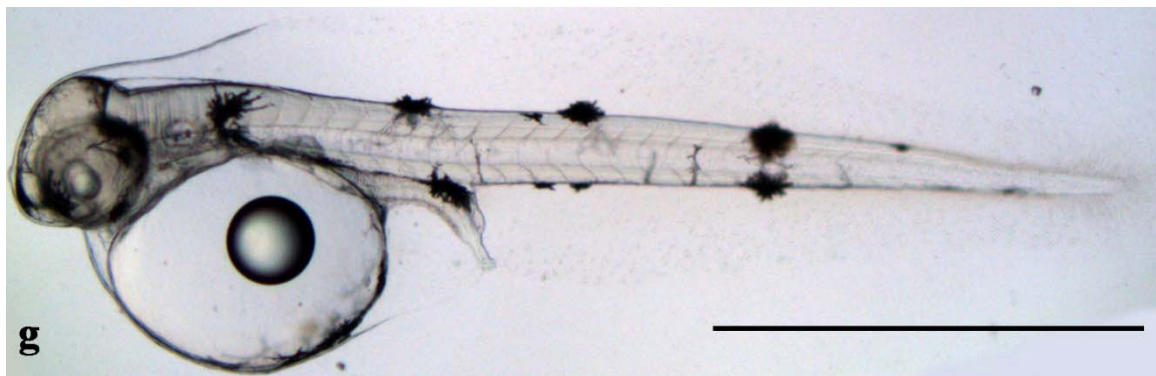


Εικόνα 3.5 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 16 hours M.E., στους 21°C.

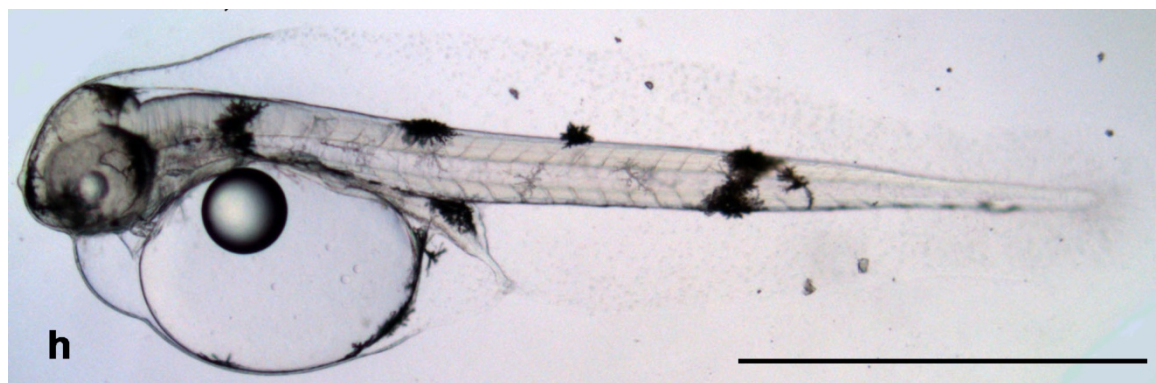


Εικόνα 3.6 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 20 hours M.E., στους 21°C.

Στην συνέχεια παρατηρείται προσκόλληση της σταγόνας λιπιδίων στην εσωτερική μεμβράνη ραχιαία του λεκιθικού σάκου (24-28h M.E. για τους 21°C και 20-24h M.E. για τους 23°C ή 37.50-43.75% και 38.46-46.15% RT_i, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.7 και 3.8), ενώ ταυτόχρονα πίσω και σε μικρή απόσταση από το έντερο ο ουρητήρας έγινε ορατός. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η σταγόνα λιπιδίων προσκολλήθηκε σε μικρό αριθμό ατόμων, όπου στα περισσότερα των οποίων δεν προσκολλήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του σταδίου.



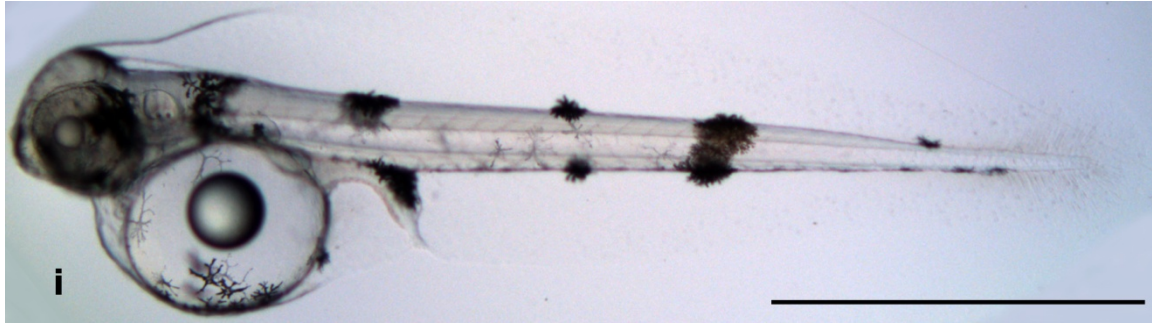
Εικόνα 3.7 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 24 hours M.E., στους 21°C.



Εικόνα 3.8 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 28 hours M.E., στους 21°C.

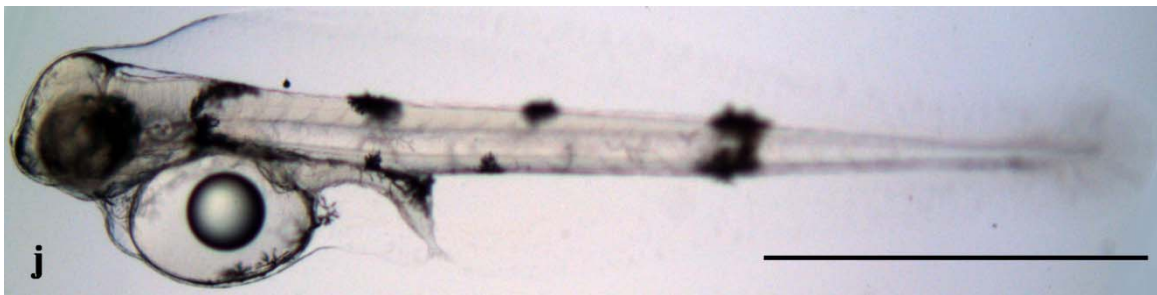
Την ίδια στιγμή το μοντέλο κατανομής των χρωματοφόρων διατηρήθηκε σταθερά το ίδιο με αυτό του τέλους του εμβρυακού σταδίου, με μόνη διαφορά τον αυξημένο αριθμό των χρωματοφόρων κυττάρων στις ίδιες περιοχές, ιδιαίτερα στο ύψος του 17-18^{ου} μυομερούς όπου σχηματίστηκε έντονο σημάδι (spot).

Η έναρξη του σχηματισμού των θωρακικών πτερυγίων παρατηρήθηκε 32h M.E. για τους 21°C και 28h M.E. για τους 23°C ή 50.00% και 53.85% RT_i, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.9).



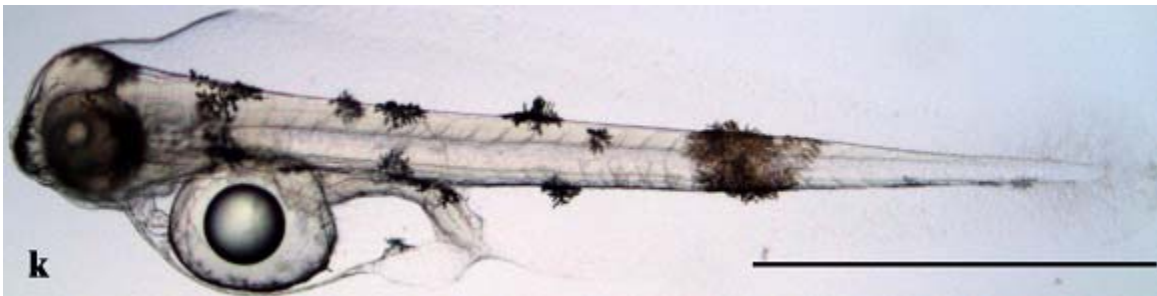
Εικόνα 3.9 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 32 hours M.E., στους 21°C.

Η διαφοροποίηση του πεπτικού συστήματος ουσιαστικά ξεκινάει με το σχηματισμό του εντερικού βρόγχου (32h M.E. για τους 21°C και 28h M.E. για τους 23°C ή 50.00% και 53.85% RT_i, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.9**), και της κάτω σιαγώνας (36h M.E. για τους 21°C και 28h M.E. για τους 23°C ή 56.25% και 53.85% RT_i, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.10**).

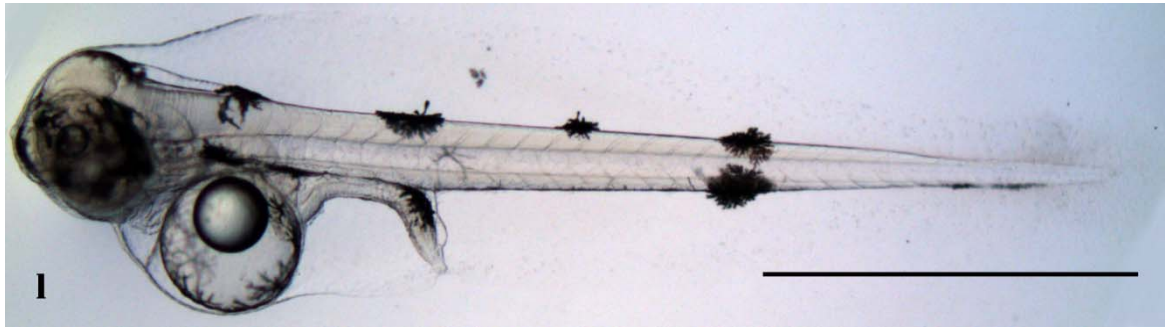


Εικόνα 3.10 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 36 hours M.E., στους 21°C.

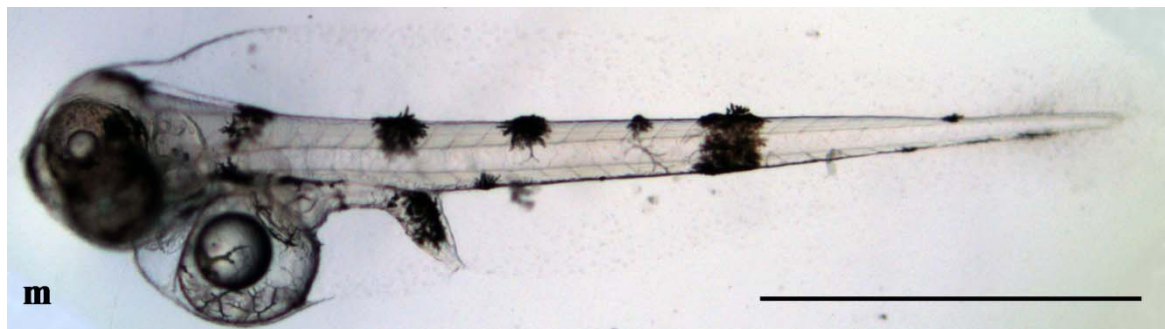
Τις επόμενες ώρες θα συνεχίσει η απορρόφηση των λεκιθικών αποθεμάτων με αποτέλεσμα η κεφαλή να ελευθερωθεί τελείως από το λεκιθικό σάκο (40-44-48h M.E. για τους 21°C και 32-36h M.E. για τους 23°C ή 62.50-68.75-75.00% και 61.54-69.23% RT_i, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.11**) (**Εικόνα 3.12**) και (**Εικόνα 3.13**).



Εικόνα 3.11 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 40 hours M.E., στους 21°C.

