

HISTOLOŠKA PROCENA ZRELOSTI GONADA ŽENKI LINJAKA (*TINCA TINCA L.*) IZ RIBNJAKA ŽABENI (REPUBLIKA MAKEDONIJA)

Jelena Lujčić¹, Zoran Marinović¹, Stojmir Stojanovski², Lidija Velkova-Jordanoska², Goran Marković³, Desanka Kostić¹

Izvod: Cilj rada je bio da se na osnovu histološke analize gonada ženki linjaka utvrdi njihovo stanje i zastupljenost različitih tipova i morfoloških osobina oocita u toku perioda mresta. Uzorkovanje je vršeno na ribnjaku Žabeni (Republika Makedonija) tokom aprila i jula meseca 2013. godine. Pregledom histoloških preparata utvrđeno je postojanje različitih tipova folikula koji su varirali u veličini i površini. U toku aprila nisu uočeni folikuli E tipa, ali je na osnovu zastupljenosti ostalih tipova, bilo jasno da su jedinke spremne za sezonu mresta. Pregledom uzoraka iz jula utvrđeno da su jedinke prethodno oslobodile najmanje jednu porciju jaja (ikre), kao i da sledi bar još jedna porcija. Dobijeni rezultati ukazuju na značaj histološkog pregleda gonada s obzirom da pruža mogućnost detaljnijeg uvida u strukturu gonada kao i osobine pojedinačnih oocita.

Ključne reči: linjak, reprodukcija, reproduktivni ciklus, vitelogeneza

Uvod

Linjak (*Tinca tinca L.*) pripada komercijalno značajnim šaranskim ribama. Vrsta je bila zastupljenija u drugoj polovini 20. veka u poređenju sa savremenom akvakulturom. Tome su doprineli duže vreme uzgoja i sporiji tempo rasta u odnosu na šarana (*Cyprinus carpio*). Visok kvalitet i cenjena gastronomska svojstva uslovljavaju potrebu tržišta za linjakom. Poslednjih godina se sprovode aktivnosti u cilju povratka vrste u ribnjake. Brojne su publikacije o reproduktivnoj biologiji linjaka u otvorenim vodama (Yilmaz, 2002; Erdugen and Goksu 2011; Pompei et al., 2012). Manji broj studija se bavi histološkim analizama gonada u cilju utvrđivanja njihove zrelosti i statusa. Zbog ekonomskog značaja i interesovanja tržišta, potrebno je upoznati sve aspekte reproduktivnog ciklusa i unaprediti tehnike oplodnje u kontrolisanim uslovima.

Uspešnost reprodukcije linjaka zavisi od velikog broja faktora. Pored brojnih ekoloških faktora, najvažniji proces u veštačkom mrestu linjaka je izbor odgovarajućih matičnih jedinki. Odabrani primerci moraju biti zadovoljavajućeg zdravstvenog stanja i fizioloških osobina. Pored toga, neophodno je precizno utvrditi zrelost njihovih gonada i pripremljenost za mrest. Pri odgovarajućem temperaturnom režimu, linjak se mresti 3-9 puta tokom sezone - prisutan je porcioni mrest (Horoszewicz, 1983).

¹ Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad, Srbija (jelena.lujic@dbe.uns.ac.rs)

² Hidrobiološki institut, Ohrid, Republika Makedonija

³ Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Srbija

Poslednjih godina razvijaju se savremene metode određivanja statusa i zrelosti gonada, poput laparoskopije (Macri et al., 2011). Međutim, histološki pregled tkiva i dalje predstavlja standardan postupak za dobijanje najpreciznijih podataka neophodnih za upoznavanje reproduktivnih ciklusa. Ovako prikupljene informacije su od izuzetnog značaja za kvalitetno upravljanje procesom veštačke oplodnje (Mahmoud, 2009).

Cilj rada je bio da se histološkom analizom gonada ženki tokom reproduktivnog perioda utvrdi stanje zrelosti gonada i zastupljenost različitih tipova i osobina oocita.

