

Προκαταρκτική μελέτη της αναπαραγωγικής βιολογίας του λαγοκέφαλου *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin 1789)

Μαρία Γιαννουλάκη¹, Κωνσταντίνος Μαρκάκης¹, Ευδοξία Σχισμένου¹, Γεώργιος Χρηστίδης¹
Παναγιώτα Περιστεράκη¹, Στυλιανός Σωμαράκης¹

¹ Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ), Ηράκλειο, Ελλάδα, m.giannoulaki@hcmr.gr

ABSTRACT

Maria Giannoulaki, Konstantinos Markakis, Eudoxia Schismenou, Georgios Christidis, Panagiota Peristeraki, Stylianos Somarakis. Preliminary investigation on the reproductive biology of the silver-cheeked toadfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin 1789)

In this study we used samples of female *Lagocephalus sceleratus* collected from southeast Crete in June 2019 and June 2020 to investigate basic aspects of its reproductive biology, namely, oocyte growth and maturation and pattern of oocyte development. For this purpose, we used ovarian histology and analysis of oocyte size frequency distributions. In advanced stages of vitellogenesis or final maturation, the most developed group of oocytes was clearly separated in size from the remainder, less developed oocytes. Ovaries with signs of recent spawning (presence of postovulatory follicles) had numerous smaller oocytes in initial stages of follicular atresia. These preliminary results suggest that individual females possibly spawn only once during the reproductive period.

Keywords: *Lagocephalus sceleratus*, reproduction, Crete, Eastern Mediterranean

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο λαγοκέφαλος (*Lagocephalus sceleratus*, Tetraodontidae, Gmelin 1789, silver-cheeked toadfish, λαγοκέφαλος) είναι ένα λεσσεψιανό, εισβολικό και τοξικό είδος (Ulman *et al.* 2021). Η πρώτη του καταγραφή στη Μεσόγειο έγινε το 2003 από τους Akyol *et al.* (2005) στην Τουρκία ενώ μέσα σε λίγα χρόνια οι πληθυσμοί του αυξήθηκαν σημαντικά στο Αιγαίο και στις ακτές της Λεβαντίνης (Katsanevakis *et al.* 2020). Η παρουσία του στη Μεσόγειο συνοδεύεται από σημαντικές οικολογικές και οικονομικές επιπτώσεις συμπεριλαμβανομένων και κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία, λόγω της τετραδοτοξίνης (TTX) που περιέχεται στη σάρκα του (Katikou *et al.* 2009; Kosker *et al.* 2016; Christidis *et al.* 2021).

Η ικανότητα αναπαραγωγής των ξενικών ειδών είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που καθορίζουν την ικανότητα δημιουργίας αυτοσυντηρούμενων πληθυσμών στις νέες περιοχές εξάπλωσης (Moyle & Cech 1982). Στη Μεσόγειο, η αναπαραγωγική περίοδος του λαγοκέφαλου εκτείνεται, σε επίπεδο πληθυσμού, από τα τέλη της άνοιξης έως τις αρχές φθινοπώρου (Aydin 2011; Kalogirou 2013; Sabrah *et al.* 2006; Farrag, 2014; Rousou *et al.* 2014; Peristeraki *et al.* 2010). Ωστόσο λίγα είναι γνωστά για την αναπαραγωγική δραστηριότητα των θηλυκών σε επίπεδο ατόμου. Στην παρούσα προκαταρκτική μελέτη, που αποτελεί μέρος μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, εφαρμόστηκαν ιστολογικές τεχνικές και ανάλυση κατανομών συχνοτήτων των διαμέτρων των ωοκυττάρων (oocyte size frequency distributions, OSFDs) με σκοπό την διερεύνηση του προτύπου ανάπτυξης των ωοκυττάρων και της αναπαραγωγικής στρατηγικής του είδους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 36 ωθήκες λαγοκέφαλου που συλλέχθηκαν με πετονιά (hand line) στην περιοχή του Αθρινόλακου (Νομός Λασιθίου, ανατολικά Ιεράπετρας), τον Ιούνιο του 2019 και του 2020. Για την καλύτερη συντήρησή τους, αμέσως μετά τη σύλληψή τους, τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε θαλασσινό νερό με πάγο (chilled seawater).

