

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ανίχνευση και μοριακή ταυτοποίηση μετάζων εξωπαρασίτων λυθρινιού»

Ευσταθίου Αικατερίνη

ΒΟΛΟΣ 2016

«Ανίχνευση και μοριακή ταυτοποίηση εξωπαρασίτων λυθρινιών»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Γκολομάζου Ελένη**, Λέκτορας – Ιχθυοπαθολογία. Τμήμα Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**,
- 2. Βαφείδης Δημήτριος**, Καθηγητής – Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση – έμμεση χρηστικότητα τους. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3. Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής – Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην διεκπεραίωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, Λέκτορα κα. Γκολομάζου Ελένη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, Καθηγητή κ. Βαφειδή Δημήτριο και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Εξαδάκτυλο Αθανάσιο για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν κατά την πειραματική διαδικασία, τον επιστημονικό συνεργάτη κ. Μαλανδράκη Μανόλη, ο οποίος έπαιξε καταλυτικό ρόλο στην μοριακή ταυτοποίηση των εξωπαρασίτων, κατασκευάζοντας τους εκκινητές για την αντίδραση πολυμεράσης, τον επιστημονικό συνεργάτη κ. Γκάφα Γεώργιο, ο οποίος ήταν δίπλα μου στα πρώτα βήματα του πειράματος καθώς και τον μεταπτυχιακό φοιτητή κ. Κωνσταντινίδη Ιωάννη, ο οποίος συντέλεσε στην απομόνωση του γενετικού υλικού.

Τέλος, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλη μου την οικογένεια και ιδιαίτερα στους γονείς μου, που όλα αυτά τα χρόνια μου συμπαραστέκονται ηθικά σε κάθε βήμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συνεχής ανάπτυξη του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελλάδα κατά τις τελευταίες δεκαετίες έφερε στο προσκήνιο την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού νοσημάτων, τα οποία άμεσα ή έμμεσα είναι συνδεδεμένα με ποικίλους αιτιοπαθογόνους παράγοντες, η αντιμετώπιση των οποίων φαίνεται πως είναι απαραίτητη και επιτεύξιμη μονάχα μέσα από την καλύτερη γνώση της λειτουργίας τους. Η γνώση της ιχθυοπαθολογίας είναι, λοιπόν, απαραίτητη όχι μόνο για την αντιμετώπιση κάθε είδους παθολογικών προβλημάτων που παρατηρούνται στον κύκλο αναπαραγωγής και εκτροφής των ψαριών αλλά και για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε με σκοπό τη μελέτη του παρασιτικού φορτίου του λυθρινιού (*Pagellus erythrinus*), 100 δείγματα του οποίου αλιεύθηκαν από την περιοχή του Παγασητικού κόλπου. Πιο συγκεκριμένα, βασικοί στόχοι ήταν η καταγραφή των εξωπαρασίτων που παρατηρήθηκαν στα ψάρια τα οποία εξετάστηκαν, ο υπολογισμός του ποσοστού προσβολής, της έντασης και της συχνότητας εμφάνισής τους, καθώς και η μοριακή ταυτοποίηση του εξωπαρασίτου *Lamellodiscus erythrini*.

Για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας αλιεύθηκαν από την περιοχή του Παγασητικού κόλπου 100 λυθρίνια με τράτα βυθού. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο, όπου καταγράφηκε η ένταση παρασίτωσης και έγινε μορφολογική ταυτοποίηση του εξωπαρασίτου *L. erythrini*. Τα ποσοστά προσβολής ήταν της τάξης του 80%, ενώ υψηλή παρασίτωση (10-15 παράσιτα/ιχθύ) παρατηρήθηκε στο 6% του δείγματος.

Στην συνέχεια για την εξαγωγή του γενετικού υλικού των εξωπαρασίτων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφορμίου. Τα προϊόντα της εξαγωγής του γενετικού υλικού ελέγχθηκαν ποιοτικά με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Για την απόκτηση μεγαλύτερης ποσότητας γενετικού υλικού για περαιτέρω ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τέλος τα δείγματα αποστάλθηκαν στο Vienna Biocenter στην Αυστρία,

όπου και εξακριβώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα, η μοριακή αλληλουχία των εξωπαρασίτων (*L. erythrini*) που συλλέχθηκαν.

Λέξεις κλειδιά:

Pagellus erythrinus, *Lamellodiscus erythrini*, Παγασητικός κόλπος, Ιχθυοπαθολογία, Εξωπαρασίτα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Νέα εκτρεφόμενα είδη.....	10
1.2. Λυθρίνια – Βιολογία.....	11
1.2.1. Μορφολογία λυθρινιών.....	12
1.2.2. Διατροφή λυθρινιών.....	13
1.2.3. Ανάπτυξη και ηλικία λυθρινιών.....	14
1.2.4. Εκτροφή λυθρινιού.....	15
1.2.5. Αναπαραγωγικός κύκλος.....	15
1.3. Παθολογικά προβλήματα λυθρινιών.....	16
1.3.1. <i>Lamellodiscus erythrini</i>	17
1.3.2. <i>Microcotile erythrini</i>	19
1.4. Μονογενή τρηματώδη.....	20
1.4.1. Βασικές ομάδες μονογενών.....	23
1.4.2. Επίδραση μονογενών στους ξενιστές.....	24
1.5. Σκοπός.....	24
2. Υλικά και μέθοδοι.....	25
2.1. Δειγματοληψία.....	25
2.2. Παρασιτολογική εξέταση.....	26
2.3. Μορφολογική ταυτοποίηση.....	28
2.4. Μοριακή ταυτοποίηση.....	28
2.4.1. Εξαγωγή γενετικού υλικού.....	28
2.4.2. Ηλεκτροφόρηση.....	29
2.4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	30

3. Αποτελέσματα.....	32
4. Συζήτηση.....	34
5. Συμπεράσματα.....	39
6. Βιβλιογραφία.....	40
7. Abstract.....	44

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συνεχής ανάπτυξη του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελλάδα κατά τις τελευταίες δεκαετίες έφερε στο προσκήνιο την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού νοσημάτων, τα οποία άμεσα ή έμμεσα είναι συνδεδεμένα με ποικίλους αιτιοπαθογόνους παράγοντες, η αντιμετώπιση των οποίων φαίνεται πως είναι απαραίτητη και επιτεύξιμη μονάχα μέσα από την καλύτερη γνώση της λειτουργίας τους. Η γνώση της ιχθυοπαθολογίας είναι, λοιπόν, απαραίτητη όχι μόνο για την αντιμετώπιση κάθε είδους παθολογικών προβλημάτων που παρατηρούνται στον κύκλο αναπαραγωγής και εκτροφής των ψαριών αλλά και για την προστασία της δημόσιας υγείας .

Το τελευταίο αυτό, προκύπτει από την ολοένα αυξανόμενη κατανάλωση ψαριών από τον σύγχρονο άνθρωπο. Η αλλαγή αυτή στις διατροφικές συνήθειες, κατά την οποία τα ψάρια εντοπίζονται ψηλότερα στην τροφική πυραμίδα, είναι συνυφασμένη με την ραγδαία ανάπτυξη της ιχθυοκαλλιέργειας τα τελευταία χρόνια. Έτσι, καθώς γίνονται διαθέσιμα στο ευρύ κοινό όλο και περισσότερα ψάρια ελεγχόμενης καλλιέργειας, μειώνεται παράλληλα η τιμή τους. Συγκεκριμένα, η αύξηση των διαθέσιμων ψαριών και οι χαμηλές τιμές που προσφέρουν οι ιχθυοκαλλιέργειες ωθούν τους πολίτες να επιλέγουν συχνότερα τα ψάρια ως τροφή τους. Εύκολα, λοιπόν , προκύπτει από τα παραπάνω πως η γνώση της παθολογίας των ψαριών είναι σημαντική για τη δημόσια υγεία, διότι, ταυτόχρονα με τα ψάρια καταναλώνονται από τους τελικούς καταναλωτές και οργανισμοί που παρασιτούν σ' αυτά, οι οποίοι ενδεχομένως δύνανται να δράσουν ως παθογόνοι και σ' αυτούς.

Ο έλεγχος και πόσο μάλλον η θεραπεία των ασθενειών των υδρόβιων ζώων αποτελούν δύσκολο άθλο. Όταν αρχίζουν να γίνονται φανερά τα συμπτώματα μιας ασθένειας είναι πλέον πολύ αργά για να αποφευχθούν οι όποιες απώλειες. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η ύπαρξη προληπτικών μέτρων μείωσης των ασθενειών. (Κολυγάς, 2014)

Τα νοσήματα των ψαριών ανάλογα με την αιτιολογία τους διακρίνονται σε νοσήματα που οφείλονται σε : βακτήρια, παράσιτα, ιούς, χλαμύδιες, ρικέτσιες, μύκητες, παράγοντες του

περιβάλλοντος, διατροφικούς παράγοντες ή ακόμη και νεοπλάσματα.

Γενικά, η γνώση των ασθενειών που προκαλούνται από παράσιτα είναι υψίστης σημασίας καθώς τα είδη των παρασίτων που ζουν εις βάρος των ψαριών είναι χιλιάδες, ενώ πιθανή είναι η ανακάλυψη ακόμη περισσότερων τέτοιων ειδών στο κοντινό μέλλον. (Φώτης & Αγγελίδης, 2003).

1.1. Νέα εκτρεφόμενα είδη

Η συνταγή της επιλογής ενός είδους για ιχθυοκαλλιέργεια δεν είναι ξεκάθαρη, για παράδειγμα δεν επιλέγεται ένα είδος επειδή παρουσιάζει μεγάλη απορροφητικότητα στην αγορά και μόνο ούτε γιατί είναι περισσότερο εύκολη η αναπαραγωγή και εκτροφή του από άλλα είδη. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που θα καθορίσουν την επιλογή για εκτροφή ενός είδους και πολύ περισσότεροι που θα καθορίσουν την επιτυχία ή την αποτυχία αυτής της επιλογής.

Σήμερα στην Ελλάδα εκτρέφονται τα είδη: *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι), *Sparus aurata* (τσιπούρα), *Anguilla anguilla* (χέλι), *Scophthalmus maximus* (καλκάνι), *Salmo salar* (σολομός του Ατλαντικού), *Pagrus* ή *Chrysophrys major* (γιαπωνέζικη τσιπούρα ή φαγκρί). Τα είδη αυτά, εκτός από το χέλι, αναπαράγονται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς και η εκτροφή τους είναι ιδιαίτερα επιτυχής.

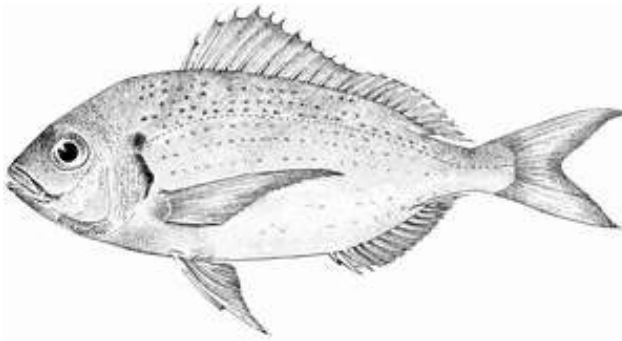
Νέα είδη έχουν αρχίσει να κάνουν δειλά την παρουσία τους στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Τα είδη αυτά είναι το πλατύψαρο Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), ο σαργός (*Diplodus sargus*), ο σουβλομούτης ή χιόνα ή ούγενα (*Puntazzo puntazzo*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*), ο κέφαλος (*Mugil cephalus*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), το φαγκρί (*Pagrus pagrus*).