Materijal i metode rada

Za histološku analizu gonada linjaka uzeto je 6 ženki sa ribnjaka Žabeni u Republici Makedoniji. Tri jedinke su uzorkovane u aprilu, tri tokom jula meseca 2013. godine. Jedinke su anestetizirane rastvorom karanfilićevog ulja u ambijentalnoj vodi, a potom žrtvovane. Nakon uginuća, mereni su totalna i standardna dužina tela i masa primeraka. Starost uzorkovanih riba je određena lupom, očitavanjem svetlijih i tamnijih zona na krležama uzetim sa bokova tela.

Tabela 1. Tipovi folikula u različitim fazama razvoja (Pimpicka, 1989)
Table 1. Follicule types in the different phases of development (Pimpicka, 1989)

Faza razvoja <i>Phases of development</i>	Opis <i>Description</i>
A	Predstavljaju najranije oocite nastale mitotičkom deobom oogonija. U ovom stadijumu nemaju sloj folikularnih ćelija i u kontaktu su jedna sa drugom.
B	Oocite tokom protoplazmatičnog rasta. Dolazi do inicijalnog uvećanja oocita koje više nisu u neposrednom kontaktu pošto dolazi do njihovog razdvajanja.
C	Oocite u periodu vakuolizacije. Jajna ćelija se i dalje uvećava. Dolazi do nakupljanja vakuola unutar jajnih ćelija. Pojavljuje se zona pellucida koja predstavlja sloj amorfne materije između jajne ćelije i folikularnih ćelija.
D	Nastavak uvećavanja oocita i nakupljanja vakuola. Formira se teka folikula.
E	Folikuli u fazi vitelogeneze. Dolazi do značajnog uvećanja oocita, primarno preko akumulacije egzogeno nastalih prekursora žumančanih proteina.

Za histološke analize uziman je uzorak gonada iz središnjeg dela i fiksiran u 10% formalinu. Uzorci su procesirani standardnom histološkom tehnikom i bojani standardnom hematoksilin-eozin (H&E) tehnikom. Histološki preparati posmatrani su pod mikroskopom Zeiss Axio Imager A1 i slikani kamerom Zeiss AxioCam MRc5. Pomoću softvera ImageJ su za svaki folikul u vidnom polju mereni površina i dva prečnika (prečnik duž najduže ose i prečnik ose normalne na prethodnu). Za određivanje faza razvoja reproduktivnih ćelija, korišćena je skala po Pimpicka (1989). Razvoj oocita je determinisan na osnovu morfološkog izgleda i tekstualnog opisa (Tabela 1).

Rezultati istraživanja i diskusija

Histološkom analizom gonada izvršena je procena zastupljenosti određenih tipova folikula i zrelosti gonada. Relevantni podaci za svaki folikul registrovan na fotografijama su prikazani u Tabeli 2.

U jedinkama izlovljenim u aprilu su zabeleženi svi tipovi folikula, osim tipa E. Uočena je intenzivna vakuoalizacija i relativno visoka zastupljenost folikula C tipa. Dominantni su folikuli tipa B. Kod jedinki izlovljenih u julu uočen je izrazito asinhron rast i sazrevanje folikula. Najveće variranje dimenzija je registrovano kod folikula tipa D. Na preparatima su, pored C i D tipa folikula, dominirali izuzetno krupni folikuli tipa E. U uzorku je bila uočljiva i pojava pojedinačnih atretičnih folikula.

Tabela 2. Srednje vrednosti \pm S.D. osnovnih dimenzija različitih tipova folikula
 Table 2. Mean \pm S.D. values for dimensions of various types follicles