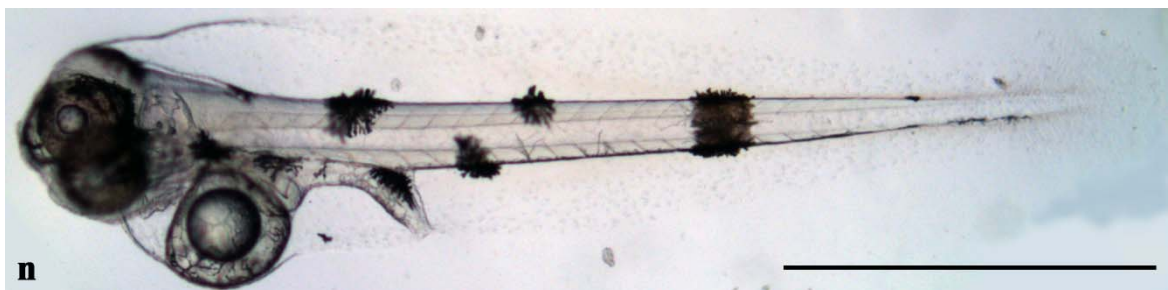


Εικόνα 3.12 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 44 hours M.E., στους 21°C.

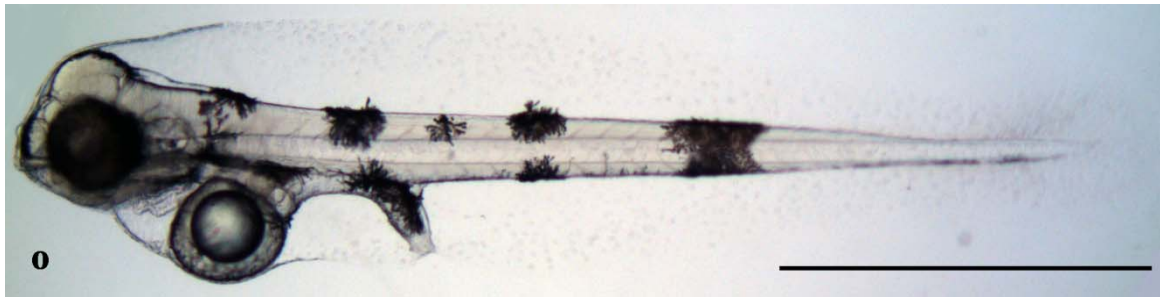


Εικόνα 3.13 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 48 hours M.E., στους 21°C.

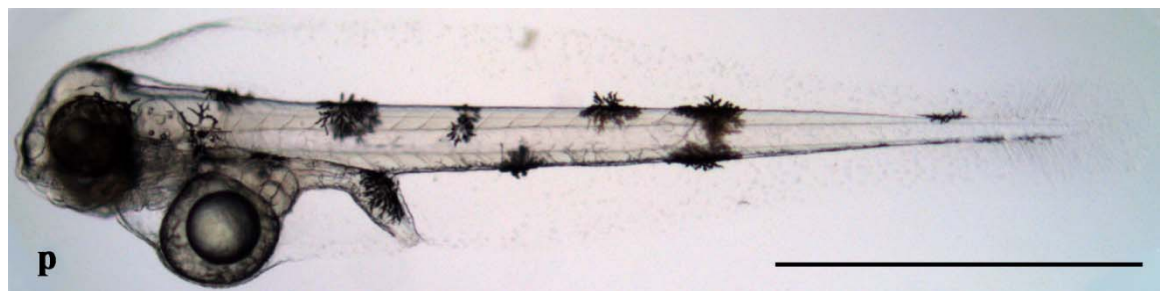
Συνέχεια στη διαφοροποίηση του πεπτικού συστήματος έχει ο σχηματισμός του ήπατος μπροστά και σε μικρή απόσταση από τη σταγόνα λιπιδίων, μέσα στο λεκιθικό σάκο (52h M.E. για τους 21°C και 40h M.E. για τους 23°C ή 81.25% και 76.92% RT_i, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.14**), της στοματικής κοιλότητας και του στομάχου (56h M.E. για τους 21°C και 44h M.E. για τους 23°C ή 87.50% και 84.62% RT_i, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.15**), και τέλος το άνοιγμα της έδρας (60h M.E. για τους 21°C και 48h M.E. για τους 23°C ή 93.75% και 92.31% RT_i, αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.16**).



Εικόνα 3.14 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 52 hours M.E., στους 21°C.

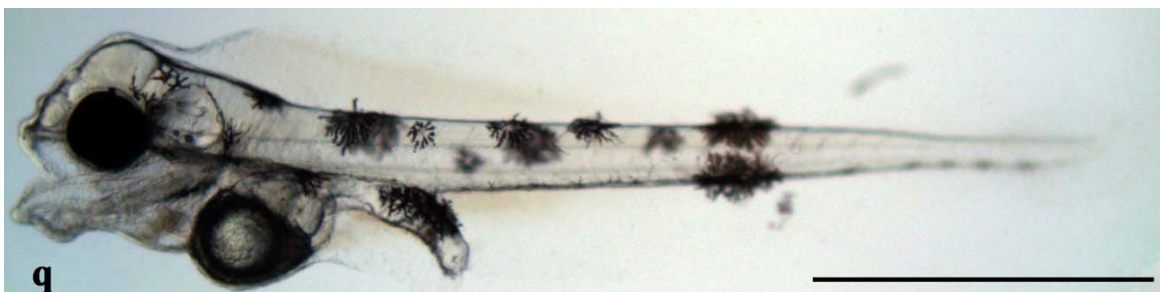


Εικόνα 3.15 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 56 hours M.E., στους 21°C.



Εικόνα 3.16 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 60 hours M.E., στους 21°C.

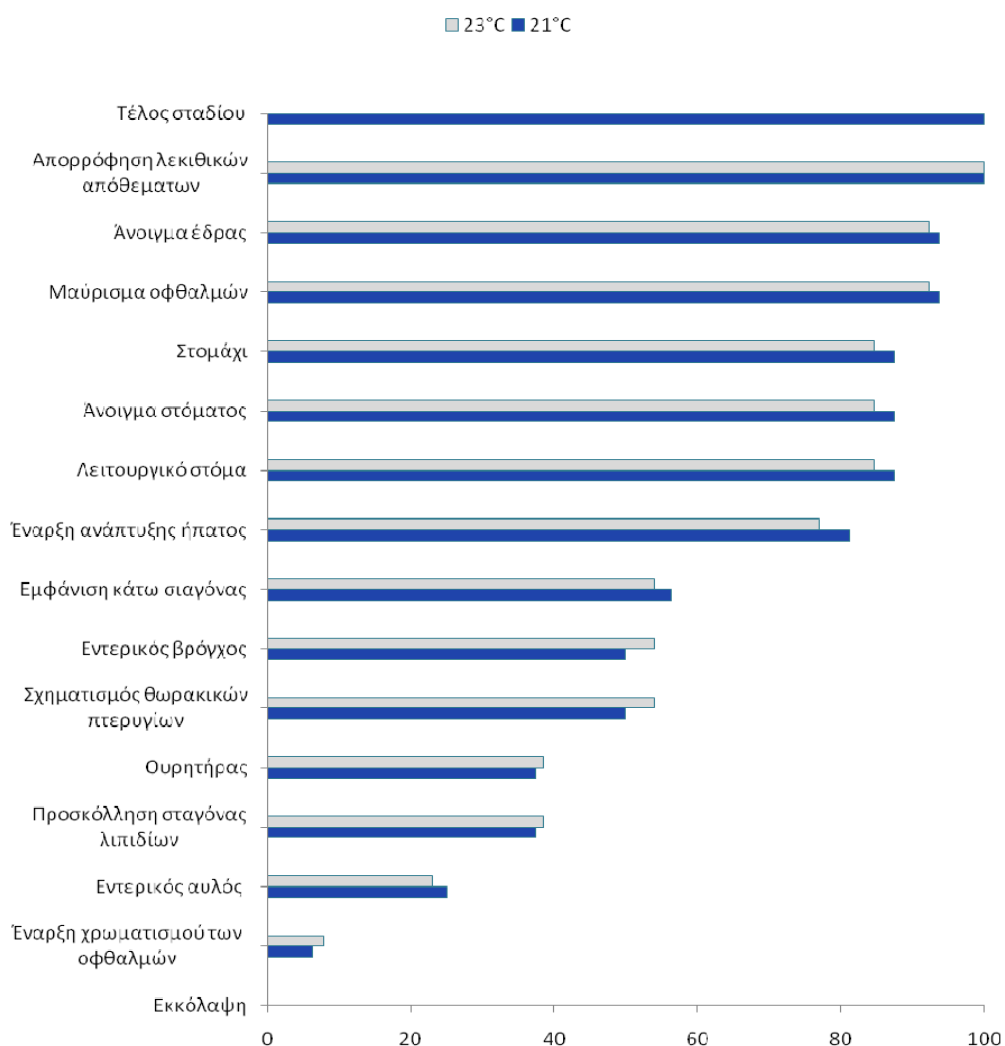
Σε χρόνο 60h M.E. για τους 21°C και 48h M.E. για τους 23°C ή 93.75% και 92.31% RT_i, αντίστοιχα) η επιφάνεια των οφθαλμών έχει καλυφθεί πλήρως με μελανοφόρα και εμφανίζεται έντονα χρωματισμένη μαύρη. Τα μιομερή της προεδρικής περιοχής φαίνεται να είναι πλέον 7. Το μοντέλο του χρωματισμού φαίνεται στην **Εικόνα 3.16**, όπου εντοπίζονται κυρίως ραχιαία σημεία συγκέντρωσης μελανοφόρων, με το spot (δαχτυλίδι) να παραμένει στο 17-18^ο μιομερές, ενώ και στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου εντοπίζεται συγκέντρωση χρωματοφόρων.



Εικόνα 3.17 Λεκιθοφόρα νύμφη του *D. puntazzo*, 64 hours M.E., στους 21°C.

Η λήξη του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου σηματοδοτείται με την πλήρη απορρόφηση των λεκιθικών αποθεμάτων (64h M.E. για τους 21°C και 52h M.E. για τους 23°C ή 100.00% RT_i). Με τη λήξη του σταδίου η σταγόνα των λιπιδίων δεν έχει πλήρως καταναλωθεί (Εικόνα 3.18).

Η πορεία της μορφολογικής ανάπτυξης των λεκιθοφόρων νυμφών του μυτακιού βάσει του σχετικού χρόνου RT_i και για τις δυο θερμοκρασίες του μέσου καλλιέργειας (21 και 23°C) παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 3.19.



Εικόνα 3.19 Γράφημα της λεκιθοφόρας νυμφικής ανάπτυξης του *D. puntazzo* σε σχέση με το σχετικό χρόνο RT_i και για τις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες (21 και 23°C).

3.2 Μορφομετρική ανάπτυξη των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo*

Αμέσως μετά την εκκόλαψη οι νύμφες στο μυτάκι έχουν ολικό μήκος 2.179 ± 0.019 mm και 2.046 ± 0.044 mm, στους 21 και 23°C αντίστοιχα (από 2.147 έως 2.198 mm για τους 21°C και από 1.999 έως 2.110 mm για τους 23°C) (Πίνακας 3.2) και (Πίνακας 3.3). Χαρακτηρίζονται από έναν ευμεγέθη λεκιθικό σάκο με μέσο μήκος 1.065 ± 0.014 mm και 0.981 ± 0.016 mm, στους 21 και 23°C αντίστοιχα (από 1.046 έως 1.080 mm για τους 21°C και από 0.967 έως 1.010 mm για τους 23°C), μέσο ύψος 0.802 ± 0.016 mm και 0.741 ± 0.024 mm, στους 21 και 23°C αντίστοιχα (από 0.775 έως 0.819 mm για τους 21°C και από 0.700 έως 0.765 mm για τους 23°C), και μέσο όγκο 0.359 ± 0.017 mm³ και 0.282 ± 0.014 mm³, στους 21 και 23°C αντίστοιχα (από 0.334 έως 0.379 mm³ για τους 21°C και από 0.259 έως 0.297 mm³ για τους 23°C). Μια σταγόνα λιπιδίων μέσης διαμέτρου 0.219 ± 0.006 mm και 0.210 ± 0.002 mm, στους 21 και 23°C αντίστοιχα (από 0.211 έως 0.224 mm για τους 21°C και από 0.206 έως 0.211 mm για τους 23°C), και μέσου όγκου 0.006 ± 0.000 mm³ και 0.005 ± 0.000 mm³, στους 21 και 23°C αντίστοιχα (από 0.005 έως 0.006 mm³ για τους 21°C και από 0.005 έως 0.005 mm³ για τους 23°C) εμφανίζεται στο κέντρο σχεδόν του λεκιθικού σάκου.