Όπως φαίνεται παραπάνω τα περισσότερα από τα νέα προς εκτροφή είδη ανήκουν στην οικογένεια των *Sparidae*, η οποία είναι η οικογένεια που περιλαμβάνει τα περισσότερα ερμαφρόδιτα είδη. Παρατηρείται πως αυτή η ικανότητα τους είναι δείκτης προσαρμοστικότητας,

επιτρέπει επίσης την μεγιστοποίηση των γενετικών δυνατοτήτων του ατόμου.

Στα περισσότερα από τα υποψία προς εκτροφή είδη που αναφέρθηκαν, η μέχρι τώρα παραγωγική διαδικασία θεωρείται επιτυχής. Υπάρχουν όμως επιμέρους προβλήματα που δεν έχουν επιλυθεί (τελικός αποχρωματισμός των εκτρεφόμενων ατόμων, αυξημένος κανιβαλισμός, αυξημένες τιμές μετατρεψιμότητας κ.ά.) (Κλαουδάτος Σ. & Κλαουδάτος Δ., 2012).

1.2. Λυθρίνια-Βιολογία



Εικόνα 1.1 *Pagellus erythrinus*¹

Η συστηματική κατάταξη του *Pagellus erithrynus*, κοινώς λυθρίνι έχει ως εξής:

ΤΑΞΗ: *Perciformes*

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: *Sparidae*

ΓΕΝΟΣ: *Pagellus*

ΕΙΔΟΣ: *Pagellus erithrynus*

Η μεγάλη εμπορική σημασία και αφθονία του λυθρινιού στις ελληνικές θάλασσες, καθιστούν απαραίτητη την καλύτερη γνώση της βιολογίας του. Τα τελευταία χρόνια η μέση ετήσια παραγωγή του λυθρινιού στις ελληνικές θάλασσες ανέρχεται σε 170 τόνους.

¹http://www.fao.org/figis/servlet/ServerFileServlet?f=figis/species/images/Pagellus/pag_bel_2369_0.gif

1.2.1. Μορφολογία λυθρινιών

Μορφολογικά, το λυθρίνι έχει μήκος περίπου 60cm. Το μήκος του σώματος των θηλυκών λυθρινιών είναι ελαφρώς μεγαλύτερο από αυτό των αρσενικών. Σχετικά με το χρωματισμό του, είναι κόκκινο-ροζ με ασημί ανταύγειες και συχνά με γαλάζιες κηλίδες στο άνω μέρος των πλευρών, με ροζ πτερύγια και μαύρη βραγχιακή και στοματική περιοχή, χρωματισμός χαρακτηριστικός των ειδών της οικογένειας αυτής.

Σχετικά με το σώμα του, το λυθρίνι έχει μυτερό ρύγχος με μήκος μεγαλύτερο της οφθαλμικής διαμέτρου. Διαθέτει γνάθους που έχουν το ίδιο μήκος και λεπιδωτά μάγουλα. Το βραγχιακό επικάλυμμα είναι γυμνό, αλλά υπάρχουν προραγχιακά λέπια που εκτείνονται ως τα μάτια. Η πλευρική γραμμή αποτελείται από 59-70 λέπια, ενώ τα εμπρόσθια δόντια είναι αρκετά ανεπτυγμένα. Υπάρχουν επίσης δυο σειρές γομφιόμορφων δοντιών, από τα οποία τα οπίσθια είναι μεγαλύτερα.

Οι βραγχιακές άκανθες είναι πολύ κοντές 7-11 δυνατές κατώτερες και 5-7 ανώτερες πάνω στο πρώτο βραγχιακό τόξο. Το ραχιαίο πτερύγιο αποτελείται από 11 σκληρές ακτίνες, με την πρώτη να είναι πιο κοντή και 12-15 πιο μαλακές, άκανθες. Το εδρικό πτερύγιο αποτελείται από 3 σκληρές ακτίνες και 11-13 μαλακές ακτίνες. Τα θωρακικά πτερύγια είναι μυτερά και το μήκος τους παρόμοιο με αυτό του κεφαλιού. Τα κοιλιακά είναι πιο μικρά. Τέλος, να σημειωθεί πως γεωγραφικά εντοπίζεται στη Μαύρη και Μεσόγειο Θάλασσα και στον Ατλαντικό Ωκεανό από την Αγκόλα μέχρι τη Νορβηγία. Βιολογικά, το λυθρίνι είναι ένα κλασσικό βενθικό είδος και ζει σε βάθος έως 200m. Προτιμά ωστόσο βάθη από 20 έως 100 m και αμμώδεις, λασπώδεις και βραχώδεις βυθούς.

Όπως και τα άλλα είδη της οικογένειάς του, είναι σαρκοφάγο και τρέφεται κυρίως με δεκάποδα, πολύχαιτους και άλλα ψάρια. Είναι ερμαφρόδιτο και ως μήνες αναπαραγωγής του μπορούν να θεωρηθούν οι μήνες μεταξύ Απριλίου και Οκτωβρίου. Τα παραπάνω στοιχεία σχετικά με τη βιολογία του λυθρινιού αποτελούν προϊόν ερευνών κυρίως στη Δυτική και Κεντρική Μεσόγειο,

ενώ ελάχιστα εξ' αυτών προέρχονται από πληθυσμούς της Ανατολικής Μεσογείου. (Παπακωνσταντίνου 1984, Βασιλοπούλου, et al., 1986).

Η έρευνα του είδους, η συχνότητα καθώς και η φυσική του ιστορία έχει απασχολήσει κατά καιρούς πολλούς συγγραφείς κατά μήκος των ακτών της Ισπανίας (Larvaneta 1964,1967), στην Αδριατική θάλασσα (Zupanovic και Rijavec 1980), στις ακτές της Λιβύης (Hashem και Gassim, 1981) και στον κόλπο της Λυών (Girardin και Quignard, 1980). Οι Ghorbal και Ktari (1982) ασχολήθηκαν με τις διατροφικές συνήθειες του είδους κατά μήκος των ακτών της Λιβύης, οι Ardizzone και Messina (1983) κατά μήκος των ακτών του Τυρρηνικού πελάγους, η Rosocchi (1983) στον κόλπο της Λυών και ο Παπακωνσταντίνου (1985), στο Σαρωτικό κόλπο.

1.2.2. Διατροφή του λυθρινιού

Γενικά, για τις τροφικές σχέσεις των ψαριών στις ελληνικές θάλασσες δεν υπάρχουν πολλές διαθέσιμες πληροφορίες. Μετά από μια σειρά ερευνών σε διαφορετικούς πληθυσμούς σε περιοχές της Μεσογείου μελετήθηκε η διατροφή του λυθρινιού σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής του (Larraneta 1964, Rijavec και Zupanovic 1965, Ghannudi 1980, Rosocchi 1983, Ardizzone και Messina 1983). Η ανάλυση αφορούσε 425 λυθρίνια εκ των οποίων 23 βρέθηκαν με άδειο στομάχι, το 90% περιείχε αταξινόμητο υλικό, ζωικής προέλευσης και το 15% περιείχε άμμο στο στομάχι. Στο στομαχικό περιεχόμενο των λυθρινιών εντοπίστηκαν μεγάλα ποσοστά βενθικών ασπονδύλων, πολύχαιτων, λάσπης, άμμου καθώς και δεκάποδα, βραχύουρα, μυσιδώδη κεφαλόποδα και ψάρια. Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν ακριβώς την εξάρτηση του λυθρινιού από το βυθό όπου και βασίζει κυρίως τις τροφικές του δραστηριότητες.

Η διατροφή του λυθρινιού παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με την εποχή. Συγκεκριμένα σχεδόν το σύνολο των λυθρινιών της έρευνας είχε τροφή στα στομάχια του καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Ωστόσο φαίνεται πως η αναλογία του ατομικού βάρους προς το βάρος του

στομάχου ήταν πιο μεγάλη το φθινόπωρο και πιο μικρή την άνοιξη.

Σύμφωνα με τον IRI (International Research Institute), τα βραχύουρα και οι πολύχαιτοι, αποτελούν γενικά τα σπουδαιότερα είδη που βρέθηκαν στο στομάχι, ενώ έπονται τα δεκάποδα. Οι εποχιακές αλλαγές μελετήθηκαν με απώτερο σκοπό να εντοπιστεί ποιες λείες διαφοροποιούν λίγο ή πολύ τη διατροφή του λυθρινιού. Έτσι, σημειώθηκε περιορισμός των βραχύουρων κατά τον χειμώνα με παράλληλη αύξηση των πολυχαιτών, ενώ το αντίθετο συμβαίνει το Φθινόπωρο. Κατά την καλοκαιρινή περίοδο, υπερτερούν κατά βάρος τα βραχύουρα, λεία που βρέθηκε στο ¼ των στομάχων και αποτελεί το 1/3 περίπου της βιομάζας των λειών, η οποία συμπληρώνεται από πολύχαιτους και δεκάποδα .

1.2.3. Ανάπτυξη και ηλικία λυθρινιών

Στο κέντρο κάθε λεπιού, είναι εύκολα εντοπίσιμος ένας υαλώδης πυρήνας που περιβάλλεται από μία γαλακτώδη περιοχή. Ο πυρήνας του λεπιού αντιστοιχεί σε μήκος σώματος 30-40 mm, ηλικιακά εντοπίζονται δηλαδή στο πρώτο καλοκαίρι της ζωής τους, όταν βρίσκονται ακόμη κοντά στην ακτή (2-4m βάθος). Για τον υπολογισμό του χρόνου σχηματισμού των ετήσιων δακτυλίων ορίστηκαν οι εξής αποστάσεις:

- α) Ανάμεσα στον πυρήνα και χείλους του λεπιού (R) και
- β) Ανάμεσα στον πυρήνα και στον τελευταίο ετήσιο δακτύλιο (Rn).

Η διαφορά των δύο διαμέτρων ορίστηκε ως « α ύ ξ η σ η » του τελευταίου ετήσιου δακτυλίου. Εύκολα λοιπόν προκύπτει πως ο ετήσιος δακτύλιος σχηματίζεται ανάμεσα σε Μάρτιο και Ιούνιο, σε αναλογία με το μήκος. Η αύξηση αυτή είναι αρκετά μεγάλη κατά το πρώτο έτος της ζωής του λυθρινιού και ελαττώνεται σταθερά έως το έκτο έτος της ζωής του λυθρινιού. Η αύξηση μπορεί να συνεχιστεί για ακόμη δύο χρόνια ωστόσο στη συνέχεια σχεδόν σταθεροποιείται. Είναι εύκολα υπολογίσιμη με τη βοήθεια της εξίσωσης Von Bertalanffy : $L_t = L_{inf} (L_{inf} - L_{lose} - Kt) = L_{mf}$.

όπου **Lt** το μεσουραίο μήκος στην ηλικία t

Linf το μέγιστο ή ασυμπτωτικό μέγεθος

Ko συντελεστής αύξησης

Lo το μέγεθος των ατόμων όταν $t=0,18$.

1.2.4. Εκτροφή λυθρινιού

Το *Pagellus erythrinus* της οικογένειας *Sparidae*, από την περιοχή της Μεσογείου αποτελεί δέλεαρ για τους ιχθυοκαλλιεργητές. Είναι ένα από τα καινούργια είδη που εύκολα δύναται να προσφερθεί στην ιχθυαγορά. Προσφέρεται για κάθε είδους δοκιμές και πειραματισμούς. Εκτρέφεται εύκολα όπως και η τσιπούρα καθώς βιολογικά ομοιάζουν: είναι ευρύαλο, παμφάγο και εμφανίζει ερμαφροδιτισμό. Επίσης, ο λόγος μετατρεψιμότητας είναι ο ίδιος με της τσιπούρας. (Φατούρου I., 2001) Οι δυσκολίες που εντοπίζονται είναι κυρίως στην διατροφή και στην συγκρότηση του συνόλου των γεννητόρων. Συγκεκριμένα τα άτομα είναι δύσκολα στους χειρισμούς, εξαιρετικά νευρικά και ευαίσθητα, ενώ παράλληλα εμφανίζουν συχνά προσβολή από παράσιτα και εξοφθάλμια, οφειλόμενη προφανώς σε μη ικανοποίηση των διατροφικών τους απαιτήσεων.