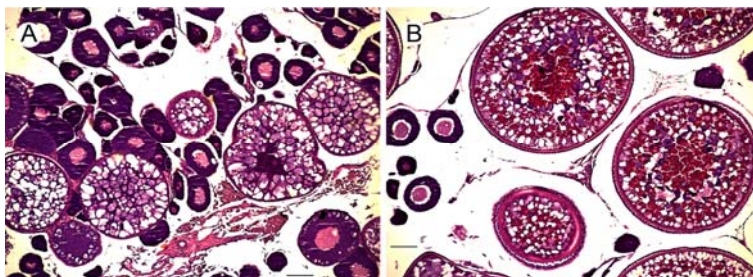
Tip folikula <i>Follicle type</i>	Meseci <i>Months</i>	Prečnik 1 (μm) <i>Diameter 1 (μm)</i>	Prečnik 2 (μm) <i>Diameter 2 (μm)</i>	Površina (μm^2) <i>Area (μm^2)</i>
A	april	94.27 \pm 19.62	76.88 \pm 16.97	5891.16 \pm 2345.79
	jul	99.97 \pm 19.83	76.31 \pm 19.23	6269.61 \pm 2668.15
B	april	130.49 \pm 30.18	110.13 \pm 31.44	11973.66 \pm 6139.95
	jul	130.53 \pm 26.60	115.04 \pm 26.58	11921.24 \pm 4119.49
C	april	236.93 \pm 34.60	224.60 \pm 32.71	41059.93 \pm 11568.22
	jul	258.07 \pm 26.41	223.90 \pm 25.97	45697.57 \pm 8852.23
D	april	321.31 \pm 68.89	299.83 \pm 65.90	79028.69 \pm 34638.03
	jul	330.40 \pm 61.26	314.03 \pm 64.00	84439.99 \pm 33455.34
E	april	400.10 \pm 95.24	375.48 \pm 96.28	124870.75 \pm 64500.58
	jul	425.15 \pm 101.21	381.45 \pm 97.44	134027.03 \pm 64708.95

Analizirane jedinke su gajene u polikulturi sa šaranom i hranjene kompletnom hranom za šarana. U ribnjačkim uslovima može u pojedinim godinama doći do odloženog ili čak i izostanka sazrevanja jedinki usled naglih temperaturnih fluktuacija tokom sezone mresta (Horoszewicz, 1983).

Uzorkovanje je vršeno krajem aprila pri t° vode iznad 10°C . Temperature više od 10°C predstavljaju „okidač“ za proces vitelogeneze (Breton et al., 1980). U uzorkovanim ženka uočen je veliki broj folikula B tipa, kao i značajan broj folikula D tipa sa vakuolama koje se prostiru do jedra (Slika 1). U maju najniža t° vode je bila 16°C (prosečna 18.1°C), što je omogućilo ubrzani proces vitelogeneze. Tokom ove sezone nisu uočljivi folikuli E tipa, što je potvrda III stadijum zrelosti (Pimpicka, 1989).

Tokom jula meseca temperature vode su bile u rasponu od 22°C do 25.1°C , optimalnim za nesmetani tok vitelogeneze. Proces potvrđuje visoka zastupljenost folikula E tipa, manje ili više ispunjeni žumancetom (Slika 1). Postojanje pojedinačnih atretičnih folikula, kao i izvestan broj folikula u različitim fazama protoplazmatičnog rasta i vakuoalizacije, ukazuje da su ženke prošle bar jedan proces oslobađanja jaja. Najverovatnije se to desilo u junu mesecu, pri prosečnoj temperaturi vode od 20.5°C . Navedeni podaci nalaze se u skladu sa istraživanjima drugih autora koji su utvrdili da se najveći broj jedinki linjaka mresti upravo u periodu od maja do

početka jula (Pimpicka, 1989; Neophitou, 1993 citirano iz Pompei et al. 2012). Međutim, pojedina istraživanja ukazuju na duži period mresta (produženi mrest) koji može trajati do kraja avgusta (Yilmaz, 2002; Benzer and Yilmaz, 2007; Erdugen and Goku, 2011).



Slika. 1. Histološki prikaz gonada ženki linjaka iz A) aprila i B) jula.
 Picture. 1. Histology of female tench gonads from A) April and B) July

Verovatno da je do kraja sezone mresta na ispitivanom ribnjaku došlo do još jednog ciklusa oslobađanja jaja s obzirom da temperature u avgustu nisu prelazile 25.3 °C i da nije bilo velikog porasta temperature vode koji bi prekinuo mrest (Pompei et al., 2012).