Το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο ολοκληρώθηκε στους μεν 21°C 64 ώρες, στους δε 23°C 52 ώρες μετά την εκκόλαψη, με τα λεκιθικά αποθέματα να έχουν πλήρως απορροφηθεί, ενώ η σταγόνα λιπιδίων να υπάρχει ακόμη (με μέση διάμετρο 0.191 ± 0.005 mm και 0.198 ± 0.002 mm στους 21 και 23°C αντίστοιχα).

Μέχρι το σχετικό χρόνο RT_i ίσο με περίπου 25% και στις δύο πειραματικές θερμοκρασιακές συνθήκες, το ολικό μήκος παρουσιάζει ταχύτατη αύξηση, ενώ όσο προχωράει το στάδιο ο ρυθμός αυτής της αύξησης μειώνεται (μέχρι το σχετικό χρόνο 60-70%), για να μηδενισθεί σχεδόν μέχρι το τέλος του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου (Εικόνα 3.20). Παρόμοιο μοντέλο εξέλιξης παρουσιάζει και το νωτοχορδικό μήκος NL.

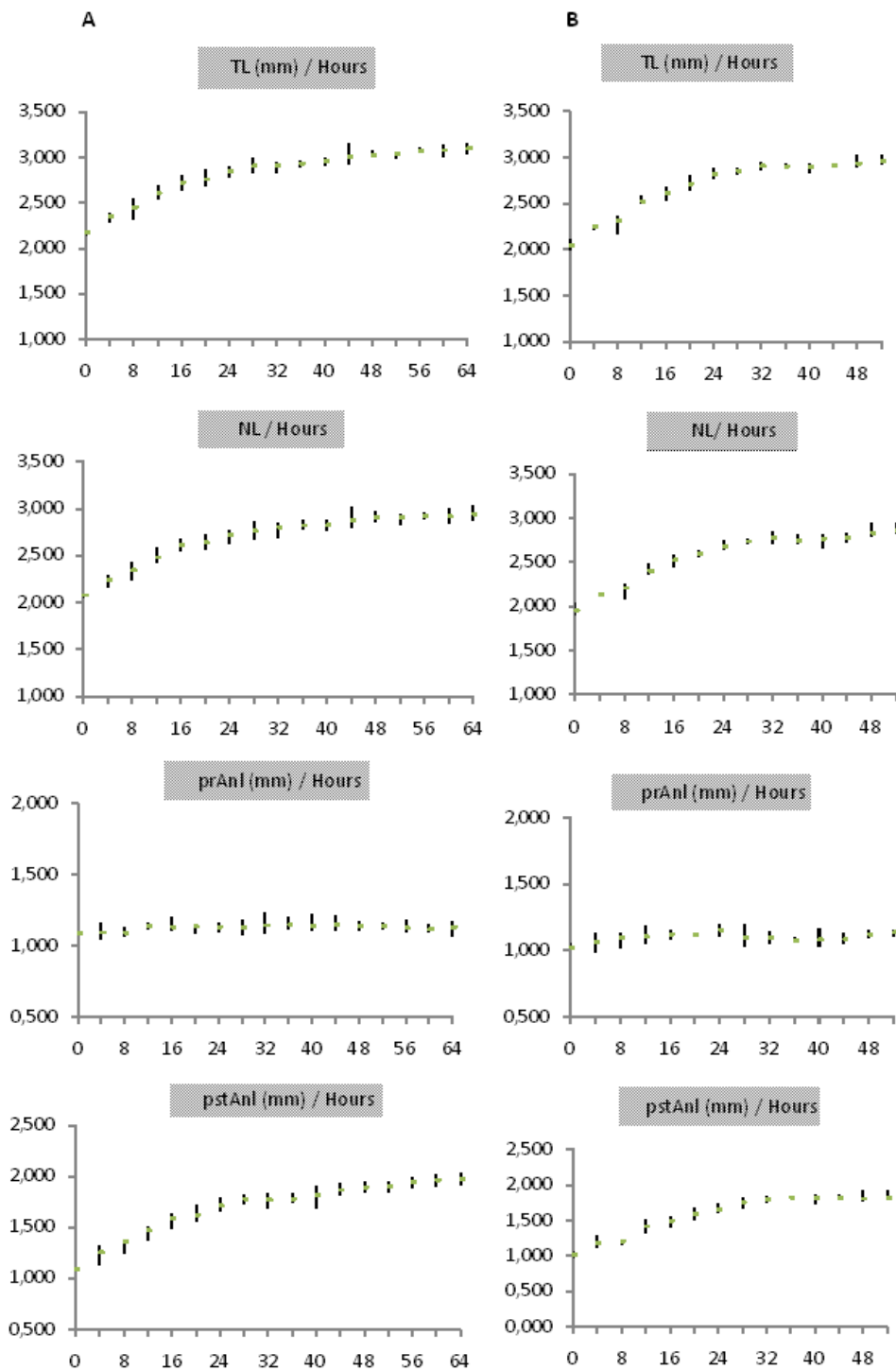
Το ολικό μήκος των λεκιθοφόρων νυμφών του μυτακιού στο τέλος του αυτότροφου σταδίου μετρήθηκε 3.102 ± 0.046 mm και 2.956 ± 0.041 mm, στους 21 και 23°C αντίστοιχα (από 3.045 έως 3.160 mm για τους 21°C και από 2.925 έως 3.030 mm για τους 23°C). Η μείωση του όγκου του λεκιθικού σάκου και της σταγόνας λιπιδίων στο χρόνο φαίνεται να ακολουθεί εκθετικό πρότυπο εξέλιξης και στις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες. Τα θρεπτικά αποθέματα των νυμφών του μυτακιού καταναλώνονται με διαφορετικό ρυθμό στις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες. Επίσης, διαφορετικό ρυθμό κατανάλωσης εμφανίζει το ίδιο θρεπτικό απόθεμα μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών (Εικόνα 3.20).

Πίνακας 3.2 Εξέλιξη των μορφομετρικών χαρακτήρων (AVER: μέση τιμή και S.D.: τυπική απόκλιση) των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo* στους 21°C.

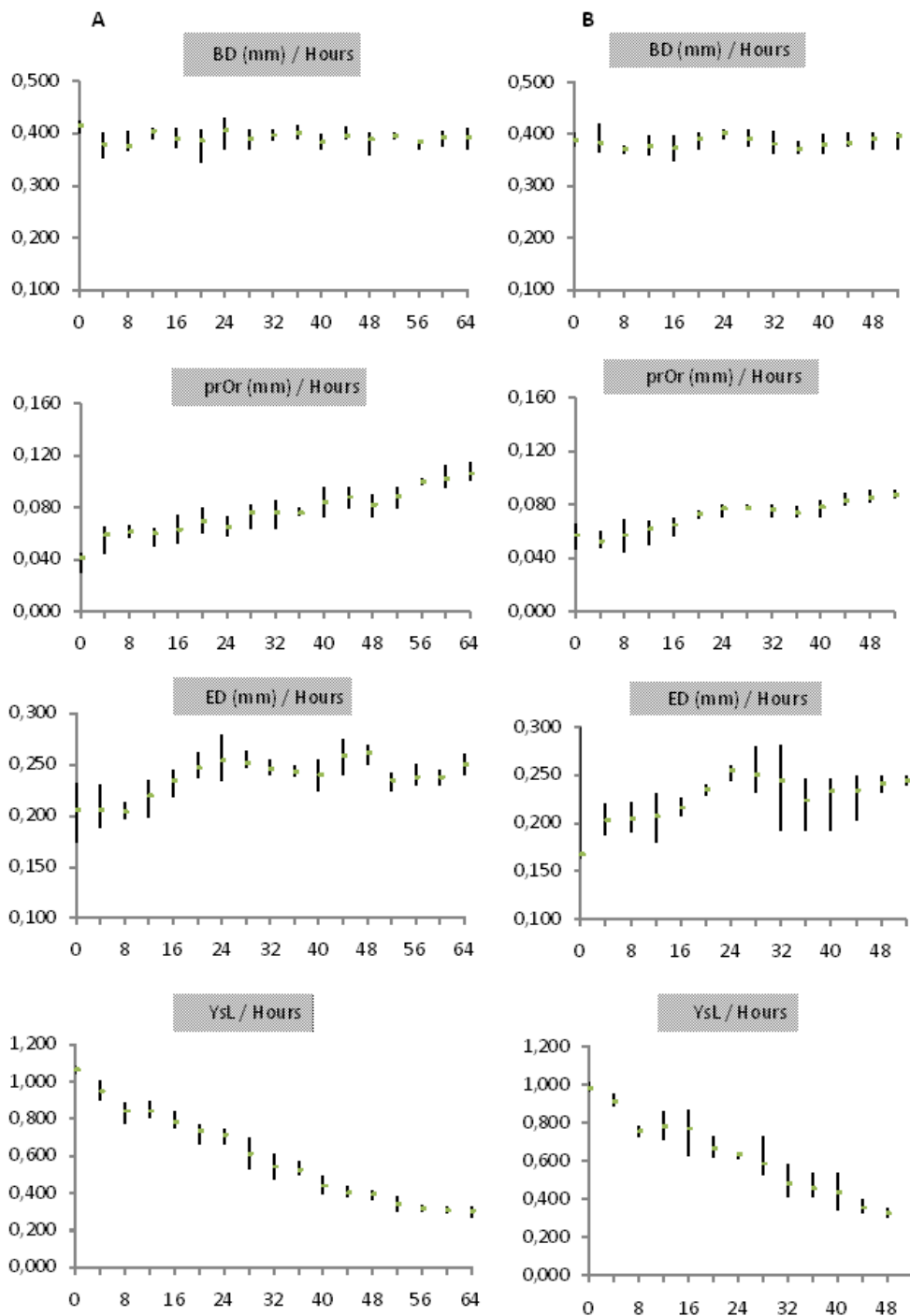
ΔΕΙΓΜΑ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																	
ΣΥΝ. Μ.Ε.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64																	
ΧΑΡΑΚΤ.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.	AVER. S.D.																	
TL	2,176	0,019	2,350	0,036	2,453	0,083	2,608	0,048	2,728	0,042	2,759	0,053	2,845	0,053	2,907	0,068	2,916	0,044	2,930	0,023	2,939	0,032	3,013	0,061	3,031	0,027	3,041	0,027	3,074	0,015	3,080	0,057	3,102	0,046
NL	2,080	0,016	2,239	0,048	2,345	0,072	2,480	0,047	2,617	0,038	2,638	0,058	2,716	0,058	2,762	0,080	2,803	0,052	2,822	0,038	2,825	0,042	2,880	0,067	2,908	0,035	2,908	0,040	2,920	0,023	2,917	0,067	2,943	0,061
BD	0,416	0,008	0,380	0,020	0,377	0,025	0,405	0,006	0,390	0,013	0,386	0,018	0,406	0,029	0,390	0,013	0,397	0,007	0,401	0,009	0,384	0,010	0,396	0,008	0,389	0,016	0,396	0,005	0,384	0,009	0,393	0,010	0,392	0,014
ED	0,206	0,022	0,206	0,018	0,204	0,006	0,220	0,015	0,234	0,009	0,247	0,009	0,254	0,016	0,252	0,006	0,246	0,006	0,243	0,004	0,240	0,011	0,239	0,013	0,262	0,008	0,235	0,007	0,238	0,007	0,238	0,005	0,250	0,007
prOr	0,041	0,006	0,059	0,009	0,061	0,004	0,060	0,005	0,063	0,007	0,069	0,007	0,065	0,005	0,076	0,007	0,076	0,011	0,076	0,002	0,084	0,008	0,088	0,006	0,082	0,007	0,089	0,007	0,100	0,001	0,102	0,007	0,106	0,004
prYs	0,034	0,009	0,117	0,020	0,147	0,021	0,152	0,034	0,218	0,028	0,250	0,024	0,272	0,013	0,281	0,022	0,320	0,013	0,344	0,023	0,368	0,044	0,391	0,026	0,382	0,014	0,436	0,031	0,429	0,030	0,449	0,050	0,452	0,020
pstYs	1,081	0,007	1,053	0,046	0,997	0,039	0,995	0,013	0,989	0,014	0,970	0,028	0,953	0,032	0,881	0,049	0,859	0,068	0,802	0,057	0,801	0,048	0,783	0,031	0,782	0,025	0,774	0,015	0,748	0,013	0,756	0,059	0,748	0,021
pr-Anl	1,085	0,007	1,092	0,040	1,091	0,023	1,135	0,015	1,132	0,025	1,134	0,023	1,132	0,022	1,126	0,049	1,142	0,042	1,148	0,037	1,138	0,035	1,144	0,028	1,137	0,027	1,139	0,014	1,124	0,025	1,117	0,018	1,129	0,032
pst-Anl	1,094	0,014	1,258	0,071	1,362	0,081	1,472	0,038	1,596	0,056	1,625	0,045	1,713	0,067	1,780	0,030	1,774	0,061	1,782	0,027	1,821	0,084	1,869	0,036	1,894	0,033	1,902	0,031	1,950	0,025	1,963	0,054	1,973	0,031
YsL	1,065	0,014	0,950	0,044	0,943	0,040	0,843	0,030	0,784	0,027	0,734	0,035	0,716	0,038	0,612	0,053	0,543	0,050	0,524	0,026	0,440	0,032	0,402	0,017	0,394	0,017	0,344	0,025	0,318	0,012	0,307	0,012	0,304	0,015
YsD	0,802	0,016	0,646	0,061	0,571	0,066	0,561	0,030	0,536	0,021	0,536	0,025	0,530	0,021	0,449	0,027	0,431	0,033	0,375	0,027	0,366	0,043	0,383	0,011	0,370	0,021	0,316	0,025	0,300	0,026	0,297	0,022	0,283	0,008
YsV	0,359	0,017	0,211	0,048	0,147	0,039	0,139	0,019	0,127	0,010	0,110	0,011	0,106	0,013	0,065	0,012	0,054	0,012	0,039	0,008	0,032	0,010	0,031	0,003	0,028	0,004	0,018	0,004	0,015	0,003	0,014	0,002	0,013	0,001
LD	0,219	0,006	0,217	0,003	0,213	0,006	0,213	0,002	0,213	0,006	0,208	0,003	0,209	0,003	0,206	0,004	0,204	0,003	0,206	0,003	0,202	0,007	0,203	0,003	0,198	0,004	0,198	0,004	0,197	0,003	0,196	0,004	0,191	0,005
LV	0,006	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,004	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	0,004	0,000	0,004	0,000
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Πίνακας 3.3 Εξέλιξη των μορφομετρικών χαρακτήρων (AVER: μέση τιμή και S.D.: τυπική απόκλιση) των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo* στους 23°C.