1.2.5. Αναπαραγωγικός κύκλος

Η αναπαραγωγική περίοδος των λυθρινιών φαίνεται να παρουσιάζει διακυμάνσεις. Εμφανίζει αξιοσημείωτη έκταση στον Σαρωνικό. Ξεκινά νωρίς την άνοιξη, κορυφώνεται τις περιόδους Καλοκαιριού-Φθινοπώρου και ολοκληρώνεται το Χειμώνα. Στις περιοχές της Νότιας Ελλάδας (Κορινθιακός, Πατραϊκός, Ιόνιο) η γεννητική περίοδος ολοκληρώνεται από την άνοιξη έως το φθινόπωρο. Ωστόσο βορειότερα (στον Ευβοϊκό) έχει αναφερθεί και ολοκλήρωση της γεννητικής περιόδου έως και τον Δεκέμβριο.

Το θηλυκό γεννά 22.000 έως 352.000 αυγά και η γονιμότητα από αυτά αυξάνεται

εκθετικά σε σχέση με το μήκος, το βάρος και την ηλικία του ωαρίου (Καπίρης Κ., 2014).

1.3. Παθολογικά προβλήματα Λυθρινιών

Η τεράστια ανάπτυξη στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας που γνώρισε η Ελλάδα τα τελευταία 20 χρόνια οδήγησε σε ένα μεγάλο αριθμό νοσημάτων σε άμεση ή έμμεση σχέση με ποικίλους αιτιοπαθογόνους παράγοντες. Για την αντιμετώπισή τους κρίνεται πρώτα αναγκαίο να μελετηθούν ώστε να γίνει αντιληπτός ο τρόπος λειτουργίας τους. Η ιχθυοπαθολογία, λοιπόν, είναι μια επιστήμη χρήσιμη όχι μόνο στον αγώνα αντιμετώπισης παθολογικών προβλημάτων στον κύκλο εκτροφής και αναπαραγωγής των ψαριών αλλά και για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας (Φώτης & Αγγελίδης, 2003).

Εξαιρετικά δύσκολη θεωρείται η θεραπεία καθώς και ο έλεγχος των ασθενειών των υδρόβιων ζώων. Τη χρονική στιγμή που τα συμπτώματα της ασθένειας αρχίζουν να γίνονται φανερά, είναι πλέον πολύ αργά για την αποφυγή απωλειών. Είναι θέμα ζωτικής σημασίας λοιπόν η πρόληψη, η οποία γενικά σχετίζεται με τις διαχειριστικές πρακτικές των υδάτινων συστημάτων. (Tonguthai, 1997).

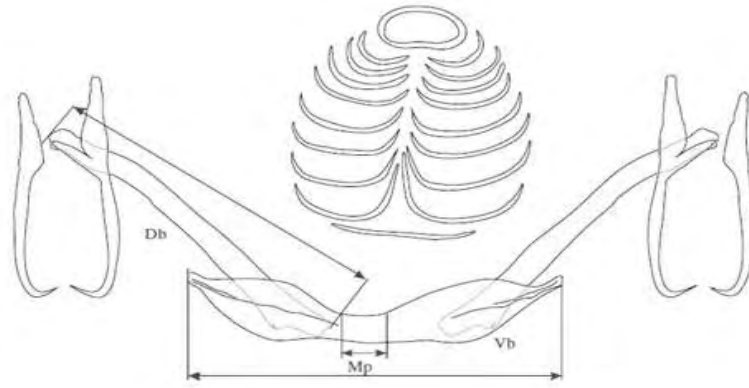
Παράσιτα έχουν ανιχνευθεί στα βράγχια των λυθρινιών, τα οποία ανήκαν στα γένη *Lamellodiscus* και *Microcotyle*. Τα παράσιτα του γένους *Lamellodiscus* βρέθηκαν να αφθονούν στα βράγχια των λυθρινιών, ενώ τα δεύτερα είναι πιο σπάνιο να εντοπιστούν. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν τα είδη : **1. *Lamellodiscus erythrini*** (Euzet & Oliver, 1967) και **2. *Microcotyle erythrini*** (Van Beneden & Hesse, 1863).

1.3.1 *Lamellodiscus erythrini*

Η ταξινομική κατάταξη του είδους *L. Erythrini* είναι η εξής:

Βασίλειο: <i>Animalia</i>
Φύλλο: <i>Platyhelminthes</i>
Κλάση: <i>Monogenoidea</i>
Υπόκλαση: <i>Polygonchoinea</i>
Υπέρταξη: <i>Dactylogyria</i>
Τάξη: <i>Dactylogyridea</i>
Υπόταξη: <i>Dactylogyrynea</i>
Οικογένεια: <i>Dactylogyridae</i>
Γένος: <i>Lamellodiscus</i>
Είδος: <i>erythrini</i>

Τα παράσιτα που ανήκουν στο είδος *Lamellodiscus* διαθέτουν άγκιστρο, δύο ζευγάρια άγκιστριδίων καθώς και δύο ελασματοειδείς δίσκους που αποτελούνται από 10 ζευγάρια μεμβρανών. Η πρώτη μεμβράνη είναι κλειστή, ενώ η τελευταία θυμίζει σχήμα μισοφέγγαρου. Στην Εικόνα 2.1 διακρίνονται τα σκληρωτικά όργανα του παρασίτου, ενώ στις Εικόνες 2.2 και 2.3 παρουσιάζονται σχηματικά τα σημαντικότερα όργανα του *Lamellodiscus* σε σχέση με φωτογραφία του παρασίτου από οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 2.1: Αγκιστρο του *Lamellodiscus*: Vb, όργανο κοιλιακής απόφραξης; Mp, μεσαίο εξάρτημα σύσφιξης; Db. Όργανο ραχιαίας απόφραξης (Boudaya *et al.*, 2009).



Εικόνες 2.2, 2.3: Σχηματική απεικόνιση των σημαντικότερων οργάνων του *Lamellodiscus* σε αντιπαράθεση με φωτογραφία του παρασίτου από οπτικό μικροσκόπιο (Boudaya *et al.*, 2009).

1.3.2 *Microcotyle erythrini*

Η ταξινόμική κατάταξη του είδους *M. erythrini* είναι η εξής:

Βασίλειο: *Animalia*
Φύλλο: *Platyhelminthes*
Κλάση: *Monogenoidea*
Υπόκλαση: *Polyonchoinea*
Υπέρταξη: *Dactylogyria*
Τάξη: *Dactylogyridea*
Υπόταξη: *Mazocraeidea*
Οικογένεια: *Monocotylidae*
Γένος: *Microcotyle*
Είδος: *erythrini*



Εικόνα 2.4: Φωτογραφία παρασίτου του γένους *Microcotyle* όπου διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κοτύλες του παρασίτου.²

Το *M. erythrini* χαρακτηριστικό μέλος της οικογένειας *Monocotylidae* μπορεί να εντοπιστεί εύκολα από την διάθεση μεγάλου αριθμού σφιγκτήρων οι οποίοι είναι σχετικά απλοί και δεν έχουν επιπρόσθετους σκληρίτες. Στην Εικόνα 2.5 είναι εύκολα διακριτή μία σχηματική απεικόνιση του *Microcotyle* συγκριτικά με αντίστοιχη φωτογραφία του παρασίτου από οπτικό μικροσκόπιο.

² http://www.vetcare.gr/pics_santiago_132_msw10.htm

Σύμφωνα με τη φωτογραφία αυτή, το μέγεθος του παρασίτου υπολογίζεται στα 6mm περίπου.



(Kearn, 1994)



(Hayward *et al.*, 2007)

Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση των σημαντικότερων οργάνων του *Microcotyle* συγκριτικά με φωτογραφία του παρασίτου από οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

1.4. Μονογενή Τρηματώδη – Βιολογία

Τα **μονογενή** αποτελούν κοινά **παράσιτα του δέρματος και των βραγχίων** και προσβάλλουν ψάρια του γλυκού αλλά και του θαλασσινού νερού. Παρουσιάζουν μια τεράστια ποικιλία που προσεγγίζει σχεδόν τα 1500 είδη και φαίνονται να παρουσιάζουν μια εξειδίκευση ως προς τους ξενιστές. Η επιλογή συγκεκριμένων ξενιστών παύει ωστόσο πολλές φορές να υφίσταται στην ιχθυοκαλλιέργεια. Η εμφάνιση μονογενών είναι συνήθως ένδειξη κακών συνθηκών υγιεινής και υποβαθμισμένης ποιότητας νερού (π.χ. υπερπληθυσμός, υψηλά ποσοστά αμμωνίας και νιτρικών

ιόντων, οργανική μόλυνση και χαμηλά επίπεδα οξυγόνου), καθώς οι συνθήκες αυτές ευνοούν την ταχύτατη ανάπτυξη μονογενών. Ο χρόνος διπλασιασμού ζωότοκων μονογενών είναι περίπου 24 ώρες, η αναπαραγωγή τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία ενώ ο πληθυσμός τους ακμάζει κυρίως την άνοιξη. (Noga, 2000).

Κατά τα πρώτα χρόνια της αναγνώρισής τους (van Beneden, 1858) και για το δεύτερο μισό του εικοστού αιώνα τα *Aspidogastrea*, *Digenea* και *Monogenea* θεωρούταν γενικά ως “τρηματώδη”. Χρόνια αργότερα, το 1937 ο Bychowsky ταξινόμησε τα μονογενή ως κλάση, άποψη με την οποία το επιστημονικό κοινό άργησε να έρθει σε επαφή.

Το 1963 ο Yamaguti υποστήριξε ότι τα μονογενή αποτελούν το πολύ μια τάξη και το 1970, ο Dubois αντιπρότεινε πως θα έπρεπε να θεωρηθούν σαν υποκλάση των τρηματωδών. Πλέον τα μονογενή θεωρούνται παγκόσμια κλάση, κοντύτερα στους κεστώδεις παρά στους τρηματώδεις. (Cribb *et al.*, 2002). Βασικά χαρακτηριστικά αυτού του χαρακτηρισμού αποτελούν ο τρόπος αναπαραγωγής, η μορφολογία του οπίσθιου οργάνου σύνδεσης, η παρουσία οπτικής κηλίδας καθώς και σε άλλα. Τα μονογενή αποτελούν εξωτερικά παράσιτα και δύνανται να προσβάλλουν όλα τα είδη ψαριών, εντοπίζονται ωστόσο με μεγαλύτερη συχνότητα και ποικιλία στους οστεϊχθύες. Από την άλλη εμφανίζονται λιγότερο στους χονδριχθύες αφού έχουν αναφερθεί “κρούσματά” τους μόνον σε οκτώ οικογένειες (*Acanthocotylidae*, *Amphibdellatidae*, *Capsalidae*, *Chimaericolidae*, *Hexabothriidae*, *Loimoidea*, *Microbothriidae* και *Monocotylidae*) (Cribb *et al.*, 2002).

Η ταυτοποίηση των μονογενών καθώς και η περιγραφή τους βασίστηκαν σε μορφολογικές μελέτες, έρευνες δηλαδή μικρών διαφορών. Στη διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο έπαιξε και η επιλογή του ξενιστή ως κριτήριο για την ταυτοποίηση νέων ειδών. Παράλληλα, αποτελεί τεκμήριο αναπτυξιακών ερευνών το γεγονός πως παράσιτα διαφορετικά μορφολογικά, μπορεί να ανήκουν στο ίδιο είδος. (Desdevises *et al.*, 2000).