Στο εργαστήριο, μετρήθηκαν το ολικό μήκος (TL, mm), το ολικό βάρος (TW, g), το εκπλαγχνισμένο βάρος (EW, g) και το βάρος των ωοθηκών (GW, g) ενώ η συντήρηση των ωοθηκών έγινε σε διάλυμα φορμόλης 10%. Από το σύνολο των ατόμων επιλέχθηκαν 27 ωθήκες για ιστολογική ανάλυση και 20 ωθήκες για μετρήσεις των διαμέτρων των ωοκυττάρων.

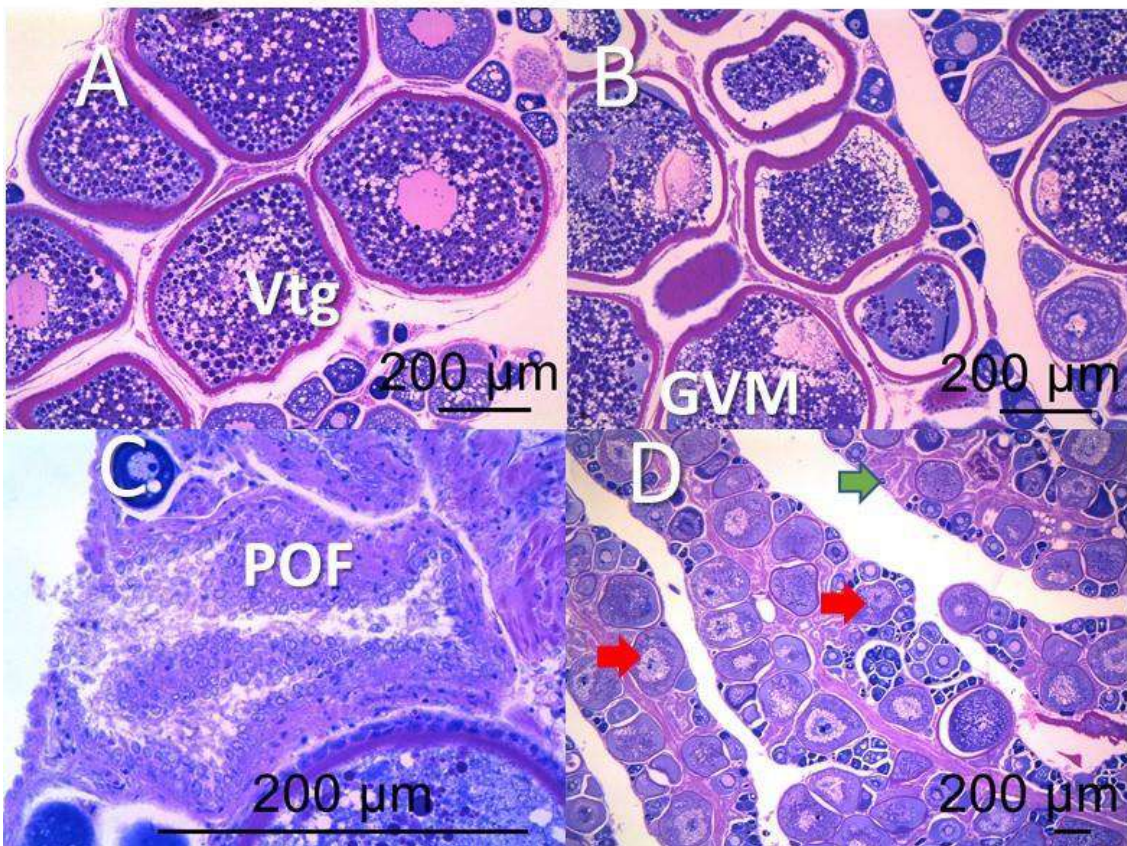
Για την ιστολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε έγκλιση των ωοθηκών σε ρητίνη (Historesin) και χρώση τομών πάχους 4μm με κυανό του μεθυλενίου και βασική φουξίνη. Οι ωθήκες εξετάστηκαν μικροσκοπικά και ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το αναπτυξιακό στάδιο της πιο προηγμένης ομάδας ωοκυττάρων και την παρουσία και βαθμό αποδιοργάνωσης των μεταωορρηξιακών (ή κενών) ωοθυλακίων (postovulatory follicles, POFs) (Schismenou *et al.* 2012). Η μέτρηση της διαμέτρου των