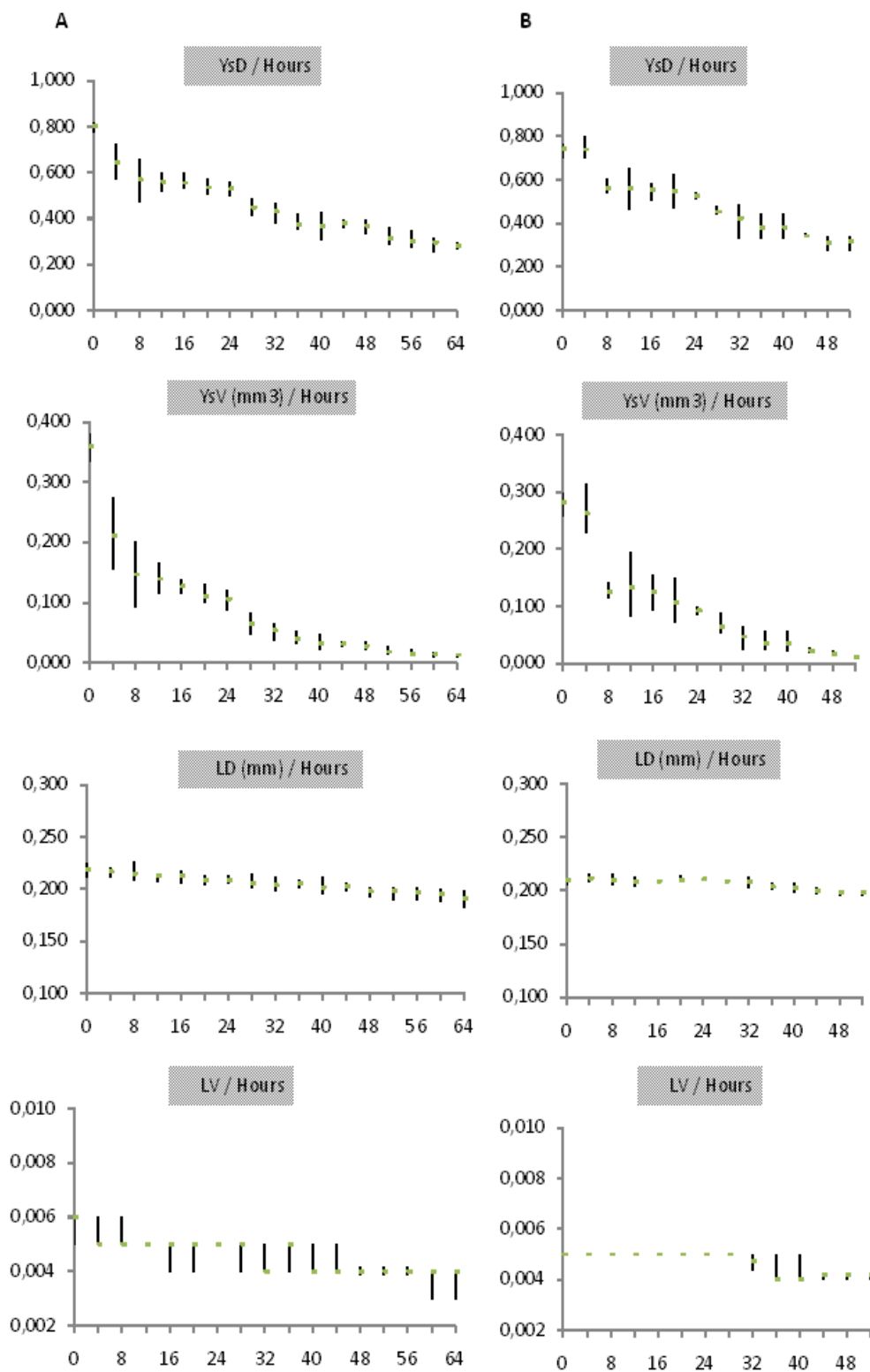
ΔΕΙΓΜΑ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14																	
ΩΡΕΣ/Μ.Ε.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52																	
ΧΑΡΑΚΤ.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.	AVER.	S.D.															
TL	2,046	0,044	2,246	0,019	2,312	0,054	2,525	0,064	2,617	0,043	2,715	0,048	2,816	0,041	2,856	0,026	2,907	0,026	2,904	0,011	2,902	0,026	2,911	0,011	2,933	0,038	2,956	0,041			
NL	1,954	0,051	2,132	0,009	2,209	0,049	2,401	0,040	2,525	0,051	2,602	0,023	2,679	0,043	2,736	0,022	2,776	0,022	2,776	0,054	2,743	0,044	2,768	0,048	2,781	0,029	2,835	0,041	2,861	0,043	
BD	0,390	0,009	0,384	0,024	0,371	0,006	0,377	0,014	0,374	0,019	0,391	0,012	0,403	0,005	0,391	0,014	0,382	0,014	0,382	0,014	0,372	0,008	0,381	0,011	0,384	0,010	0,391	0,011	0,396	0,013	
ED	0,168	0,003	0,203	0,014	0,205	0,015	0,207	0,020	0,216	0,006	0,235	0,004	0,255	0,005	0,250	0,018	0,244	0,025	0,244	0,025	0,224	0,022	0,233	0,017	0,234	0,013	0,241	0,005	0,244	0,005	
prOr	0,057	0,006	0,053	0,005	0,057	0,011	0,062	0,006	0,065	0,005	0,073	0,002	0,077	0,004	0,077	0,002	0,077	0,003	0,077	0,003	0,074	0,002	0,078	0,005	0,083	0,003	0,085	0,003	0,087	0,002	
prY's	0,039	0,005	0,161	0,039	0,168	0,032	0,170	0,015	0,174	0,018	0,219	0,029	0,253	0,015	0,273	0,015	0,342	0,038	0,346	0,045	0,342	0,062	0,365	0,062	0,365	0,008	0,405	0,034	0,408	0,043	
pstY's	1,017	0,013	1,024	0,058	1,003	0,038	0,961	0,059	0,937	0,098	0,883	0,023	0,898	0,011	0,866	0,068	0,822	0,025	0,805	0,023	0,805	0,023	0,788	0,064	0,793	0,020	0,739	0,035	0,753	0,041	
pr-Anl	1,025	0,016	1,064	0,064	1,100	0,037	1,104	0,048	1,121	0,052	1,120	0,003	1,155	0,025	1,099	0,059	1,100	0,033	1,077	0,012	1,081	0,012	1,081	0,036	1,085	0,032	1,122	0,023	1,137	0,020	
pst-Anl	1,021	0,030	1,183	0,056	1,212	0,021	1,421	0,066	1,497	0,052	1,595	0,050	1,661	0,036	1,757	0,047	1,807	0,022	1,827	0,013	1,821	0,013	1,821	0,039	1,826	0,030	1,811	0,041	1,819	0,056	
YsL	0,981	0,016	0,912	0,028	0,757	0,023	0,783	0,048	0,772	0,091	0,667	0,038	0,638	0,009	0,587	0,079	0,484	0,033	0,457	0,033	0,437	0,033	0,437	0,076	0,357	0,020	0,327	0,017	0,200	0,042	
YsD	0,741	0,024	0,740	0,039	0,562	0,025	0,562	0,073	0,533	0,033	0,549	0,049	0,527	0,009	0,453	0,014	0,424	0,046	0,379	0,041	0,382	0,045	0,342	0,045	0,342	0,006	0,310	0,020	0,316	0,026	
YsV	0,282	0,014	0,262	0,034	0,125	0,013	0,133	0,041	0,125	0,026	0,107	0,025	0,093	0,004	0,064	0,013	0,047	0,013	0,035	0,011	0,035	0,013	0,022	0,002	0,017	0,003	0,010	0,002			
LD	0,210	0,002	0,211	0,002	0,210	0,004	0,209	0,003	0,209	0,001	0,210	0,002	0,211	0,000	0,209	0,001	0,208	0,004	0,204	0,002	0,203	0,003	0,200	0,003	0,200	0,002	0,199	0,002	0,198	0,002	
LV	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	0,000	0,005	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	0,004	0,000	
n	10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10		10



Εικόνα 3.20 Εξέλιξη των μορφομετρικών χαρακτήρων των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo* σε σχέση με το χρόνο για τους 21 (A) και τους 23°C (B).