Οι μηχανισμοί της εξειδίκευσης των μονογενών σε σχέση με τον ξενιστή

απασχολούν έντονα τους ειδικούς της παρασιτολογίας καθώς μπορεί εύκολα να προκύψει πως ο αριθμός των μονογενών είναι τουλάχιστον ίσος με αυτόν των ψαριών στα οποία παρασιτούν. Προσεγγιστικά έχει υπολογιστεί πως ο αριθμός των ειδών των μονογενών πλησιάζει τα 25000. (Buchmann & Lindenstrøm, 2002).

Μεγαλύτερη ποικιλία μονογενών εντοπίζεται στις τροπικές παρά στις εύκρατες περιοχές, ενώ τα ίδια τα μονογενή αποτελούν τα συνηθέστερα και πολυπληθή εξωπαρασιτικά τρηματώδη των ψαριών. Αν και τα μονογενή συνήθως προσβάλλουν το δέρμα και τα βράγχια των ψαριών, ορισμένα γένη δύνανται να προσβάλλουν και εσωτερικά όργανα ως ενδοπαρασίτα. Όσον αφορά τους ξενιστές τους, σ' αυτούς τα μονογενή βρίσκονται σε μικρούς αριθμούς και προκαλούν ελάχιστα ή και καθόλου προβλήματα. Αναμφίβολα ωστόσο τα μονογενή αποτελούν παθογόνους οργανισμούς και η παρουσία τους δυσχαιρένει οικονομικά τις ιχθυοκαλλιέργειες. (Ramasamy *et al.*, 1995).

Τα μονογενή τρέφονται καταστρέφοντας το επιθήλιο του ξενιστή. Προσκολλούνται στον ξενιστή με τη βοήθεια ενός μηχανισμού αγκίστρων ο οποίος συνδέεται στο πίσω μέρος του παρασίτου με ένα όργανο, τον οπισθάπτορα (opisthaptor). Από τα μονογενή σημαντικότερες είναι οι οικογένειες των Gyrodactylidae και Dactylogyridae. Η θεραπεία για τα μονογενή διαφέρει για τα ωτόκα και τα εσωτερικά μονογενή. Όσον αφορά τα ωτόκα μονογενή, απαιτεί πολλές και μεγάλης διάρκειας διαδικασίες με στόχο τη θανάτωση των λαρβών ενώ αυτές βγαίνουν από το ανθεκτικό αυγό. Στην περίπτωση των εξωτερικών μονογενών τρηματωδών η θεραπεία περιλαμβάνει πλύση με praziquantel, φορμαλίνη, γλυκό νερό/θαλασσινό νερό, οξικό οξύ, οργανοφωσφορικά και χαλκό (Harms, 1996).

Περαιτέρω έρευνες στα μονογενή έδειξαν πως η εξειδίκευση τους δεν περιορίζεται μονάχα στο είδος, αλλά παρασιτούν σε συγκεκριμένα σημεία των βραγχίων των ξενιστών τους, ενώ δεν έχει ανακαλυφθεί πλήρως η αιτία που προκαλεί την τρομερή αυτή εξειδίκευση. Το ρεύμα νερού

που ρέει πάνω απ' τα βράγχια καθώς και ο δια-ειδικός ανταγωνισμός αποτελούν και τα δύο σοβαρές υποψηφιότητες ως καθοριστικοί παράγοντες για την επιλογή τοποθεσίας (Ramasamy *et al.*, 1985).

1.4.1. Βασικές ομάδες μονογενών

Αρχικά, από τις πιο σημαντικές οικογένειες μονογενών είναι η οικογένεια *Microbothriidae* αποτελείται από εντοπιζόμενα στην επιφάνεια του δέρματος των ελασμοβραγχίων, αντιπροσωπευτικότερο μέλος της οικογένειας αποτελεί το *Microbothrium apiculatum* (Olsson, 1869).

Στη συνέχεια, η Τάξη *Dactylogyrida* βασική οικογένεια της οποίας είναι η οικογένεια *Acanthocotylidae*. Συνήθως παρασιτούν στο δέρμα των ελασμοβραγχίων. Το *Pseudacanthocotyla* (Yamaguti, 1963) αποτελεί το πιο σημαντικό και έχει ένα ασυνήθιστο ψευδοπόδιο, ενώ το ενήλικο διαθέτει ειδικό όργανο με 16 άγκιστρα.

Άλλες γνωστές οικογένειες αυτής της τάξης αποτελούν οι *Pseudomurraytrematidae* που εντοπίζονται κυρίως στα βράγχια ψαριών του γλυκού νερού καθώς και οι *Ancyrocephalidae*, *Capsalidae*, *Dactylogyridae* και *Nitzscia*.

Παράλληλα, εντοπίζεται η Τάξη *Gyrodactylida* με βασικούς εκπροσώπους της, τα μονογενή *Macrogyrodactylus* (Malmberg, 1957) και *Gyrodactylus* καθώς και η Οικογένεια *Monocotylidae* η οποία αποτελείται από μονογενή ολοκέφαλων και ελασμοβραγχίων. Το *Calycotyle* (St. Remy, 1898) σημειώνεται ως χαρακτηριστικό μονοκοτυλίδο.

Τέλος, η τάξη *Polyopisthocotylida* τα οποία νοούνται ως κύρια ομάδα και έτσι είναι εφικτός ο περαιτέρω διαχωρισμός της σε υποτάξεις : τα *Hexabothriidea* των ελασμοβράγχιων, τα *Mazocraidea* των τελεόστεων ιχθύων και τα *Diclyobothriidea* στα *Acipensiformes* (Williams & Jones, 1994). Πολλά είδη δεν πραγματοποιούν μετακινήσεις (πχ., *Diclidophora denticulate* (Olsson, 1875), ενώ αντίθετα άλλα μπορούν να μετακινούνται τόσο στα βράγχια όσο και στο δέρμα. (Rohde, 1984) Ωστόσο, ανάλογα με τα όργανα σύνδεσης με τους ξενιστές και σύμφωνα, με τον (Rohde,

1984) τα μονογενή μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες τα *Polyopisthocotylea* και τα *Monopisthocotylea*.

1.4.2. Επίδραση μονογενών στους ξενιστές

Τα μονογενή όντας παράσιτα δημιουργούν παθολογικά, κινητικά, αυξητικά, αναπτυξιακά καθώς και προβλήματα ιστών στους ξενιστές. Έτσι, η θέση που λαμβάνουν στον ξενιστή έχει σημασία για τη συμπεριφορά του ίδιου του ξενιστή. Στα ψάρια συχνά σημεία προσβολής αποτελούν τα μάτια, το εσωτερικό της οπής των αυτιών και η πλευρική γραμμή (Barber, 2007).

1.5. Σκοπός

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε με σκοπό τη μελέτη του παρασιτικού φορτίου του λυθρινιού *Pagellus erythrinus* (L.), 100 δείγματα του οποίου αλιεύθηκαν από την περιοχή του Παγασητικού κόλπου. Πιο συγκεκριμένα, βασικός στόχος ήταν η καταγραφή των εξωπαρασίτων και των ενδοπαρασίτων που παρατηρήθηκαν στα ψάρια τα οποία εξετάστηκαν καθώς και ο υπολογισμός του ποσοστού προσβολής, της έντασης και της συχνότητας εμφάνισής τους.

Το λυθρίνι αποτελεί ένα από τα βασικά εμπορικά είδη της αγοράς και εκτρέφεται εντατικά σε ιχθυοκαλλιέργειες ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες των ανθρώπων με τα ψάρια να καταλαμβάνουν μεγαλύτερο μερίδιο στο καθημερινό τραπέζι από ό,τι στο παρελθόν. Η κατάσταση αυτή έχει ουσιαστικά δημιουργηθεί από την αύξηση των ιχθυοκαλλιεργειών και την ευκολότερη πρόσβαση των σύγχρονων ανθρώπων σε ψάρια. Παρά την κρίση η μαζική εκτροφή ψαριών καθώς και η τεχνολογία μπορούν να προσφέρουν ψάρια σε προσιτές τιμές, κάνοντάς τα έτσι δελεαστικότερα για το ευρύ κοινό σε σχέση με το παρελθόν και τις ελάχιστες παραγορές που υπήρχαν. Η παθολογία των ψαριών, λοιπόν, φαίνεται να αφορά όλο και περισσότερο το ευρύ σύνολο καθώς ψάρια επηρεασμένα από παθογόνους οργανισμούς ενδεχομένως να δύνανται

να επηρεάσουν και τον τελικό καταναλωτή τους. Η γνώση, έτσι, του παρασιτικού φορτίου των λυθρινιών και γενικότερα των εμπορικών ψαριών μπορεί να αποτελέσει το βασικό σύμμαχο για την πρόληψη ή την έγκαιρη διάγνωση μιας παθολογικής κατάστασης τους ώστε να αποφευχθεί το μεγαλύτερο μέρος των απωλειών αλλά και των επιπτώσεων στον τελικό καταναλωτή.

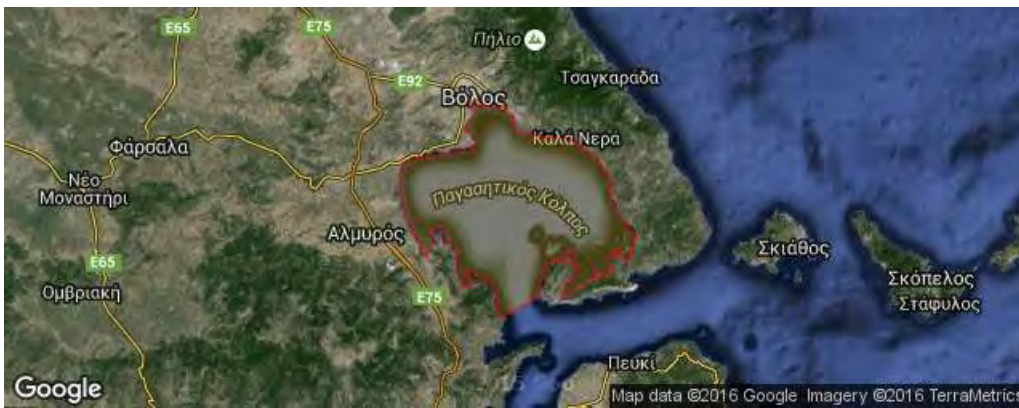
Απαραίτητη κρίνεται άραγε η γνώση των παρασιτικών ειδών καθώς και τα μορφολογικά αλλά και τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά έτσι ώστε να αποφευχθούν δυσμενείς συνέπειες από την προσβολή των ψαριών που εκτρέφονται εντατικά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Για τις ανάγκες της παρούσας έρευνας σημειώθηκε δειγματοληψία σε περιοχές του Παγασητικού κόλπου τον Ιούνιο του 2014. Ο Παγασητικός κόλπος είναι σχετικά αβαθής και κλειστή θάλασσα. Ο κόλπος έχει έκταση περίπου 175 τετραγωνικά χιλιόμετρα και μέγιστο βάθος 102 μέτρα ([http 1](#)).

Αλιεύτηκαν με τράτα βυθού 100 ψάρια κυρίως μέσου μεγέθους (βλ. πίνακας 3). Η λήψη των νωπών ψαριών έγινε τάχιστα και με πολύ προσοχή, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης και η πρόκληση βλαβών στην ακεραιότητά τους. Κατά τη διάρκεια της ψύξης η θερμοκρασία δεν ξεπέρασε τους 4°C. Για την επίτευξη του περιορισμού ανάπτυξης μικροοργανισμών, είναι απαραίτητο τα ψάρια να αποθηκευτούν όσο το δυνατόν πλησίον των 0°C .