ωοκυτάρων, έγινε σε προζυγισμένα υποδείγματα των ωοθηκών, τα οποία φωτογραφήθηκαν ($0.1207 \text{ pixels } \mu\text{m}^{-1}$) με κάμερα προσαρμοσμένη σε στερεοσκόπιο με διερχόμενο φωτισμό. Με το πρόγραμμα ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) συνδυασμένο με το ObjectJ (<http://simon.bio.uva.nl/objectj/>) (Schismenou *et al.* 2012) μετρήθηκαν όλα τα ωοκύτταρα με διάμετρο μεγαλύτερη των 200 μm και κατασκευάστηκαν οι κατανομές συχνοτήτων των διαμέτρων των ωοκυττάρων (OSFDs).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

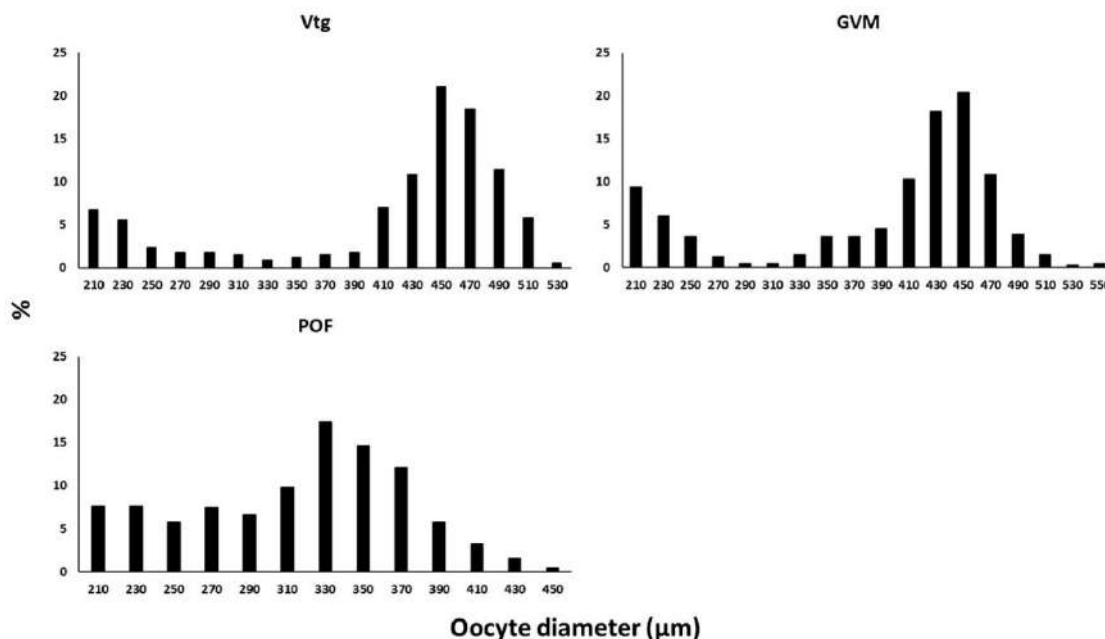
Μεταξύ των θηλυκών που εξετάστηκαν, υπήρχαν άτομα με αναπτυσσόμενες ωοθήκες, στη φάση της δευτερογενούς ανάπτυξης (λεκιθογένεση) (Εικόνα 1Α) και άτομα με ενδείξεις πρόσφατης ωοτοκίας (παρουσία POFs) (Εικόνα 1C,D). Στα τελευταία, τα εναπομείναντα λεκιθικά ωοκύτταρα δεν ήταν υγιή και παρουσίαζαν χαρακτηριστικά αρχικών σταδίων ατρησίας (συρρίκνωση, αλλοιωμένος πυρήνας). Μόνο ένα θηλυκό βρέθηκε στο στάδιο της τελικής ωρίμανσης (Εικόνα 1B), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ώριμα θηλυκά πιθανόν να μην συλλαμβάνονται με πετονιά.