Εικόνα 3.20 (συνέχεια) Εξέλιξη των μορφομετρικών χαρακτήρων των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo* σε σχέση με το χρόνο για τους 21 (A) και τους 23°C (B).



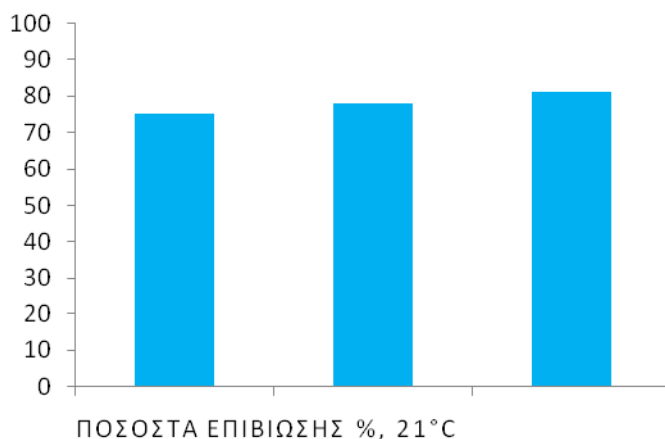
Εικόνα 3.20 (συνέχεια) Εξέλιξη των μορφομετρικών χαρακτήρων των λεκιθοφόρων νυμφών του *D. puntazzo* σε σχέση με το χρόνο για τους 21 (A) και τους 23°C (B).

Γενικά, η κατανάλωση της λεκίθου πραγματοποιείται με εντονότερο ρυθμό σε σχέση με τη σταγόνα λιπιδίων και στις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες, ενώ στους 23°C εμφανίζεται με το μεγαλύτερο ρυθμό κατανάλωσης. Ο όγκος της λεκίθου μειώνεται στο 50% του αρχικού όγκου μόλις σε 8 ώρες μετά την εκκόλαψη στους 21°C και στους 23°C. Στο ίδιο χρονικό διάστημα η σταγόνα λιπιδίων ουσιαστικά δεν έχει χρησιμοποιηθεί καθόλου από τις λεκιθοφόρες νύμφες του μυτακιού και στις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες. Μέχρι τις 40h Μ.Ε. για τους 21°C και 36h Μ.Ε. για τους 23°C ή 62.54% και 69.23% RTi αντίστοιχα, έχει καταναλωθεί περίπου το 91% και το 88% (για τους 21°C και 23°C αντίστοιχα) των λεκιθικών αποθεμάτων, ενώ η μείωση του όγκου της λεκίθου μετά το σημείο αυτό πραγματοποιείται με χαμηλότερους ρυθμούς. Αντίθετα, στην αντίστοιχη χρονική περίοδο, ο όγκος της σταγόνας των λιπιδίων ακολουθεί πιο αργό και γραμμικό ρυθμό μείωσης. Με την ολοκλήρωση του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου οι διαστάσεις του λεκιθικού σάκου μηδενίζονται (η μεμβρανική δομή υπάρχει ακόμη, αλλά τα λεκιθικά αποθέματα έχουν πλήρως εξαντληθεί). Αντίθετα, η σταγόνα λιπιδίων παραμένει ακόμη αρκετά μεγάλη (με μέση διάμετρο 0.191 mm και 0.198 mm στους 21°C και στους 23°C, αντίστοιχα).

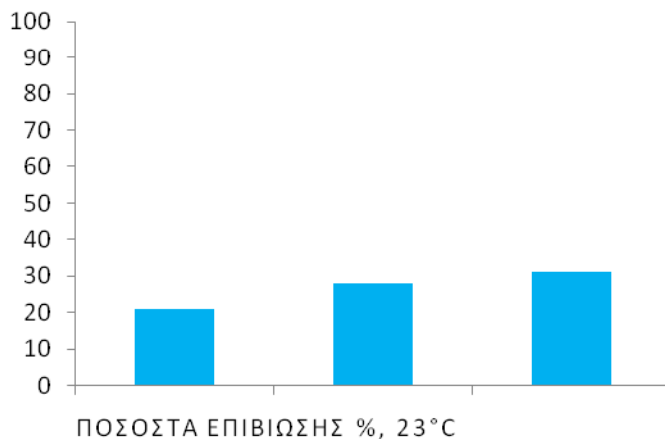
Αναφορικά με την εξέλιξη των υπόλοιπων μετρικών χαρακτηρισμών, στην πλειοψηφία τους βρέθηκε να ακολουθούν το ίδιο πρότυπο εξέλιξης, ανεξάρτητα της θερμοκρασιακής συνθήκης. Συγκεκριμένα, οι μεταβολές του προεδρικού (prAnI) και μεταεδρικού (pstAnI) τμήματος του κορμού, φανερώνουν ότι η αύξηση του ολικού μήκους κατά την πάροδο του χρόνου εκδηλώνεται κυρίως στο μεταεδρικό τμήμα (**Εικόνα 3.20**). Το πρότυπο εξέλιξης του TL που περιγράφεται στην αρχή αυτής της θεματικής ενότητας παρατηρείται επίσης στο μήκος της νωτοχορδής NL αλλά και στο pstAnI. Επίσης το προκογχικό μήκος (prOr) αυξάνεται εκθετικά μεν αλλά με πολύ χαμηλότερο ρυθμό και στις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες. Από την άλλη, τόσο το ύψος του σώματος BD όσο και η διάμετρος του οφθαλμού ED παρουσιάζουν μικρή μεταβολή στη διάρκεια του σταδίου και στις δυο θερμοκρασιακές συνθήκες. Όσο αφορά το BD, παρουσιάζεται να μεν αύξηση του πάχους του καθαρού κορμού, αλλά μείωση του πάχους της πρωτογενούς περιφερειακής πτερυγιοπτυχής, ενώ το ED επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των χρωματοφόρων κυττάρων.

3.3 Ποσοστά επιβίωσης και συμπεριφορά

Η εκτίμηση του αριθμού των λεκιθοφόρων νυμφών αμέσως μετά την ολοκλήρωση του σταδίου για κάθε ενυδρείο χωριστά και σε κάθε πειραματική θερμοκρασία έδειξε ότι, τα ποσοστά επιβίωσης κυμάνθηκαν από 75, 78 και 81% για τους 21°C (Εικόνα 3.21) έως 21, 28 και 31% στους 23°C (Εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.21 Ποσοστά επιβίωσης (% του συνόλου νυμφών) του *D. pumtazzo* στους 21°C.



Εικόνα 3.22 Ποσοστά επιβίωσης (% του συνόλου νυμφών) του *D. pumtazzo* στους 23°C.

Τέλος, όσο αφορά τη συμπεριφορά τους, οι λεκιθοφόρες νύμφες του μυτακιού δείχνουν να αντιδρούν στα μηχανικά ερεθίσματα αμέσως την πρώτη ημέρα μετά την εκκόλαψη. Επίσης, οι λεκιθοφόρες νύμφες του είδους αυτού καταλαμβάνουν ολόκληρη την κατακόρυφη στήλη του νερού με ομοιόμορφη διασπορά. Λόγω της έλλειψης πτερυγίων η κίνηση των νυμφών του σταδίου είναι παθητική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Οντογένεση

Η νεοεκκολαπτόμενη νύμφη του μυτακιού φέρει ογκώδη ομογενή και άχρωμο λεκιθικό σάκο, ο οποίος καταλαμβάνει σχεδόν το πρόσθιο μισό του σώματος, ξεκινώντας από το ρύγχος της κεφαλής μέχρι την έδρα, με μια σταγόνα λιπιδίων σχεδόν στο μέσον του σάκου. Διαφοροποιήσεις των ορίων του λεκιθικού σάκου σε άλλα είδη της οικογένειας των Sparidae έχουν διαπιστωθεί στην τσιπούρα (Κουμουνδούρος, 1993). Συγκεκριμένα, ο λεκιθικός σάκος στη νύμφη της τσιπούρας στην εκκόλαψη εκτείνεται μπροστά από το ρύγχος μέχρι λίγο πιο μπροστά από την έδρα. Σχετικά με τη θέση της σταγόνας λιπιδίων, σε όλα τα Sparidae φυσιολογικά τοποθετείται στο οπίσθιο όριο του σάκου (Kentouri, 1985) και όχι στο κέντρο του.

Το μέγεθος του λεκιθικού σάκου έχει βρεθεί ότι εξαρτάται κυρίως από τις διαστάσεις του αυγού και από την ποσότητα της λεκίθου η οποία έχει καταναλωθεί από το έμβρυο πριν την εκκόλαψη (Mosser, 1996), καθιστώντας έτσι το χαρακτήρα αυτό χωρίς ιδιαίτερη συστηματική αξία. Σε αντίθεση με τη θέση της σταγόνας των λιπιδίων που εκτός από ταξινομική φαίνεται ότι έχει και καλλιεργητική σημασία, χωρίς ωστόσο η θεωρία αυτή να είναι πλήρως τεκμηριωμένη. Τόσο το γεγονός ότι το ήπαρ ξεκινά να δομείται μέσα στο λεκιθικό σάκο όσο και η στενή σύνδεση του με τη σταγόνα λιπιδίων, μπορούν να θέσουν βάσιμες υποψίες για την υπόθεση της εμφάνισης ανωμαλιών στην ανάπτυξη λόγω απομάκρυνσης της σταγόνας από τη φυσιολογική της θέση, επιδρώντας στο ρυθμό απορρόφησής της.

Στην παρούσα μελέτη η πλειοψηφία των νεο-εκκολαπτόμενων νυμφών του μυτακιού φέρει σταγόνα λιπιδίων απομακρυσμένη από τη θέση των υπόλοιπων μελετημένων Sparidae (οπίσθιο όριο λεκιθικού σάκου). Επίσης, η προσκόλλησή της στον κορμό της νύμφης καθυστερεί σημαντικά (24 ώρες μετά την εκκόλαψη, τη στιγμή που στην τσιπούρα και το λιθρίνι πραγματοποιείται μόλις 4 ώρες Μ.Ε.), σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη της συγκεκριμένης οικογένειας ή και δεν ενώθηκε σε κάποια άτομα ποτέ.

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων έδειξε ότι η χρήση των λεκιθικών αποθεμάτων ακολουθεί υψηλότερους ρυθμούς από αυτούς της σταγόνας λιπιδίων κατά τη διάρκεια ολόκληρου του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου. Διαφορετικός ρυθμός κατανάλωσης των λεκιθικών και λιπιδικών αποθεμάτων κατά τη διάρκεια του αυτότροφου σταδίου έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη ψαριών, εντός και εκτός της οικογένειας των Sparidae (Ronnestad *et al.*, 1994). Η ικανοποίηση των θρεπτικών αναγκών κατά τη διάρκεια της οντογένεσης πραγματοποιείται από διαφορετικές κάθε φορά πηγές ενέργειας, αρχικά κατά το εμβρυακό στάδιο από τα ελεύθερα αμινοξέα, και στη συνέχεια κατά το

λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο κύρια από τις πρωτεΐνες και δευτερευόντως από τα λιπαρά οξέα (Ronnestad *et al.*, 1994, 1998). Στο μεταβατικό στάδιο αλλαγής της ενδογενούς με την εξωγενή θρέψη τα λεκιθικά αποθέματα εξαντλούνται πλήρως ενώ τα λιπιδικά είναι εκείνα που θα στηρίξουν ενεργειακά τις νύμφες στις πρώτες μέρες του νυμφικού σταδίου.