Εικόνα 1: Απεικόνιση Παγασητικού κόλπου (πηγή: Google Maps).

2.2 Παρασιτολογική εξέταση

Η παρασιτολογική εξέταση στοχεύει στην ανίχνευση παρασίτων σε επίχρισμα οργάνων ψαριών και στην ταυτοποίηση τους, ώστε να βρεθεί η πιο κατάλληλη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα τα παράσιτα παρατηρούνται στο δέρμα και στα βράγχια με μικροσκοπική παρατήρηση των κινητών παρασίτων σε νωπά παρασκευάσματα δέρματος ή βράγχιων.

Τα ψάρια αποψύχθηκαν σταδιακά για την διατήρηση της καλής ποιότητας της σάρκας τους και ζυγίστηκαν με ζυγαριά ακριβείας. Κατά την παρασιτολογική εξέταση αφαιρέθηκε από τα ψάρια το πρώτο αριστερό και το πρώτο δεξί βραγχιακό τόξο, ξέσμα του οποίου τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα νερό και στην συνέχεια καλύφθηκε με καλυπτρίδα (Φώτης & Αγγελίδης, 2003).

Έπειτα τα δείγματα παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στο σημείο αυτό αναγνωρίστηκαν τα παράσιτα που προσέβαλαν τους ιχθύες και καταγράφηκε η ένταση της παρασίτωσης τους στα βράγχια των ψαριών.

Τα παραπάνω σκευάσματα συντηρήθηκαν σε συνθήκες κατάψυξης για την περαιτέρω ανάλυσης τους.

2.3 Μορφολογική ταυτοποίηση *L. erythrini*

Η προσεγγιστική μεθοδολογία για την έγκυρη ταυτοποίηση των ειδών του γένους οφείλει να είναι αθροιστική όσον αφορά 4 ανατομικά χαρακτηριστικά, τουλάχιστον, ανά παράσιτο. Αυτά είναι τα εξής:

- 1) Η μορφολογία του πεταλοειδούς δίσκου, όπου τρεις είναι οι βασικοί τύποι του γένους
 - α) Με 9 πεταλικά ζεύγη που συνδέονται ευδιάκριτα μεταξύ τους στη κεντρική αυλάκωση,
 - β) Με 9 πεταλικά ζεύγη όπου 5 από αυτά συνδέονται μερικώς στη κεντρική αυλάκωση
 - γ) Με 9 πεταλικά ζεύγη που δεν συνδέονται στη κεντρική αυλάκωση (ουσιαστικά 18 ξεχωριστά πέταλα) (Domingues & Boeger, 2008).
- 2) Η μορφολογία των αποφύσεων των κοιλιακών άγκιστρων, στο γένος διαχωρίζεται σε δύο τύπους:
 - α) σφενδόνης
 - β) άνισες.

Στις αποφύσεις σφενδόνης ,αυτές απέχουν ίση απόσταση από το σημείο έκφυσης τους ενώ στις άνισες, η μια απόφυση έχει διπλάσιο από τη πρώτη (Amine et al., 2005; Domingues & Boeger, 2008).
- 3) Η μορφολογία των αποφύσεων των ραχιαίων άγκιστρων, διαιρείται σε δύο τύπους
 - α) με ανεπτυγμένη έσω απόφυση και
 - β) με εκφυλισμένη έσω απόφυση (Amine et al., 2007; Domingues & Boeger, 2008).
- 4) Την ανατομική θέση καθώς και τη μορφολογία του προστάτη αδένου και του οργάνου εκσπερμάτισης. (Amine et al.,2006; Domingues & Boeger, 2008).

Αξίζει να σημειωθεί η σύγχυση που δημιουργήθηκε σε αρκετές δημοσιεύσεις μετά το 1981 σχετικά με την ακριβή ταυτοποίηση των ειδών του γένους, σύγχυση στην οποία υπέπεσαν ακόμη και συγγραφείς οι οποίοι είχαν ήδη ανακαλύψει κάποιο. (Amine et al, 2005;Amine et al., 2006; Amine et al., 2007). Γενικά, οι ανατομικές διαφορές των ειδών του γένους είναι τόσο μικρές, ώστε να

προκαλούν και τους πιο έμπειρους ερευνητές, οι οποίοι συχνά, εκ των υστέρων δημοσιεύουν εργασίες στις οποίες διορθώνουν λάθη προηγούμενων είτε επαναπροσδιορίζουν το ίδιο είδος, είτε ακόμη και αναγνωρίζουν κάποιο νέο (Amine et al., 2007). Ακόμη, δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις κατά τις οποίες ερευνητές αδυνατούν ή δεν μπαίνουν καν στον κόπο να ταυτοποιήσουν το γένος, κάνοντας μια γενική νύξη ως *Lamellodiscus* sp. (Ulmer & James 1981; D'amico et al., 2006; Quaglio et al., 2007).

Επιπλέον, τον εντοπισμό και τη σαφή αυτή αναγνώριση των ανατομικών διαφορών δυσχεραίνει ακόμη περισσότερο η βραγχιακή βλέννα η οποία συχνά έλκεται από τα άγκιστρα και τον πεταλοειδή δίσκο (Κολύγας Μ., 2014). Σε τέτοιου είδους περιπτώσεις θεωρείται γενικά χρήσιμο να λαμβάνεται υπόψιν η ειδοειδικότητα του ξενιστή όπου τα παράσιτα αυτά συνηθίζουν να παρασιτούν και έτσι να οδηγούμαστε στον εντοπισμό του είδους με διαφορική διάγνωση (Amine et al., 2007; Strona et al., 2010).

2.4. Μοριακή ταυτοποίηση

2.4.1. Εξαγωγή γενετικού υλικού

Για την εξαγωγή γενετικού υλικού από τα παραπάνω σκευάσματα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φαινόλης - χλωροφορμίου. Το πρωτόκολλο απαρτίζεται από 3 φάσεις.

Κατά την πρώτη φάση το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf, προστίθενται 250μL TNE, 50μL Tris HCl (1M), 75μL NaCl (1M), 50μL SDS (10%), 10μL Proteinase K (20mg/ml) και ακολουθεί υδατόλουτρο στους 55°C για 2 ώρες.

Στην δεύτερη φάση προστέθηκε 400 μL φαινόλη- χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη (200μL + 200μL) και ανάδευση με φυγόκεντρο για 10 λεπτά (12.000 rpm) στους 4° C. Έπειτα μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέους σωλήνες erpendorf και επαναλήφθηκε πλύση με 400μL χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη (200μL + 200μL), ανάδευση με φυγόκεντρο για 10 λεπτά (12.000 rpm) στους 4°C. Τέλος μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέους σωλήνες erpendorf.

Στην τρίτη φάση προστίθεται 200μL αιθανόλη (100%), ανάδευση με φυγόκεντρο για 10 λεπτά (12.000 rpm) στους 4°C και απομάκρυνση υπερκείμενου. Στην συνέχεια το δείγμα αφυδατώθηκε σε φούρνο στους 55°C για 20 λεπτά. Τέλος προστέθηκαν 20μL TE buffer.

Κατά την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε και το DNA extraction kit «NucleoSpin Tissue XS» ως εναλλακτικός τρόπος εξαγωγής γενετικού υλικού αλλά δεν επέφερε τα αναμενόμενα αποτελέσματα όπως κατάλληλη συγκέντρωση DNA και υψηλή καθαρότητα (π.χ. απουσία προσμίξεων γενετικού υλικού των ιχθύων).

Συστατικά	Συγκέντρωση (μl)
TNE	250μL
Tris HCl (1M)	50 μL
NaCl (1M)	75 μL
SDS (10%)	50 μL
Proteinase K (20 mg/ml)	10 μL
Φαινόλη – χλωροφόρμιο	400 μL
Ισοαμυλική αλκοόλη	400 μL
Αιθανόλη (100%)	200 μL
TE buffer	20 μL

Πίνακας 1 : Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA φαινόλης- χλωροφόρμιου.

2.3.2. Ηλεκτροφόρηση

Για να ελεγχθεί η ποιότητα των προϊόντων της απομόνωσης DNA, δηλαδή η καθαρότητα του δείγματος και η ποσότητα της συγκέντρωσης του DNA χρησιμοποιείται η μέθοδος

της ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης αποτελείται από το μπάνιο ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό τάσης ρεύματος. Για την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης παρασκευάζεται τζελ αгарόζης 1,5% με ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Στο τζελ προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο ποσότητας 2,5μL, το οποίο προκαλεί τον φθορισμό του DNA όταν αυτό εκτεθεί σε UV ακτινοβολία.

2.3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δίνει τη δυνατότητα απόκτησης μεγάλης ποσότητας DNA για ανάλυση. Οι παράγοντες που επιδρούν στην διαδικασία της PCR είναι το δείγμα DNA, η DNA πολυμεράση, η σωστή επιλογή εκκινητών, η συγκέντρωση των ιόντων του δισθενούς μαγνησίου, η συγκέντρωση των dNTP's, η παρουσία ενισχυτών και αναστολέων και ο αριθμός των κύκλων (Αλαχιώτης, 2011).

Στόχος της αντίδρασης είναι ο πολλαπλασιασμός του 18s rRNA τμήματος του παράσιτου *Lamellodiscus erythrinii*. Οι εκκινητές ήταν της τάξεως των 484 βάσεων:

forward: F → **GAGACTCTAACCTGCTAA** και

reverse: R → **TGTTACGACTTGTA CTTC**.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μL, όπου χρησιμοποιήθηκαν 2,5 μL buffer, 0,5 μL dNTP's, 1 μL forward primer, 1 μL reverse primer, 0,1 μL Taq (Kapa Biosystems) και 18,9 μL H₂O.

Συστατικά	Ποσότητα μl
Buffer	2,5μl
dNTP's	0,5 μl
Primers	2 μl
Taq	0,1 μl
H₂O	18,9 μl

Πίνακας 2: Αναλογία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει 35 κύκλους και είναι το εξής:

1. 95°C για 10min
2. 95°C για 1min
3. 50-62°C για 40min
4. 72°C για 1min
5. 72°C για 10min
6. 10°C ∞

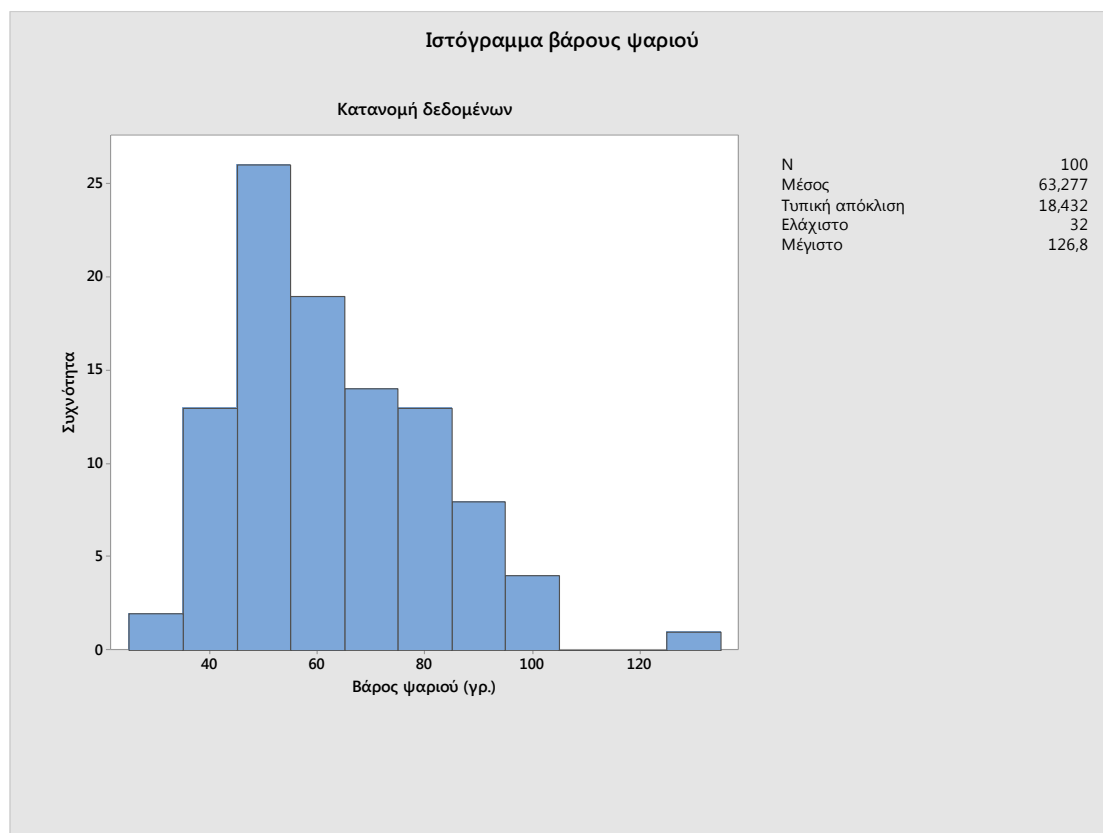
Τα βήματα 3 και 4 επαναλαμβάνονται 34 φορές.

Τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ελέγχονται με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

Τα προϊόντα της PCR στην συνέχεια αποστάλθηκαν στο Vienna Biocenter στην Αυστρία για να επεξεργαστούν περαιτέρω με την τεχνική της χρωματογραφίας (ABF 3730) η οποία στοχεύει στον διαχωρισμό ουσιών από το μείγμα τους. Εξαιτίας του διαχωρισμού αυξάνεται η ικανότητα ανίχνευσης των αναλυόμενων συστατικών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

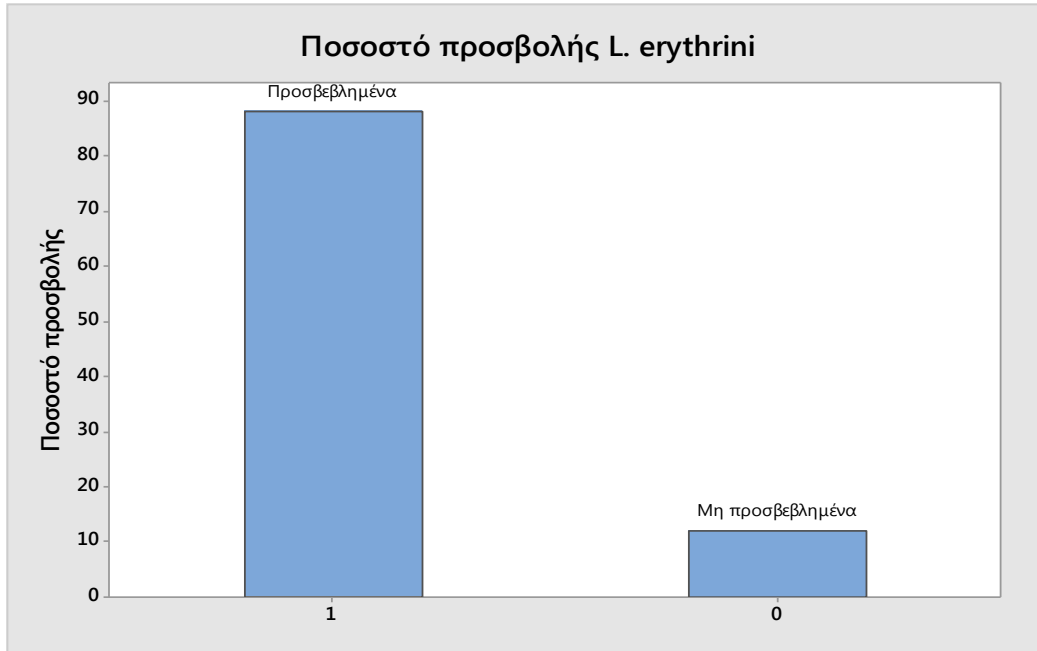
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 100 ψάρια κυρίως μέσου μεγέθους, με μέσο βάρος $63,277 \pm \text{T.A. γρ.}$, μέγιστο τα $126,8 \pm \text{T.A. γρ.}$ και ελάχιστο τα $32 \pm \text{T.A. γρ.}$.



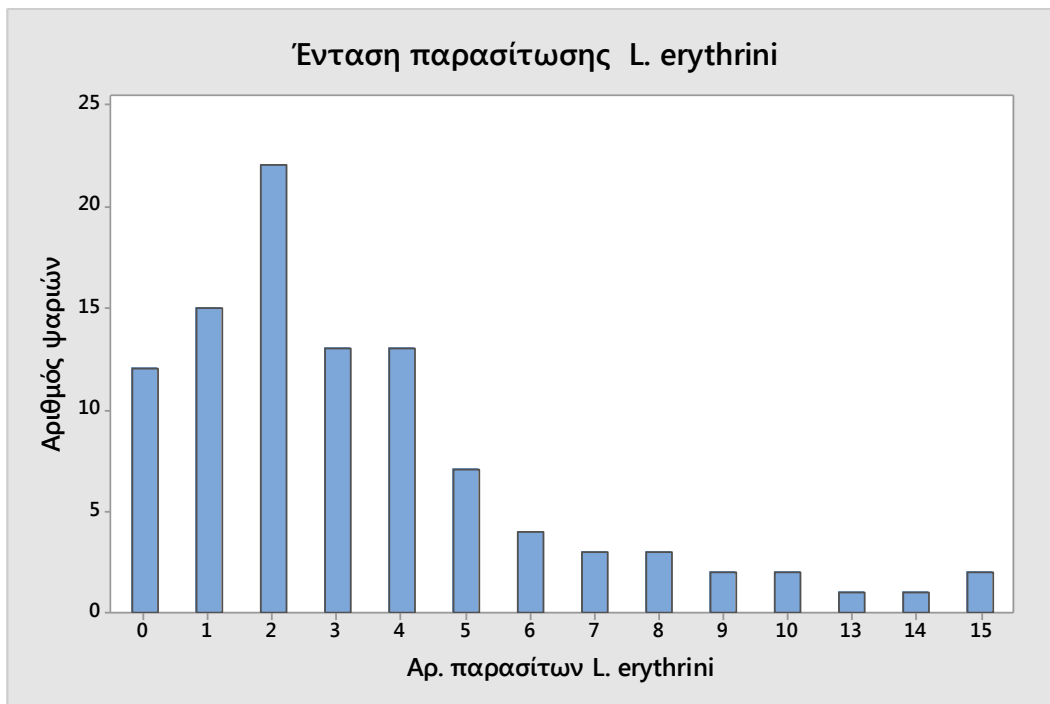
Πίνακας 3: Ιστόγραμμα κατανομής του βάρους των ψαριών.

Στην συνέχεια συλλέχθηκαν δείγματα από το αριστερό και το δεξί βράγχιο του κάθε ψαριού και παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο. Το 12% των ιχθύων δεν ήταν προσβεβλημένο με κάποιο παράσιτο όπως φαίνεται στον πίνακα 4, ενώ στους υπόλοιπους παρατηρήθηκε τουλάχιστον ένα παράσιτο του γένους *Lamellodiscus*. Πιο συγκεκριμένα το 15% των ιχθύων είχε ένα ακριβώς παράσιτο ενώ υψηλή παρασίτωση (10-15 παράσιτα/ ιχθύ) σημειώθηκε μόνο στο 6% των ιχθύων οι οποίοι ήταν της τάξης των 64,9-126,8γρ. (πίνακας 5). Συνολικά μετρήθηκαν 349 παράσιτα του γένους

Lamellodiscus με περίπου 3,49 παράσιτα/ ιχθύ.



Πίνακας 4: Ποσοστά προσβεβλημένων ιχθύων από το *Lamellodiscus erythrini*.



Πίνακας 5: Ένταση παρασίτωσης για το *Lamellodiscus erythrini*.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γνώση των ασθενειών των ψαριών που οφείλονται σε παράσιτα είναι ύψιστης σημασίας, καθώς είναι χιλιάδες τα είδη που παρασιτούν σε βάρος των εμπορικών ψαριών, ενώ είναι αρκετά πιθανό να ανακαλυφθούν ακόμη περισσότερα στο μέλλον (Φώτης & Αγγελίδης, 2003). Τα πιο συνήθη και πολυπληθή εξωπαρασιτικά τρηματώδη των ψαριών είναι τα μονογενή, ενώ μεγαλύτερη ποικιλία των ειδών τους εντοπίζεται στις τροπικές παρά στις εύκρατες περιοχές του πλανήτη (Ramasamy et al., 1995). Σύμφωνα με τους Euzet & Combes (1998) υπολογίζεται πως περισσότερο από το 95% των μονογενών μπορούν να βρεθούν να παρασιτούν στο δέρμα και τα βράγχια των ψαριών, ενώ, συχνά οι παθολογικές αλλαγές που μπορεί να εντοπιστούν στον ξενιστή έχουν προκληθεί από ένα είδος υπερπλασίας της μεμβράνης των βραγχίων αλλά και νέκρωσης και αποσύνθεσης των ιστών όπου τα παράσιτα εισάγουν τα όργανα προσκόλλησης με τους ξενιστές.

Στις ιχθυοκαλλιέργειες, παρατηρούνται συχνά υψηλά ποσοστά θνησιμότητας καθώς οι ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υψηλή θερμοκρασία συνδυαζόμενη με υψηλή ιχθυοφόρτιση και κακή διαχείριση της εκτροφής αποτελούν ευνοϊκούς παράγοντες για την εμφάνιση εξάρσεων παρασιτισμού. Στην παρούσα προπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη του παρασιτικού φορτίου λυθρινιών *Pagellus erythrinus* που αλιεύθηκαν από τον Παγασητικό κόλπο με τράτα βυθού. Η συγκεκριμένη μελέτη σχετίζεται άμεσα με τα εντατικά εκτρεφόμενα ψάρια καθώς η γνώση του παρασιτικού φορτίου των ελεύθερων λυθρινιών αποτελεί παράγοντα έγκυρης πρόληψης ή ακόμη και έγκαιρης διάγνωσης μιας παθολογικής κατάστασης σε εκτρεφόμενα λυθρίνια.

Παράσιτα του είδους *L. erythrini* βρέθηκαν σε αφθονία στα βράγχια ψαριών. Αυτό το είδος παρασίτου ανήκει στα μονογενή τρηματώδη και λογίζεται ως κοινό παράσιτο του δέρματος και των βραγχίων. Μπορούν να εντοπιστούν πολλά και διάφορα είδη μονογενών (~1500) τα περισσότερα από τα οποία στη φύση παρασιτούν σε συγκεκριμένους ξενιστές, εξειδίκευση η οποία συχνά εξαφανίζεται σε συνθήκες ιχθυοκαλλιέργειας.

Σύμφωνα με τους Whittington et al. (2000), τα μονογενή αποτελούν το είδος των παρασίτων με την μεγαλύτερη εξειδίκευση σχετικά με τον ξενιστή και ενδεχομένως να εντοπίζεται σε αυτά η μεγαλύτερη εξειδίκευση που έχει παρατηρηθεί ποτέ σε παράσιτα. Επιπροσθέτως, η μελέτη των Simkóna et al. (2001) που αφορά τη μορφολογία των μονογενών ως προς την εξειδίκευση σχετικά με τους ξενιστές απέδειξε πως τα όργανα σύνδεσης των παρασίτων με τους ξενιστές εμφανίζουν εξειδίκευση όχι μόνο σε σχέση με το είδος του ξενιστή αλλά και ως σχετικά με το σημείο πρόσδεσης στο σώμα αυτού.