Zaključak

Iako se poslednjih godina razvijaju modernije metode određivanja statusa i zrelosti, kao što je laparoscopska, histološki pregled tkiva predstavlja standardni metod kojim se dobijaju najprecizniji podaci neophodni za upoznavanje sa reproduktivnim ciklusom riba. Ovi podaci su značajni radi boljeg upravljanja procesom veštačke oplodnje u ribnjacima. Histološkom metodom se pruža direktan uvid u folikularnu strukturu gonada i omogućava detaljnije proučavanje razvoja pojedinačnih folikula.

Podaci dobijeni u ovom radu značajni su kako za akvakulturu i utvrđivanje trenutnog reproduktivnog stanja, tako i za dalja eksperimentalna istraživanja i praćenje uticaja različitih faktora na sazrevanje gonada, osobine folikula i sam tok reproduktivnog ciklusa linjaka.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta "Uticaj kvaliteta komponenata u ishrani ciprinida na kvalitet mesa, gubitke i ekonomičnost proizvodnje" (projekat TR 31011) koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije i projekta "Veštački mrest i ambijentalni uslovi kao najbitniji faktor za uspešnu proizvodnju linjaka" (broj 114-451-2104/2011-01) koji finansira AP Vojvodina, Pokrajinski sekretarijat za zaštitu životne sredine i održivi razvoj.

Literatura

Breton B., Horoszewicz L., Bieniarz K., Epler P. (1980). Temperature and reproduction in tench: effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis and spawning. II. The female. *Reproduction Nutrition Development*, 20(4A), 1011-1024.

- Erguden S.A., Goksu M.Z.L. (2011). The Reproductive Biology of the Tench *Tinca tinca* (L., 1758) in Seyhan Reservoir (Adana, Turkey). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(8), 1041-1044.
- Horoszewicz L. (1983). Reproductive rhythm in tench, *Tinca tinca* (L.), in fluctuating temperatures. *Aquaculture*, 1(32), 79-92.
- Macri F., Rapisarda G., Marino G., De Majo M., Aiudi G. (2011). Use of laparoscopy for the evaluation of the reproductive status of tench (*Tinca tinca*). *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 130-3.
- Mahmoud H. H. (2009). Gonadal Maturation and Histological Observations of *Epinephelus areolatus* and *Lethrinus nebulosus* in Halaieb/Shalatién Area "Red Sea", Egypt. *Global Veterinaria*, 3(5), 414-423.
- Pimpicka E. (1989). Histological analysis of the ovaries in tench (*Tinca tinca* L.) from Lake Drwęckie. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 19, 75-95.
- Pompei L., Franchi E., Giannetto D., Lorenzoni M. (2012). Growth and reproductive properties of Tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758 in Trasimeno Lake (Umbria, Italy). *Knowledge Management of Aquatic Ecosystems*, 406, 07.
- Yilmaz F. (2002). Reproductive biology of the tench *Tinca tinca* (L., 1758) inhabiting Porsuk Dam Lake (Kutahya, Turkey). *Fisheries Research*, 55(1), 313-317.

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF GONAD MATURITY OF FEMALE TENCH (*TINCA TINCA* L.) FROM THE ŽABENI FISH PONDS (MACEDONIA)

Jelena Lujic¹, Zoran Marinović¹, Stojmir Stojanovski², Lidija Velkova-Jordanoska², Goran Marković³, Desanka Kostić¹

Abstract

The aim of this study was to assess the status of the female tench gonads and presence and morphological characteristics of oocytes during the spawning period. Sampling was conducted on the Žabeni fish ponds during April and July 2013. Different types of follicles with varying dimensions were observed. During April, all types of follicles except the E type were observed. This meant that the individuals were ready for the spawning period. During July, the individuals have already released one batch of eggs, and were ready for the release of another. Results of this research implicate the significance of histological analysis of gonads considering it enables a detailed observation of the gonadal structure and characteristics of oocytes.

Key words: tench, reproduction, reproduction cycle, vitellogenesis

¹ University of Novi Sad, Faculty of Science, Department for biology and Ecology, Novi Sad, Serbia (jelena.lujic@dbe.uns.ac.rs)

² Hydrobiological Institute, Ohrid, Republic of Macedonia

³ University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Čačak, Serbia