Το πρότυπο της μορφολογικής ανάπτυξης των λεκιθοφόρων νυμφών του μυτακιού δεν διαφέρει από το αντίστοιχο των υπολοίπων ειδών της οικογένειας Sparidae (Κουμουνδούρος, 1993 - Κουμουνδούρος, 1998 - Κλημογιάννη, 2004), ενώ η μελέτη του αποδεικνύει τη στενή σχέση μεταξύ της μορφολογικής και λειτουργικής οντογένεσης. Συγκεκριμένα, το πεπτικό αποτελεί το σύστημα που ξεκινάει πρώτο τη διαφοροποίηση στα επιμέρους τμήματα και όργανά του (εντερικός σωλήνας, στομάχι, έδρα, ουρητήρας, σιαγόνες, ήπαρ), ενώ ο σχηματισμός των θωρακικών πτερυγίων που συμβάλει στην αύξηση της κολυμβητικής ικανότητας των ατόμων διαφοροποιείται δευτερευόντως. Ταυτόχρονα, στα πλαίσια της προετοιμασίας των λεκιθοφόρων νυμφών για την εξωγενή θρέψη, σχηματίζονται δομές αντίληψης των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (οφθαλμοί, οσφρητικά κυστίδια, νευρομαστοί). Η λειτουργία της αναπνοής σταματάει να επιτελείται από την πρωτογενή περιφερειακή πτερυγιοπτυχή προς το τέλος του αυτότροφου σταδίου με τις αρχές του νυμφικού σταδίου, όπου και αρχίζει η ανάπτυξη των τελικών αναπνευστικών δομών (βραγχιακά τόξα).

Οι Hoar και Randall (1969) απέδειξαν την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων οι οποίοι διαθέτουν την ικανότητα αύξησης ή και μείωσης τόσο των κυττάρων χρωματισμού όσο και της έντασης του χρωματισμού τους. Στους παραπάνω παράγοντες συγκαταλέγονται και οι συνθήκες εκτροφής των ατόμων. Ο Hunter (1984) απέδειξε ότι, αν και η ένταση του χρωματισμού κάτω από συνθήκες αιχμαλωσίας παρουσιάζεται μεγαλύτερη από αυτή των ελεύθερων πληθυσμών, λόγω διαστολής των κυττάρων αυτών (Marliave, 1988), ο αριθμός και οι θέσεις των χρωματοφόρων παραμένουν οι ίδιες. Έτσι, η περιγραφή του πρότυπου κατανομής των κυττάρων χρωματισμού παρότι πραγματοποιήθηκε από εκτρεφόμενα άτομα δεν περιορίζει την ταξινομική τους αξία (Russell, 1976). Όπως και στο εμβρυακό στάδιο, έτσι και στις λεκιθοφόρες νύμφες του μυτακιού το πρότυπο κατανομής των μελανοφόρων της μεταεδρικής περιοχής φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει αξιόλογο ταξινομικό χαρακτήρα.

Το ολικό μήκος της νεο-εκκολαπτόμενης νύμφης στο μυτάκι βρέθηκε να είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό των υπόλοιπων ειδών της οικογένειας Sparidae, εκτός από αυτό του λιθρινιού, ενώ ταυτόχρονα το ολικό μήκος στο ξεκίνημα της εξωγενούς θρέψης στο μυτάκι είναι παρόμοιο με αυτό του λιθρινιού (Klimogianni *et al.*, 2004). Η εξέλιξη της

αύξησης των λεκιθοφόρων νυμφών του μυτακιού όπως παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη, περιλαμβάνει ένα μικρό σε διάρκεια αρχικό διάστημα ταχύτατου ρυθμού. Η ταχύτατη αύξηση του ολικού μήκους εντοπίζεται κυρίως στην αρχή του σταδίου, αλλά και η μετέπειτα χαμηλότερων ρυθμών αύξηση, εντοπίζονται κυρίως στο μεταεδρικό τμήμα του σώματος, πιθανώς ως μια έκφραση της αναγκαιότητας αύξησης της κολυμβητικής ικανότητας των ατόμων στο επόμενο στάδιο. Χαρακτηριστικά παρατηρήθηκε ότι μέχρι τις 24 hours ME το ολικό μήκος παρουσίασε ταχύτατη αύξηση, γεγονός που συνοδεύτηκε με ραγδαία μείωση του όγκου του λεκιθικού σάκου, ο οποίος έφτασε στο 50% του αρχικού όγκου μόλις 8h ME. Από την άλλη, η πτώση του ρυθμού αύξησης συμβαδίζει χρονικά με την έναρξη της ανάπτυξης δομών και οργάνων που σχετίζονται κυρίως με τη θρέψη.

Η οντογένεση της συμπεριφοράς των λεκιθοφόρων νυμφών του μυτακιού εμφανίζεται σε συμφωνία με αυτή της τσιπούρας (Kentouri, 1985) και του λιθρινιού (Κλημογιάννη, 2004) και διαφωνία με τη συναγρίδα (Κουμουνδούρος, 1998). Οι λεκιθοφόρες νύμφες του μυτακιού, του λιθρινιού και της τσιπούρας δείχνουν να αντιδρούν στα μηχανικά ερεθίσματα μια ημέρα μετά την εκκόλαψη, ενώ η συναγρίδα αναπτύσσει την ικανότητα αντίληψης των μηχανικών ερεθισμάτων μόλις 16 ώρες μετά την εκκόλαψη.

4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας

Στα είδη της οικογένειας Sparidae είναι διαδεδομένη η εκκόλαψη των αυγών σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη δομική και λειτουργική αδυναμία διατροφής των νεο-εκκολαπτόμενων νυμφών (Kentouri, 1985 - Divanach, 1985). Κατά το αυτότροφο στάδιο τα άτομα στηρίζουν τη θρέψη τους στα μητρικής προέλευσης πρωτεϊνικά και λιπίδια αποθέματα (Klaoudatos *et al.*, 1990 - Gorodilov, 1996), με αποτέλεσμα η ανάπτυξή της να εξαρτάται άμεσα από τις αβιοτικές παραμέτρους του μέσου καλλιέργειας (Watanabe and Kiron, 1994). Η θερμοκρασία έχει αποδειχθεί ότι είναι ο παράγοντας που δυναμικά επηρεάζει την οντογένεση των αυτότροφων ατόμων (Marangos *et al.*, 1986 - Polo *et al.*, 1991 - Watanabe *et al.*, 1995). Από την παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται ο ρόλος του παράγοντα αυτού στην οντογένεση, στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης.

Οι υπό διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες εκτρεφόμενοι πληθυσμοί παρουσιάζουν όμοιο πρότυπο μορφολογικής ανάπτυξης. Η εμβρυακή και λεκιθοφόρα νυμφική 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. Η αναπτυξιακή σταθερότητα του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου ως προς το σχετικό χρόνο εμφάνισης των διαφόρων μορφολογικών χαρακτήρων ανεξαρτήτου θερμοκρασίας έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη ψαριών (Johnston, 1993 - Koumoundouros *et al.*, 2001). Αντίθετα, η διάρκεια των σταδίων εμφανίζεται διαφοροποιημένη με τη θερμοκρασία όταν ο χρόνος εκφράζεται με τις απόλυτες τιμές του (Marangos *et al.*, 1986 – Polo *et al.*, 1991). Η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει την παραπάνω θεωρία, πιστοποιώντας ότι η διάρκεια του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου του μυτακιού μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν τα κριτήρια κατά Kendall *et al.* (1984) οριοθέτησης των σταδίων όπου οι χρόνοι στους οποίους έλαβαν χώρα τα διάφορα αναπτυξιακά γεγονότα για το λεκιθοφόρο νυμφικό μετρήθηκαν με αφετηρία το χρονικό σημείο όπου το 50% των αυγών του πληθυσμού έχει εκκολαφθεί, ενώ το τέλος του σταδίου του λεκιθοφόρου νυμφικού ορίζεται με την πλήρη απορρόφηση των λεκιθικών αποθεμάτων. Η εξάρτηση του ρυθμού απορρόφησης των λεκιθικών αποθεμάτων του μυτακιού από τη θερμοκρασία του μέσου καλλιέργειας είναι συνεχής. Η διαπίστωση ότι η απορρόφηση των λεκιθικών αποθεμάτων καθορίζεται άμεσα από τη θερμοκρασία δεν είναι πρωτότυπη, με την παραπάνω εξάρτηση να έχει παρατηρηθεί τόσο στη τσιπούρα (Polo *et al.*, 1991), όσο στο λαβράκι (Koumoundouros *et al.*, 2001) αλλά και στο λιθρίνι (Klimogianni *et al.*, 2004).

Το ολικό μήκος των νεοεκκολαπτόμενων νυμφών του μυτακιού καθώς και ο ρυθμός αύξησής του κατά τη διάρκεια του σταδίου επηρεάζονται άμεσα από τη θερμοκρασία. Οι Polo *et al.* (1991) παρατήρησαν ότι, οι λεκιθοφόρες νύμφες της τσιπούρας αποκτούν το μεγαλύτερο ολικό μήκος όταν η θερμοκρασία του μέσου καλλιέργειας κυμαίνεται μεταξύ 16 και 19°C. Διαφοροποίηση του TL σε σχέση με τη θερμοκρασία παρουσίασαν, και οι λεκιθοφόρες νύμφες του λαβρακιού (Koumoundouros *et al.*, 2001) αλλά και οι νύμφες λιθρινιού (Klimogianni *et al.*, 2004). Στην παρούσα μελέτη οι λεκιθοφόρες νύμφες του μυτακιού στους 21°C είναι μεγαλύτερες από αυτές των 23°C.

Όπως έχει διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες, στις υψηλότερες θερμοκρασίες εμφανίζονται μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας. Αντίστοιχα, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν τα ποσοστά επιβίωσης των λεκιθοφόρων νυμφών του μυτακιού στους να είναι σημαντικά υψηλότερα στους 21°C από ότι στους 23°C.

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 επιβίωσης, το ολικό μήκος των ατόμων καθώς και η χρονική διάρκεια του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου (Polo *et al.*, 1991 - Koumoundouros *et al.*, 2001 - Klimogianni *et al.*, 2004) 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 λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο όσο αφορά τόσο τα ποσοστά επιβίωσης (πιο υψηλά), όσο και το ολικό μήκος των ατόμων στο τέλος του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου, ενώ από τη σκοπιά της χρονικής διάρκειας πιο σύντομη εμφανίζεται η λεκιθοφόρα νυμφική ανάπτυξη στους 23°C.