Για να προσδιοριστούν ευκολότερα αυτά τα παράσιτα, σημαντικά χαρακτηριστικά αποτελούν το μήκος του σώματος, το μέγεθος των σφινγκτήρων, καθώς και ο αριθμός τους. Το μήκος διαφέρει και επηρεάζεται όχι μόνο από τη συστολή του σώματος τη στιγμή της παρατήρησης (ή της χρώσης), αλλά και από το μέγεθος του ξενιστή (το μέγεθος των παρασίτων σχετίζεται με το μέγεθος του ξενιστή) και από τη θερμοκρασία (συχνά παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των παρασίτων σε ενδεχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας). Αντίστοιχα, ο αριθμός και τα μεγέθη των σφινγκτήρων έχουν σχέση άμεσης εξάρτησης από το μέγεθος του ξενιστή και τη θερμοκρασία (Hayward et al, 2007).

Η εμφάνιση μονογενών σε μεγάλο βαθμό αποτελεί, όπως έχει ήδη σημειωθεί, δείκτη κακής υγιεινής και υποβαθμισμένης ποιότητας του νερού (π.χ. υπερπληθυσμός, υψηλά ποσοστά αμμωνίας και νιτρικών ιόντων, οργανική μόλυνση αλλά και χαμηλά επίπεδα οξυγόνου). Οι συνθήκες αυτές ευνοούν την ταχύτατη ανάπτυξη των μονογενών. Ο χρόνος διπλασιασμού για ζωοτόκα μονογενή συχνά προσεγγίζει τις 24 ώρες. Η θερμοκρασία συχνά επηρεάζει το ρυθμό αναπαραγωγής, η ακμή του οποίου εντοπίζεται χρονικά στους μήνες της άνοιξης (Noga, 2000).

Τα μονογενή αποτελούν είδος εξωτερικών παρασίτων και εντοπίζονται σε ποικίλες ομάδες ψαριών, προσβάλλουν ωστόσο με μεγαλύτερη συχνότητα τους οστεϊχθύες. Οι μηχανισμοί εξειδίκευσης των μονογενών σχετικά με τον ξενιστή ταλανίζουν τους ερευνητές της παρασιτολογίας για χρόνια. Θεωρητικά ο αριθμός του πληθυσμού των μονογενών είναι τόσο υψηλός όσο και αυτός

των ψαριών, σύμφωνα με υπολογιστικές προσεγγίσεις που έχουν γίνει, ο αριθμός αυτός εκτιμάται πως ξεπερνά τα 25000 είδη (Buchmann & Lindenstrøm, 2002). Τα μονογενή, ακόμη, αποτελούν τα συνηθέστερα και με μεγαλύτερη ποικιλία εξωπαρασιτικά τρηματώδη των ψαριών, ενώ η μεγαλύτερη ποικιλότητα των ειδών εμφανίζεται στις τροπικές παρά στις εύκρατες περιοχές του πλανήτη. Τα περισσότερα μονογενή παρασιτούν στα βράγχια ή το δέρμα των ψαριών, ενώ ορισμένα γένη δεν είναι απίθανο να βρεθούν και σαν ενδοπράσιτα στα εσωτερικά όργανα. Στη φυσική τους κατάσταση εντοπίζονται σε σχετικά μικρούς αριθμούς και προκαλούν ελάχιστα ή ακόμη και καθόλου προβλήματα στα ζώα όπου παρασιτούν. Λογίζονται, ωστόσο, τα μονογενή ως παθογόνα και η παρουσία τους δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε απώλειες οικονομικής φύσης. (Ramasamy et al., 1995).

Σχετικά με τον κύκλο ζωής τους, όσον αφορά παράσιτα που βρίσκονται σε περιβάλλοντα θερμών υδάτων η διάρκεια ζωής τους μπορεί να προσεγγίσει τον ένα χρόνο ενώ η διάρκεια ζωής των παρασίτων αυτών που εντοπίζονται σε ψυχρότερα ύδατα μπορεί να φτάσει τα δύο ή ακόμη και περισσότερα χρόνια (Papeina, 1991).

Όσον αφορά το βιολογικό κύκλο των μονογενών, αυτός ξεκινά με τη λάρβα (oncomiracidium) να εκκολάπτεται από το αυγό τη σταδιακή μετατροπή της σε ενήλικο άτομο χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσου ξενιστή. Μόνο για μερικά είδη έχει προταθεί ότι ένας ενδιάμεσος ξενιστής μπορεί να περιλαμβάνεται στον κύκλο ζωής. Οι ενδιάμεσοι ξενιστές καταναλώνονται από τους μεγαλύτερους τελικούς ξενιστές στα βράγχια των οποίων θα καταλήξουν τελικά τα παράσιτα (Rohde, 1984).

Το γένος *Lamellodiscus* εντοπίζεται σε όλη την υφήλιο και αποτελείται από 55 περίπου είδη, ενώ τα *Lamellodiscus* των *Sparidae* έχουν αποτελέσει πρότυπο για τη μελέτη της συνεξέλιξης και της ειδογένεσης. Τα είδη του *Lamellodiscus* θεωρούνται παθογόνα για τα εκτρεφόμενα ψάρια και η γνώση του κύκλου ζωής, της μορφολογίας και των χαρακτηριστικών τους

είναι άκρως σημαντική για την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας των ελεγχόμενων ιχθυοκαλλιεργειών. (Justine & Briand, 2010).

Το γένος αυτό, ωστόσο, αποτελεί ίσως ένα από τα δυσκολότερα γένη όσον αφορά την αναγνώρισή του. Έως και τις προηγούμενες δεκαετίες αποτελούνταν από 66 είδη, ενώ πλέον τα είδη που βρίσκονται υπό τη σκέπη του είδους αυτού αριθμούνται στα 58 απόφαση που πάρθηκε μετά από διάφορες προτάσεις. Οι μικρές μορφολογικές και ανατομικές διαφορές του γένους καθώς επίσης και ο μεγάλος αριθμός ειδών που το αποτελούν είναι τα στοιχεία αυτά τα οποία καθιστούν τόσο δύσκολη την αναγνώρισή του.

Ο Desdevises (2006) υποστηρίζει πως το μέγεθος του ξενιστή έχει κάποια σχέση με την μεγάλη ποικιλία των ειδών του *Lamellodiscus*. Την ίδια υπόθεση στηρίζουν με την εργασία τους οι Sasal et al. (1999) όπου μελετήθηκε η εξειδίκευση καθώς και η προβλεψιμότητα των μονογενών παρασίτων των ψαριών σε σχέση με τον ξενιστή. Εντοπίστηκε πως τα πιο εξειδικευμένα παράσιτα βρίσκονται σε ξενιστές με μεγαλύτερο μέγεθος. Παράλληλα, σχετικά με τα εξειδικευμένα ως προς τον ξενιστή παράσιτα έχει εντοπιστεί μια αναλογία του μεγέθους του σώματος του ξενιστή με αυτό των παρασίτων.

Στη Μεσόγειο έχει μελετηθεί εκτενώς το γένος *Lamellodiscus*, έτσι το πρότυπο εξειδίκευσης του ξενιστή είναι γνωστό. Στο γένος αυτό εντοπίζονται κάποια από τα πιο αυστηρά εξειδικευμένα είδη που παρασιτούν αποκλειστικά σε ένα είδος μονάχα ξενιστή. Εντοπίζονται ωστόσο και είδη που παρασιτούν σε αρκετούς διαφορετικούς ξενιστές (Kaci-Chaouch et al., 2008). Είδη παρασίτων που παρασιτούν σε όλο τον κόσμο σε ψάρια της οικογένειας *Sparidae* έχει εξακριβωθεί πως έχουν μεγάλη εξειδίκευση σε σχέση με τον ξενιστή (Desdevises et al., 2000).

Σε ψάρια που μεταναστεύουν εντοπίζεται μεγαλύτερη ποικιλία παρασίτων του γένους *Lamellodiscus*. Αυτό αποτελεί απόδειξη του γεγονότος πως νέα είδη παρασίτων μπορούν να παρασιτήσουν σε ψάρια από διάφορες γεωγραφικές περιοχές και υποδηλώνει άμεση σύνδεση μεταξύ

της ποικιλότητας των ειδών των παρασίτων και της γεωγραφικής εξάπλωσης των ξενιστών. Αυτό ωστόσο κάνει ξεκάθαρο το γεγονός πως τα παράσιτα δεν χάνονται όταν το ψάρι μεταναστεύει σε νέες γεωγραφικές περιοχές. Απόρροια του γεγονότος αυτού αποτελεί και το ότι πολλά είδη παρασίτων του γένους *Lamellodiscus* έχουν εντοπιστεί σε όλα τα μήκη και πλάτη της Μεσογείου σε μια ποικιλία ξενιστών, ενώ αποδεδειγμένο είναι πλέον πως οι εξωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να μην αποτελούν τροχοπέδη στην ύπαρξη των παρασίτων σε μεταναστευτικά ψάρια (Desdevises, 2006).

Γενικά, η εμφάνιση των παρασίτων ανεξάρτητα από το είδος οδήγησε στη θεωρία της εποχικότητας καθώς και της πεποίθησης πως η εμφάνισή τους στα βράγχια των εκτρεφόμενων ειδών συνδυαζόταν με την εμφάνιση αντίστοιχων παρασίτων στα βράγχια ψαριών ελεύθερης διαβίωσης. Ουσιαστικά η υπόθεση αυτή υποδεικνύει πως τα άγρια ψάρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά παρασίτων καθώς και τη μόλυνση των εκτρεφόμενων πληθυσμών. Η εμφάνιση και η ένταση των παρασίτων παρατηρήθηκε να αυξάνεται κατά τους χειμερινούς μήνες, ενώ παρατηρήθηκε μικρότερη ένταση καθώς και εμφάνισή τους.

Παράσιτα του γένους *Lamellodiscus* έχουν εντοπιστεί σε δείγματα ιχθύων *Lithognathus mormyrus*, που αλιεύθηκαν στη Γαλλία με το ποσοστό προσβολής από τα παράσιτα *L. verberis* να προσεγγίζει το 100%, ενώ αυτό των παρασίτων *L. flagellatus* πλησίαζε στο ίδιο είδος ψαριού το 77% (Boudaya et al., 2009). Παράλληλα, εντοπίστηκαν παράσιτα του είδους *L. tubulicornis* σε ψάρια *Gymnocranius grandoculis*, (Valenciennes, 1830) που αλιεύθηκαν στη Νέα Καληδονία σε ποσοστό της τάξης του 100%, ενώ εξαιρετικά σημαντική ήταν και η ένταση της προσβολής με εκατοντάδες παράσιτα μονάχα σε ένα ψάρι (Justine & Briand, 2010). Από την άλλη, σύμφωνα με τους Mladineo & Maršić-Lušić (2007), και τη μελέτη τους σχετικά με το παρασιτικό φορτίο σε ψάρια *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) εντοπίστηκε ότι το ποσοστό παρασίτωσης από τα παράσιτα *L. elegans* προσέγγιζε σχεδόν το 15%.

Τα παράσιτα που ανήκουν στο γένος *Lamellodiscus* έχουν άγκιστρο, δύο ζευγάρια αγκιστριδίων αλλά και δύο ελασματοειδείς δίσκους που περιλαμβάνουν 10 ζευγάρια μεμβρανών. Η πρώτη είναι κλειστή, ενώ η τελευταία προσομοιάζει σχήμα μισοφέγγαρου.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι για πρώτη φορά ταυτοποιήθηκε το *L. erythrini* μοριακά καθώς έως τώρα η αναγνώρισή του είχε πιστοποιηθεί μονάχα με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την μελέτη του παρασιτικού φορτίου του λυθρινιού *Pagellus erythrinus*, 100 δείγματα του οποίου αλιεύθηκαν στην περιοχή του Παγασητικού κόλπου, έγινε σαφές πως η γνώση του παρασιτικού φορτίου των λυθρινιών είναι δυνατό να οδηγήσει στην πρόληψη καθώς και την έγκαιρη διάγνωση μιας παθολογικής κατάστασης σε εκτρεφόμενα λυθρίνια.