Η εξέταση των OSFDs (Εικόνα 2) έδειξε ότι στα άτομα που ιστολογικά διαπιστώθηκε ότι βρίσκονταν στο στάδιο της λεκιθογένεσης (Vtg) ή της τελικής ωρίμανσης (GVM) (βλέπε Εικόνα 1A,B), ξεχώριζε μια και μόνο ομάδα μεγαλύτερων ωοκυττάρων από τα μικρότερα, λιγότερο ανεπτυγμένα ωοκύτταρα. Όσον αφορά τις γονάδες με κενά ωοθυλάκια (POFs), δεν ξεχώριζε σαφώς προηγμένη ομάδα ωοκυττάρων (advanced batch) και τα ωοκύτταρα ήταν μικρότερα.



Εικόνα 1. (A) Αναπτυσσόμενη ωοθήκη με λεκιθικά ωοκύτταρα (Vtg). (B) Τελική ωρίμανση με ωοκύτταρα στο στάδιο μετανάστευσης του πυρήνα (GVM). (C) και (D) Ωοθήκες ατόμων που έχουν ωοτοκήσει. Πράσινο βέλος: μετα-ωορρηξιακό ωοθυλάκιο POF. Κόκκινα βέλη: μη-υγιή λεκιθικά κύτταρα.

Figure 1. (A) Growing ovary with vitellogenic oocytes (Vtg). (B) Final maturation: oocytes in germinal vesicle migration (GVM). (C) and (D) Post-spawning ovaries. Green arrow: postovulatory follicle POF. Red arrows: non-healthy vitellogenic oocytes.



Εικόνα 2. Κατανομές συχνοτήτων των διαμέτρων των ωοκυττάρων. Vtg: ωοθήκη στο στάδιο της λεκιθογένεσης. GVM: ωοθήκη στο στάδιο της μετανάστευσης του πυρήνα. POF: ωοθήκη με μετα-ωορρηξιακά ωοθυλάκια. Figure 2. Oocyte size frequency distributions. Vtg: vitellogenic ovary. GVM: ovary in migratory nucleus stage. POF: ovary with postovulatory follicles.

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία από τις πρώτες που μελετούν την ανάπτυξη των ωοκυττάρων του λαγοκέφαλου. Από την ιστολογική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν άτομα με ωοθήκες στο στάδιο της ενυδάτωσης (HYD). Ένας πιθανός λόγος μπορεί να είναι το αλιευτικό εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε, αφού τα περισσότερα άτομα πιάστηκαν με πετονιά και ενδέχεται τα θηλυκά να μην τρέφονται λίγο πριν την ωοτοκία. Άλλα είδη της οικογένειας Tetraodontidae κάνουν βενθικές φωλιές (Gladstone 1987; Sikkell 1988; Kawase *et al.* 2014) και είναι πιθανό τα είδη αυτά να μην τρέφονται κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας.

Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας και κυρίως από την ανάλυση των OSFDs, το αρχικό συμπέρασμα είναι ότι ο λαγοκέφαλος έχει την εικόνα είδους που στρατολογεί τα ωοκύτταρα που προορίζονται για ωοτοκία πριν την έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου (Hunter *et al.* 1992; Murua *et al.* 2003). Οι OSFDs έδειξαν ότι, στα πιο προχωρημένα στάδια της λεκιθογένεσης (Vtg) και στην τελική ωρίμανσης (GVM), ξεχωρίζει σαφώς μία και μόνο ομάδα προηγμένων ωοκυττάρων από τα οποία θα προκύψουν τα αυγά που θα απελευθερωθούν. Επιπλέον, από τις ιστολογικές τομές διαπιστώσαμε ότι στις ωοθήκες που παρουσίαζαν σημάδια πρόσφατης ωοτοκίας (παρουσία POFs), είχαν απομείνει πολλά μικρά λεκιθικά ωοκύτταρα τα οποία, στο σύνολό τους, εμφάνιζαν σημάδια ατρησίας. Η παρουσία των ωοκυττάρων αυτών στα θηλυκά με POFs αποτελεί πρώτη ένδειξη ότι απόθεση αβγών (ωοτοκία), στο επίπεδο του ατόμου, πραγματοποιείται μόνο μία φορά κατά την αναπαραγωγική περίοδο.