Τέλος, η καθυστερημένη προσκόλληση της σταγόνας λιπιδίων στον κορμό της λεκιθοφόρας νύμφης στο μυτάκι φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη μικρή απορρόφησή της μέχρι το τέλος του σταδίου. Μένει να διερευνηθεί σε επόμενη πειραματική προσπάθεια εάν η καθυστέρηση αυτή είναι χαρακτηριστικό του είδους ή αποτελεί δείκτη μειωμένης ποιότητας των αυγών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη της οντογένεσης (ανάπτυξη και αύξηση) του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου στο μυτάκι και κάτω από την επίδραση της θερμοκρασία, συμπεραίνουμε:

- 1.** Η πλειοψηφία των νεο-εκκολαπτόμενων νυμφών του μυτακιού φέρει σταγόνα λιπιδίων απομακρυσμένη από τη θέση των υπόλοιπων μελετημένων Sparidae (οπίσθιο όριο λεκιθικού σάκου). Επίσης, η προσκόλλησή της στον κορμό της νύμφης καθυστερεί σημαντικά, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη της συγκεκριμένης οικογένειας ή και δεν ενώθηκε σε κάποια άτομα ποτέ.
- 2.** Το πρότυπο της μορφολογικής ανάπτυξης των λεκιθοφόρων νυμφών του μυτακιού δεν διαφέρει από το αντίστοιχο των υπολοίπων ειδών της οικογένειας Sparidae, ενώ η μελέτη του αποδεικνύει τη στενή σχέση μεταξύ της μορφολογικής και λειτουργικής οντογένεσης.
- 3.** Όπως και στο εμβρυακό στάδιο, έτσι και στις λεκιθοφόρες νύμφες του μυτακιού το πρότυπο κατανομής των μελανοφόρων της μεταεδρικής περιοχής φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει αξιόλογο ταξινομικό χαρακτήρα.
- 4.** Η λεκιθοφόρα νυμφική ανάπτυξη των πειραματικών πληθυσμών στο μυτάκι, αναφορικά με τον σχετικό χρόνο RT_i σχηματισμού των διαφόρων μορφολογικών χαρακτήρων, εμφανίζεται σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας, ενώ η διάρκεια των σταδίων εμφανίζεται διαφοροποιημένη με τη θερμοκρασία όταν ο χρόνος εκφράζεται με τις απόλυτες τιμές του.
- 5.** Στη παρούσα εργασία το ολικό μήκος των νεοεκκολαπτόμενων νυμφών του μυτακιού και ο ρυθμός αύξησής του κατά τη διάρκεια του σταδίου επηρεάζονται άμεσα από τη θερμοκρασία, καθώς και τα ποσοστά επιβίωσής του.
- 6.** Η καθυστερημένη προσκόλληση της σταγόνας λιπιδίων στον κορμό της λεκιθοφόρας νύμφης στο μυτάκι φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη μικρή απορρόφησή της μέχρι το τέλος του σταδίου. Μένει να διερευνηθεί σε επόμενη πειραματική προσπάθεια εάν η καθυστέρηση αυτή είναι χαρακτηριστικό του είδους ή αποτελεί δείκτη μειωμένης ποιότητας των αυγών.

ABSTRACT / ΠΕΡΙΛΗΨΗ

In the present study the yolk sac larvae 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 aim of the present study was to acquire further knowledge on the yolk sac larval 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 l^{-1} (17.500 eggs per tank) the eggs were placed in three tanks per temperature ($21\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ and $23\pm 0.2^{\circ}\text{C}$) (triplicate) 35 l water volume each. The yolk-sac larval development of *D. puntazzo* was studied in vivo using a stereoscopic microscope (Leica ICCA), while morphometric character (12) with photographs via digital camera (Leica DM100) adapted at microscope. For that, 10 specimens were sampled and photographed every 4 hours. Also, estimated the relative time (RT_i) of each developmental event i as $\text{RT}_i = (t_i/\text{Tsd}) \times 100$.

The total length of newly hatched larvae of *D. puntazzo* was measured 2.179 ± 0.019 mm and 2.046 ± 0.044 mm at 21°C and 23°C , respectively. They were characterized by a large yolk sac with a lipid globule in the middle of this. The TL is significantly less than those of the rest studied sparid species, except of *Pagellus erythrinus*. 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. A reasonable probable cause on this fact seems to be the delay of oil globule adherence from yolk-sac to the larvae body. The comparison of the yolk sac stage between *D. puntazzo* and the above sparid species showed same ontogenetic pattern, with similar estimated relative time of each developmental event. The morphometric characters, the duration (64 and 52 h for 21 and 23°C , respectively) and the survival rates were affected directly from the temperature condition, while the yolk sac larval development, as RT_i , seems to be stable and independent from temperature.

Στην παρούσα μελέτη περιγράφηκε η λεκιθοφόρα νυμφική 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. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απόκτηση γνώσεων τόσο της λεκιθοφόρας νυμφικής ανάπτυξης του *D. puntazzo* όσο και της επίδρασης της θερμοκρασίας, για την ιχθυοκαλλιέργεια και τις μελέτες αλιείας.

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 φωτό και θερμοπεριόδου. Με πυκνότητα 500 αυγά l^{-1} (17.500 αυγά ανά δεξαμενή) τα αυγά τοποθετήθηκαν σε τρεις δεξαμενές ανά θερμοκρασία (εις τριπλούν) 35 l ωφέλιμου όγκου. Η ανάπτυξη των λεκιθοφόρων νυμφών 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, υπολογίσθηκε ο σχετικός χρόνος των αναπτυξιακών γεγονότων ως $RT_i = (t_i/T_{sd}) \times 100$.

Το ολικό μήκος των νέο εκκολαπτόμενων νυμφών του *D. puntazzo* ήταν 2.179 ± 0.019 mm και 2.046 ± 0.044 mm στους 21°C and 23°C , αντίστοιχα. Χαρακτηρίζονται από μεγάλο λεκιθικό σάκο με σταγόνα λιπιδίων στο μέσο του. Το TL είναι πολύ μικρότερο από υπόλοιπα σπαροειδή, εκτός του λιθρινιού. Εξαιτίας της ραγδαίας αύξησης του TL στην αρχή του σταδίου, η κατανάλωση των λεκιθικών αποθεμάτων παρουσιάζεται σημαντικά υψηλότερη την ίδια περίοδο. Από την άλλη, ο όγκος της σταγόνας λιπιδίων δεν μειώθηκε αισθητά. Μια πιθανή αιτία αυτού του γεγονότος φαίνεται να είναι η καθυστερημένη προσκόλληση της σταγόνας στον κορμό της νύμφης. Σύγκριση του λεκιθοφόρου νυμφικού σταδίου του *D. puntazzo* και των υπολοίπων σπαροειδών δείχνει παρόμοιο οντογενετικό μοντέλο, με παρόμοιους σχετικούς χρόνους των αναπτυξιακών γεγονότων. Οι μορφομετρικοί χαρακτήρες, η διάρκεια (64 and 52 h στους 21 and 23°C , αντίστοιχα) και η επιβίωση επηρεάστηκαν άμεσα από τη θερμοκρασιακή συνθήκη, ενώ η λεκιθοφόρα νυμφική ανάπτυξη, ως RT_i , φάνηκε να είναι σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας.

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 Téléostéens). 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, Kjørsvik 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, *Parichthys 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 Κλημογιάννη¹

¹ 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 (F₁ 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 (Micalé *et al.* 1996). Στη Μεσόγειο η περίοδος ωοτοκίας εκτείνεται 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

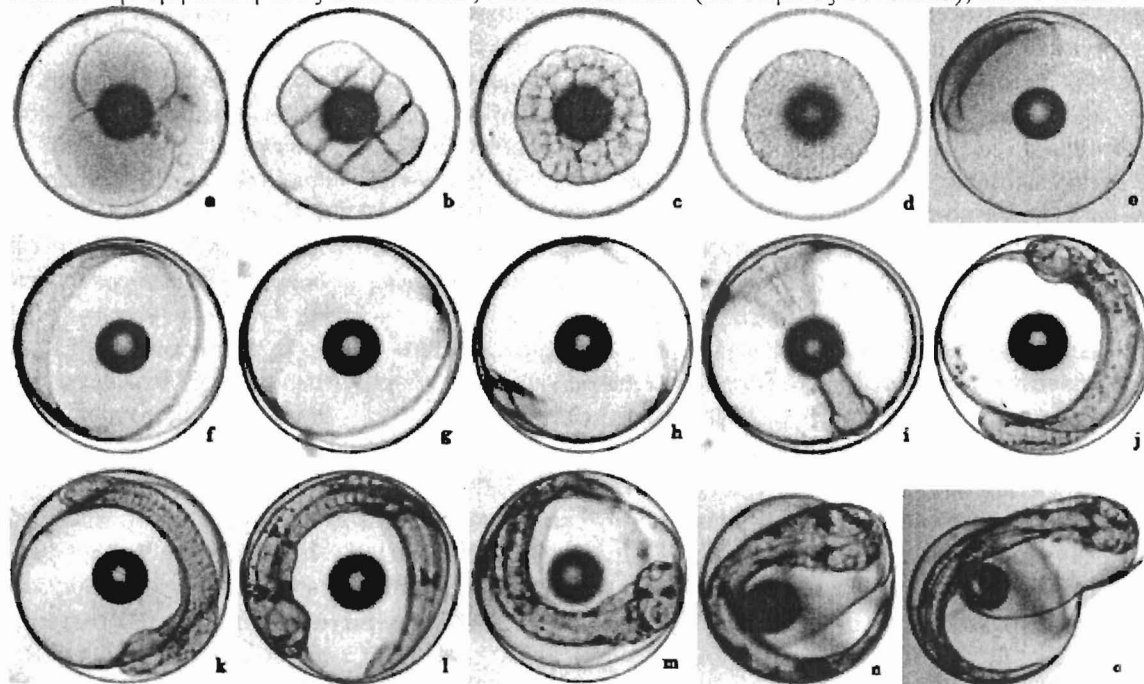
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με αυγά από γεννήτορες του ιχθυογεννητικού σταθμού της εταιρείας Νηρέυς Α.Ε. στη Χιλιαδού Μανάγουλης, Φωκίδας. Το απόθεμα των γεννητόρων απαρτιζόταν από 350 άτομα (1.0 Kg μέσο βάρος), προέλευσης F₁ εκτρεφόμενης γενιάς, τα οποία είχαν αποθεματοποιηθεί σε κυλινδροκωνική δεξαμενή χωρητικότητας 45 m³. 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⁻¹ 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⁻¹) 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 ± 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 ± 0.007 mm). Το νοπό βάρος βρέθηκε μεταξύ 0.326 και 0.363 mg (μέση τιμή 0.349 ± 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.

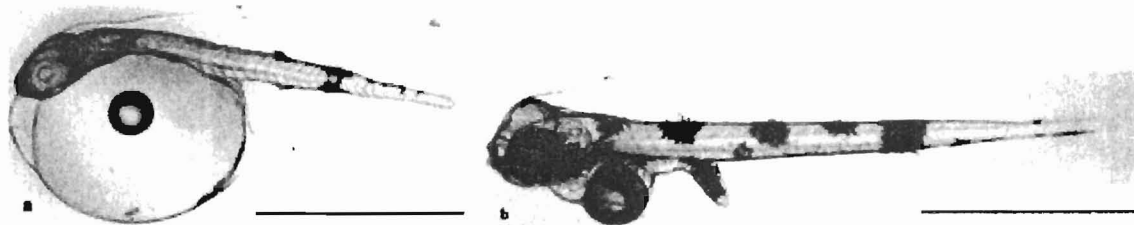


Εικ. 1: Εμβρυακή ανάπτυξη του *D. puntazzo* στους 21°C: a. 2 κύτταρα, b. 8 κύτταρα, c. μοριδίο, d. βλαστίδιο. e. πρώιμο γαστρίδιο, f. ¼ επιβολή, g. ½ επιβολή, h. πρώιμο νευρίδιο, i. κλείσιμο βλαστοπόρου, j. 6 σωμίτες, k. 18 σωμίτες, l. 22 σωμίτες, m. δραστήριο έμβρυο, n. και o. εκκόλαψη.

Fig. 1: Embryonic development of *D. puntazzo* at 21°C: a. 2 cells, b. 8 cells, c. morula, d. blastula, e. early gastrula, f. ¼ epiboly, g. ½ 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 ± 0.014 mm), ύψος από 0.775 έως 0.819 mm (μέση τιμή 0.802 ± 0.016 mm) και όγκο 0.359 ± 0.017 mm³. 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 ± 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 ± 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 ± 0.006 σε 0.191 ± 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 (F₁ 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; Esteveao *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 (F₁ 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 m³ volume (with fish density: 8 kg m⁻³), supplied with filtered (drum filter, UV) seawater, at a constant flow rate of 50% h⁻¹. 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⁻¹ (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 (t₀ = 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±0.007 mm) diameter. Eggs presented a diameter of 0.845 to 0.885 mm (0.868±0.009 mm) and a wet weight of 0.326 to 0.363 mg (0.349±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.