- ✓ Τα *L. erythrini* ήταν το είδος παρασίτου που αναγνωρίστηκε.
- ✓ Εντοπίστηκε τουλάχιστον ένα είδος της οικογένειας *Lamellodiscus* να παρασιτεί στο δέρμα, σχεδόν σε ποσοστό που προσέγγιζε το 80% , των ιχθύων που εξετάστηκαν.
- ✓ Ένα ακριβώς παράσιτο βρέθηκε σε ποσοστό 15 % των εξεταζόμενων ψαριών.
- ✓ Υψηλή παρασίτωση του ποσοστού των 10 με 15 παράσιτα ανά ιχθύ εντοπίστηκε στο 6% των ιχθύων.
- ✓ Κατά τους θερινούς μήνες παρατηρείται μια αυξητική τάση των παρασιτώσεων καθώς ευνοϊκές για τον βιολογικό τους κύκλο είναι οι τότε καιρικές συνθήκες .
- ✓ Τα παράσιτα του γένους *Lamellodiscus* μπορούν να παρασιτήσουν σε ψάρια από διάφορες γεωγραφικές περιοχές.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Amine, F. And Euzet, L., 2005. Two new species of the genus *Lamellodiscus* Johnston & Tiegs, 1922 (Monogenea: Diplectanidae) parasites of Sparidae (Teleostei) of the Algerian coasts. *Systematic parasitology*, 60(3), pp. 187-196.

Amine, F., Euzet, L., Kechemirissad, N., 2007. Description of *Lamellodiscus Confusus* N. SP. (Monogenea: Diplectanidae), parasite of *Sarpa Salpa* (Teleostei: Sparidae). *Parasite*, 14(4), pp. 281-285.

Amine, F., Neifar, L., Euzet, L., 2006. *Lamellodiscus sanfilippo* n. sp. (Monogenea, Diplectanidae) parasite from the gills of *Diplodus sargus* (Teleostei, Sparidae) in Mediterranean Sea. *Parasite*, 13(1), pp 45-49

Barber, I. (2007). Parasites, behaviour and welfare in fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 104: 251-264.

Boudaya, L., Neifar, L. & Euzet, L. (2009). Diplectanid parasites of *Lithognathus mormyrus* (L.) (Teleostei: Sparidae) from the Mediterranean Sea, with the description of *Lamellodiscus flagellatus* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae). *Syst. Parasitol*, 74: 149-159.

Buchmann, K. & Lindeanstrøm (2002). Interactions between monogenea parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 32: 309-319.

Cribb, T.H., Chisholm, L.A. & Bray, R.A. (2002). Diversity in the Monogenea and DigeneaQ does lifestyle matter?. *International Journal of Parasitology*, 32: 321-328.

D'amico, V., Canestri Trotti, G., Culurgioni, J., Figus, V., 2006. Helminth parasite community of *Diplodus annularis* L. (Osteichthyes, Sparidae) from Gulf of Cagliari (Sardinia, South Western Mediterranean). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26, pp.222.

Desdevises, Y. (2006). Determinants of parasite species richness on small taxonomical and geographical scales: *Lamellodiscus* monogeneans of northwestern Mediterranean sparid fish. *Journal of Helminthology*, 80: 235-241.

Desdevises, Y., Jovelin, R., Jousson, O. & Morand, S. (2000). Comparison of ribosomal DNA sequences of *Lamellodiscus* spp. (Monogenea, Diplectanidae) parasiting *Pagellus* (Sparidae, Teleostei) in the North Mediterranean Sea: species divergence and coevolutionary interactions.

International Journal for Parasitology, 30: 741-746.

Domingues, M.V. And Boeger, W.A., 2008. Phylogeny and revision of Diplectanidae Monticelli, 1903 (Platyhelminthes: Monogeneoidea). *Zootaxa*, (1698), pp. 1-40.

Euzet, L., 1957. Recherches sur les Monogeneoidea parasites de poisson marins. *Annales de Parasitologie*, 32(5-6), pp. 469-484

Harms, C.A. (1996). Treatment for Parasitic Diseases of Aquarium and Ornamental Fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 5 (2): 54-63.

Hayward, C.J., Bott, N.J., Itoh, N., Iwashita, M., Okihiro, M. & Nowak, B.F. (2007). Three species of parasites emerging on the gills of mullet, *Argyrosomus japonicus* (Temminck and Schlegel, 1843), cultured in Australia. *Aquaculture*, 265: 27-40.

Justine, J.L. & Briand, M.J. (2010). Three new species, *Lamellodiscus tubulicornis* n. sp., *L. magnicornis* n. sp. and *L. parvicornis* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae) from *Gymnocranius* spp. (Lethrinidae: Monotaxinae) off New Caledonia, with the proposal of the new morphological group 'tubulicornis' within *Lamellodiscus* Johnston & Tiegs, 1992. *Syst Parasitol*, 75: 159-179.

Justine, J.L. & Briand, M.J. (2010). Three new species, *Lamellodiscus tubulicornis* n. sp., *L. magnicornis* n. sp. and *L. parvicornis* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae) from *Gymnocranius* spp. (Lethrinidae: Monotaxinae) off New Caledonia, with the proposal of the new morphological group 'tubulicornis' within *Lamellodiscus* Johnston & Tiegs, 1992. *Syst Parasitol*, 75: 159-179.

Kaci-Chaouch, T., Verneau, O. & Desdevises, Y. (2008). Host specificity is linked to intraspecific variability in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). *Parasitology*, 135: 607-616.

Mladineo, I. & Maršić-Lučić, J. (2007). Host Switch of *Lamellodiscus elegans* (Monogenea: Monopisthocotylea) and *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea) between Cage-reared Sparids. *Veterinary Research Communications*, 31: 153-160.

- Noga, E.J. (2000).** Problems 10 through 42. In: Fish Disease Diagnosis and Treatment. 2nd., Iowa State University Press, Ames, Iowa: 1-367.
- Paperna, I. (1991).** Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annual Rev. of Fish Diseases*, 155-194.
- Quaglio, F., Florio, D., Gustinelli, A., Caffara, M., Marcer, F., Fiorravanti, M., L., 2007.** Gill monogeneans in marine fish cultured in Italy: Histopathological observations. *Parassitologia*, 49, pp.75.
- Ramasamy, P., Brennan, G.P., Halten, D.W. (1995).** Ultrastructure of the Surface Structures of *Allo discocotyla diacanthi* (Polypisthocotylea: Monogenea) from the Gills of the Marine Teleost Fish, *Scomberoides tol*, 25: 43-54.
- Ramasamy, P., Ramalingam, K., Hanna, R.E.B. & Halton, D.W. (1985).** Microhabitats of gill parasites (Monogenea and copepoda) of Teleosts (*Scomberoides* spp.). *International Journal for Parasitology*, 15 (4): 385-397.
- Rohde, K. (1984).** Diseases caused by metazoans: Helminths. In: Diseases of Marine Animals. Ed. Ottokinne, Hamburg: 1-557.
- Sasal, P., Trouvé, S., Müller-Graf, C. & Morand, S. (1999).** Specificity and host predictability: a comparative analysis among monogenean parasites of fish. *Journal of Animal Ecology*, 68: 437-444.
- Simcová, A., Desdevises, Y., Gelnar, M. & Morand, S. (2001).** Morphometric correlates of host specificity in *Dactylogyrus* species (Monogenea) parasites of European Cyprinid fish. *Parasitology*, 123: 169-177.
- Strona, G., Stefani, F., Galli, P., 2010.** Monogenoidean parasites of Italian marine fish: An updated checklist, *Italian Journal of Zoology*, 77:4. pp. 419-437.
- Tonguthai, K. (1997).** Control of freshwater fish parasites: a Southern Asian perspective. *International Journal for Parasitology*, 27 (10): 1185-1191.
- Ulmer, M.,J., James, H.,A., 1981.** Monogeneans of marine fishes from the Bay of Naples. *Transactions of the American Microscopical Society*, 100, pp.392–409.
- Whittington, I.D., Cribb, B.W., Hamwood, T.E. & Halliday, J.A. (2000).** Host-specificity of monogenean (platyhelminth) parasites: a role for anterior adhesive areas?. *International Journal for Parasitology*, 30: 305-320.

Williams, H. & Jones, A. (1994). The variety of fish worms. In: Parasitic Worms of Fish. Taylor & Francis Ltd, London: 1-593.

Ελληνική βιβλιογραφία

Καπίρης, Κ. Το λιθρίνι (*Pagellus Erythrynus*). *Θαλάσσια Βιολογία*, p. 1. Retrieved from <http://imbriw.hcmr.gr/en/wp-content/uploads/2014/01/Lithrini.pdf>

Κεντούρη, Μ. Εκτροφή ιχθύων- Εκκολαπτήρια. Presentation, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Κλαουδάτος Σ., Κλαουδάτος Δ., (2012). Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών, Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα, pp. 283-297.

Κολύγας ν. Μάρκος, (2014). Εφαρμογή πρωτότυπων θεραπευτικών αγωγών για την αποτελεσματική καταπολέμηση των εξωπαρασιτώσεων όπως αυτές εμφανίζονται στις εντατικές καλλιέργειες ειδών ψαριών μεσογειακής καλλιέργειας. 1st ed. [ebook] Καρδίτσα: τμήμα κτηνιατρικής του πανεπιστημίου θεσσαλίας,pp.17-26,37-92.

Φατούρου, Ι. (2001). *Στοιχεία Βιολογίας και Εκτροφής του Pagellus erythrinus*, Μεσολόγγι : p. 6

Φώτης, Γ. & Αγγελίδης, Π. (2003). Ιχθυοπαθολογία: Παρασιτικά νοσήματα Ιχθύων. Στο: Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη: 1-430

7. ABSTRACT

The continued development of the aquacultural industry in Greece in the past decades has highlighted the existence of a large number of diseases, which are directly or indirectly connected to various pathogenetic agents, the treatment of which seems to be necessary and achievable only through better knowledge of their operation. Knowledge of fish pathology is therefore necessary not only to deal with any kind of pathological problems observed in breeding and rearing cycle of the fish and for the protection of public health.

This project's purpose is to study the parasitic load of common pandora (*Pagellus erythrinus*), 100 samples from which were taken from the Pagasitikos Gulf. More specifically, the main objectives was to identify ectoparasites observed in fish that were tested, the calculation of the attack rates, the intensity and the frequency of occurrence, and the molecular identification of ectoparasite *Lamellodiscus erythrini*. For the needs of the experimental procedure 100 pandoras were captured from the area of the Pagasitikos Gulf with bottom trawl. Samples were observed by optical microscope, parasitosis intensity was recorded, as was the morphological identification of ectoparasite *L. erythrini*. The infection rates of around 80%, while high infestation (10-15 parasites / fish) was observed in 6% of the sample.

Then, phenol-chloroform protocol was used for ectoparasites genetic material extraction. For further analysis, of the extraction genetic material, polymerase chain reaction was used. Finally the samples were sent to Vienna Biocenter in Austria, where it was first verified the molecular sequence of ectoparasites (*L. erythrini*) collected, in Greece.

Key words: *Pagellus erythrinus*, *Lamellodiscus erythrini*, Pagasitikos gulf, Ichthyopathology, Ectoparasites