Η παρούσα εργασία είναι μία προκαταρκτική μελέτη με μικρό δείγμα θηλυκών, από το οποίο, με εξαίρεση ενός ατόμου, απουσιάζουν τα θηλυκά σε στάδια τελικής ωρίμανσης. Περαιτέρω δειγματοληψίες είναι απαραίτητες για την διαλεύκανση της αναπαραγωγικής στρατηγικής του είδους στη Μεσόγειο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aydin M (2011) Growth, reproduction and diet of pufferfish (*Lagocephalus sceleratus*, Gmelin, 1789) from Turkey's Mediterranean Sea Coast. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 11: 569–576
- Christidis G, Mandalakis M, Anastasiou TI, Tserpes G, Peristeraki P, Somarakis, S (2021) Keeping *Lagocephalus sceleratus* off the Table: Sources of Variation in the Quantity of TTX, TTX Analogues, and Risk of Tetrodotoxication. Toxins 13: 896

- Farrag MMS (2014) Fisheries and Biological studies on Lessepsian pufferfish, *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) (Family: Tetraodontidae) in the Egyptian Mediterranean Waters. Ph.D Thesis Al-Azhar University, Assuit
- Gladstone W (1987) The eggs and larvae of the sharpnose pufferfish *Canthigaster valentini* (Pisces: Tetraodontidae) are unpalatable to other reef fishes. *Copeia* 1: 227–230
- Hunter JR, Macewicz BJ, Lo NCH, Kimbrell CA (1992) Fecundity, spawning, and maturity of female Dover sole, *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision. *Fishery Bulletin* 90: 101–128
- Kalogirou S (2013) Ecological characteristics of the invasive pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in Rhodes, Eastern Mediterranean Sea. A case study. *Mediterranean Marine Science* 142: 251–260
- Katikou P, Georgantelis D, Sinouris N, Petsi A, and Fotaras T (2009) First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 54: 50–55
- Katsanevakis S, Zenetos A, Corsini-Foka M, and Tsiamis K (2020) Biological Invasions in the Aegean Sea: temporal Trends, Pathways, and Impacts, In: Anagnostou CL, Kostianoy AG, Mariolakos ID, Panayotidis P, Soilemezidou M, Tsaltas G, (eds) *The Aegean Sea Environment: The Natural System, Handbook of Environmental Chemistry*, Springer Nature
- Kawase H, Okata Y, Ito K, Ida A (2014) Spawning behavior and paternal egg care in a circular structure constructed by pufferfish, *Torquigener albomaculosus* (Pisces: Tetraodontidae). *Bulletin of Marine Science* 91: 33–43
- Kosker A, Ozogul F, Durmus M, Ucar Y, Ayas D, Regenstein J (2016) Tetrodotoxin levels in pufferfish (*Lagocephalus sceleratus*) caught in the Northeastern Mediterranean Sea. *Food Chemistry* 210: 332–337
- Moyle PB, Cech JJ Jr (1982) *Fishes: An Introduction to Ichthyology* In: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 593
- Murua H, Saborido-Rey F (2003) Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 33: 23–31.
- Peristeraki P, Lazarakis G, Tserpes G (2010) First results on the maturity of the lessepsian migrant *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in the eastern Mediterranean. *Rapport de la Commission Internationale pour l'Exploration scientifique de la Mer Méditerranée* 39: 629
- Rousou M, Ganias K, Kletou D, Loucaides A, Tsinganis M (2014) Maturity of the pufferfish *Lagocephalus sceleratus* in the southeastern Mediterranean Sea. *Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms* 1: 35–44
- Schismenou E, Somarakis S, Thorsen A, Kjesbu OS (2012) Dynamics of *de novo* vitellogenesis in fish with indeterminate fecundity: an application of oocyte packing density theory to European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Marine Biology* 159: 757–768
- Sikkel PC (1990) Social organization and spawning in the Atlantic sharpnose puffer, *Canthigaster rostrata* (Tetraodontidae). *Environmental Biology of Fishes* 27: 243–254
- Ulman A, Harris HE, Doumpas N, Deniz-Akbora H, Al Mabruk SAA, Azzurro E, Bariche M, Çiçek BA, Deidun A, Demirel N, Fogg AQ, Katsavenakis S, Kletou D, Kleitou P, Papadopoulou A, Ben Souissi J, Hall-Spencer JM, Tiralongo F, Yildiz T (2021) Low Pufferfish and Lionfish Predation in Their Native and Invaded Ranges Suggests Human Control Mechanisms May Be Necessary to Control Their Mediterranean Abundances. *Frontiers in Marine Science* 8: 670–413.