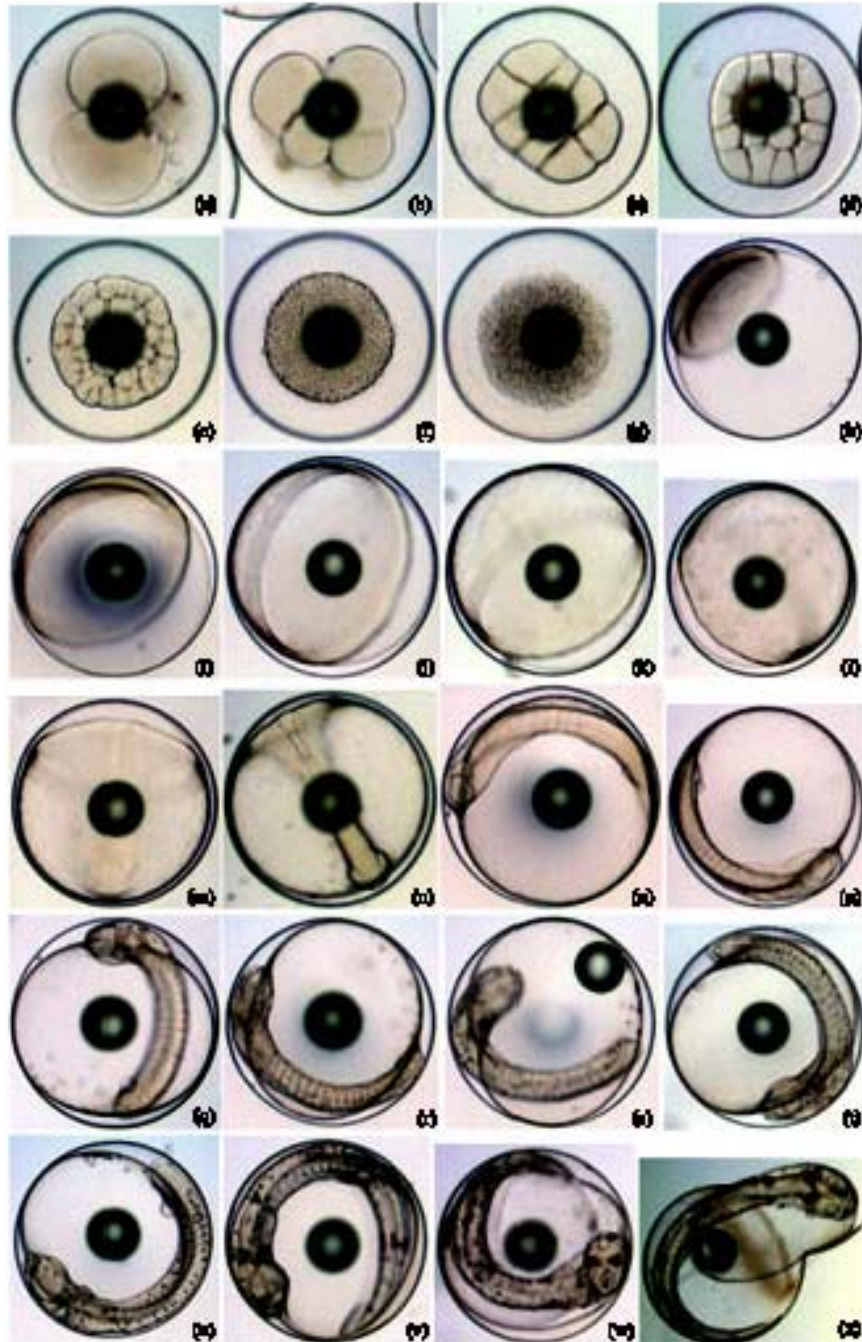


Fig. 1: Embryonic development of *D. puxtanzo* at 21°C; (a) 2 cells, (b) 4 cells, (c) 8 cells, (d) 16 cells, (e) morula, (f) early blastula, (g) late blastula, (h) pre-early gastrula, (i) early gastrula, (j) pre middle gastrula, (k) middle gastrula, (l) late gastrula, (m) early neurula, (n) late neurula, (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 ₁
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 ± 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 ± 0.014 mm (range 1.046-1.080 mm), mean width 0.802 ± 0.016 mm (range 0.775-0.819 mm) and mean volume of 0.359 ± 0.017 mm³. A lipid globule

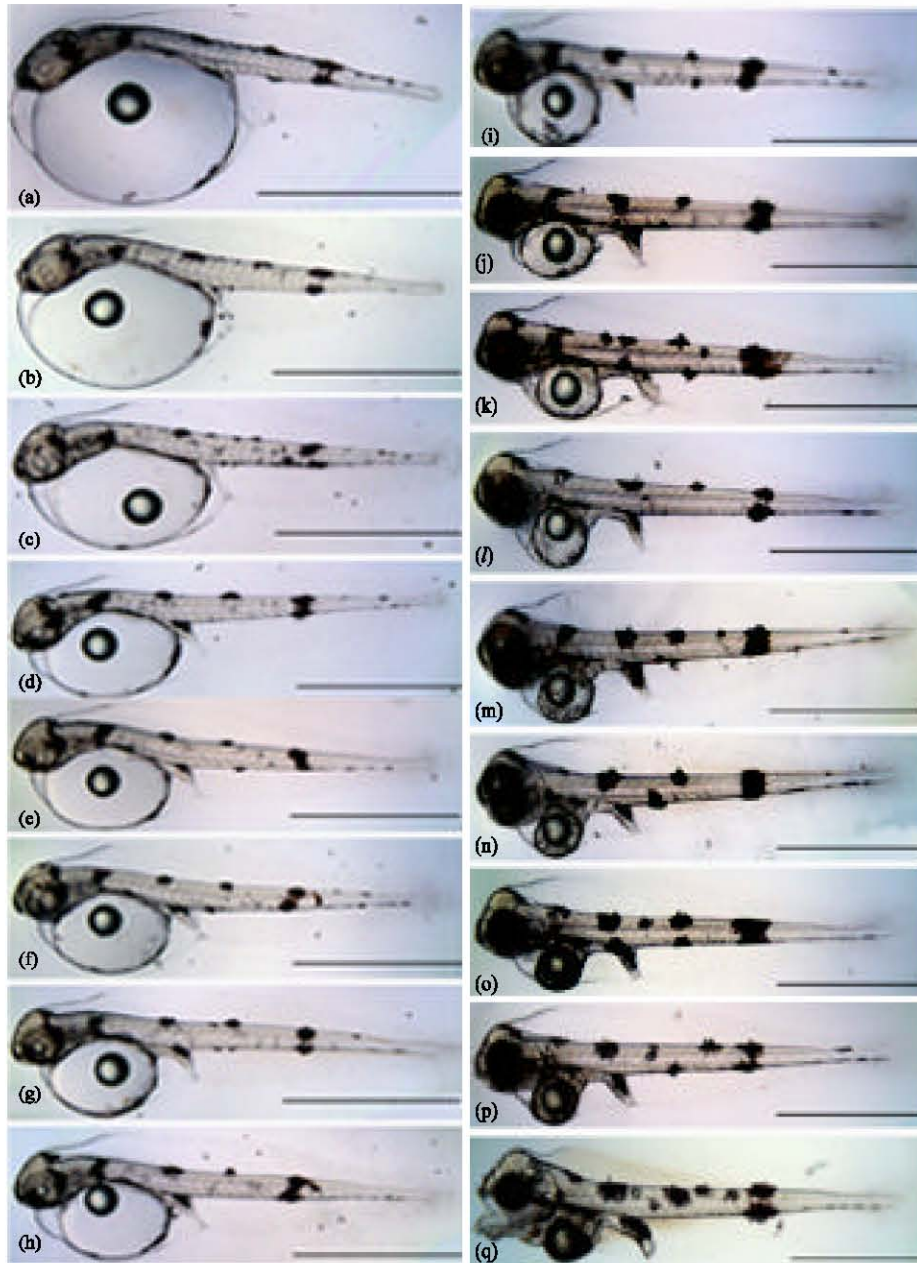


Fig. 2: Yolk-sac larval development of *D. puntazzo* at 21°C; (a) 0 (b) 4 (c) 8 (d) 12 (e) 16 (f) 20 (g) 24 (h) 28, (i) 32 (j) 36 (k) 40, (l) 44 (m) 48 (n) 52 (o) 56 (p) 60 and (q) 64 h after hatching

of 0.219 ± 0.006 mm mean diameter and 0.006 ± 0.000 mm³ 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 _i
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

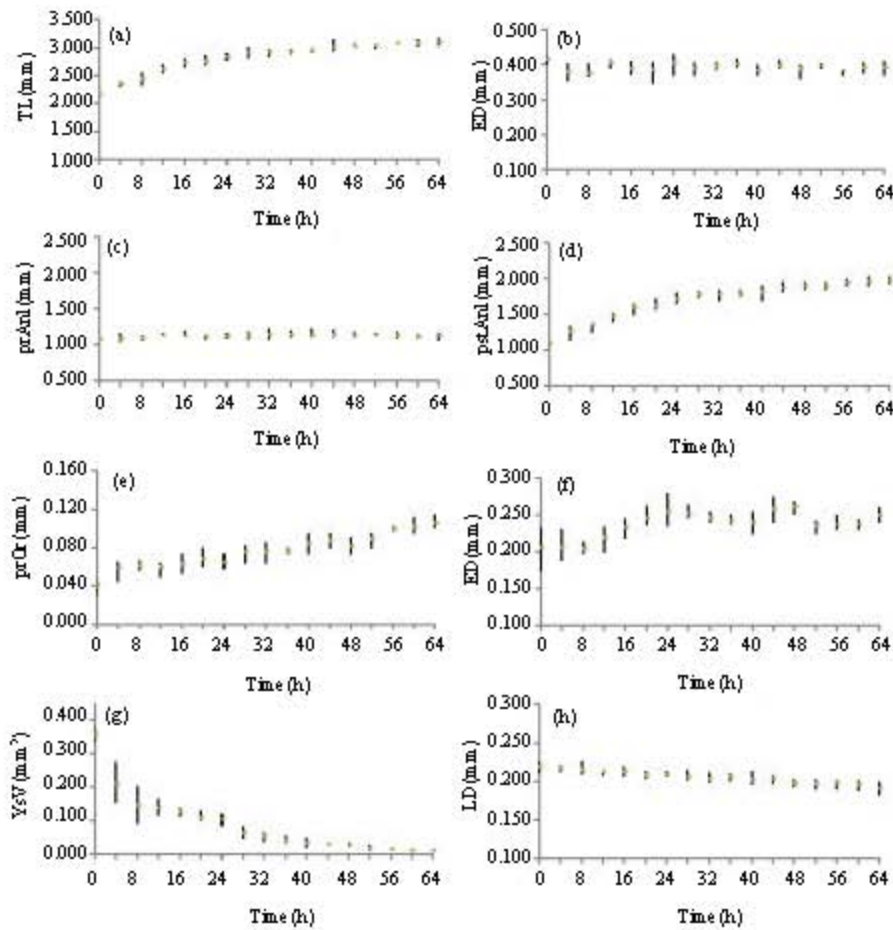


Fig. 3: Evolution of the (a) total length (TL) (b) body depth (BD) (c) pre and (d) post anal length (prAnl, (e) pstAnl), pre-orbit length (prOr) (f) eye diameter (ED) (g) yolk-sac and (h) lipid globule volume (YsV, LV), of *D. puntazzo* yolk-sac larvae, in relation to the time (hours after hatching)

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 Sciences 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.