

ΤΕΙ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΩΝΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΛΙΞΙΑΣ –ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ

**«Κατανόηση της σημαντικότητας και
χρησιμότητας της παραγωγής όλο-θηλυκών
ατόμων στην ιχθυοκαλλιέργεια»**

Παναγιώτης Λυμπερόπουλος

**ΕΠΟΠΤΕΥΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΒΙΔΑΛΗΣ ΚΟΣΜΑΣ**

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 2014

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Μέσα από την παρούσα εργασία θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους κάτωθι:

- Δρ Κοσμά Βιδάλη, για τις χρήσιμες πληροφορίες και παρατηρήσεις του, κατά τη συγγραφή της εργασίας.
- Δρ Νικόλαο Βλάχο, MSc, Ε.ΤΕ.Π, συνεπιβλέπων της εργασίας, για την αμέριστη και διαρκεί συμπαράστασή του, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.
- Στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Δρ Μαρία Μακρή Αναπληρώτρια καθηγήτρια και Δρ Κων/νο Πούλο Καθηγητή εφαρμογών, για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους.
- Τέλος, εκφράζω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, για την υλική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η τεχνική αντιστροφής φύλου στα ψάρια είναι μια τεχνική διαδεδομένη σε πολλές χώρες και είναι επιθυμητή διαδικασία αφού παράγονται κυρίως θηλυκά άτομα εξαιτίας της γρηγορότερης ανάπτυξης και ωρίμανσης των γονάδων που παρουσιάζουν σε σχέση με τα αρσενικά άτομα.

Στόχος της παραγωγής ατόμων ενός φύλου είναι η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας και η ενίσχυση της παραγωγής σε πληθυσμούς που αποτελούνται από ένα φύλο. Σε μερικές περιπτώσεις οι πληθυσμοί που αποτελούνται από ένα φύλο ενδέχεται να παρέχουν περισσότερα περιβαλλοντικά οφέλη. Για παράδειγμα, σε περιοχές όπου δεν υπάρχουν ενδημικά είδη ψαριών συνίσταται η εκτροφή ψαριών ενός φύλου, η οποία μπορεί να αποτελέσει μια εξαιρετική και αποτελεσματική μέθοδο για την αναπαραγωγική συνοχή των ψαριών.

Η παραγωγή ενός φύλου σ' ένα πληθυσμό μπορεί να εφαρμοστεί σε είδη ψαριών που παρουσιάζουν σεξουαλικό διμορφισμό, όπου το άτομο φθάνει σε εμπορικό μέγεθος πριν ωριμάσει γενετικά. Οι τεχνικές που εφαρμόζεται για την παραγωγή ενός μόνο φύλου είναι η ορμονική θεραπεία, η γυνογένεση, ο χρωμοσωμικός διαχωρισμός σπέρματος, η στειρότητα των εκτρεφόμενων οργανισμών, η τριπλοειδία και ο γενετικός έλεγχος με την ανάπτυξη του γενετικού χρωμοσωμικού δείκτη.

Η παραγωγή όλο θηλυκών ατόμων γίνεται με προσθήκη στα σιτηρέσια των ψαριών ορμονών όπως: 17α-μεθυλοτεστοστερόνη, 11β-υδροξυανδροστενοδιόνη, 17α-αιθινυλοτεστοστερόνη για χρονικό διάστημα πέντε έως έξι εβδομάδες.

Λέξεις κλειδιά: όλο θηλυκά άτομα, σεξουαλικός διμορφισμός, μέθοδοι παραγωγής όλο θηλυκών, γυνογένεση, αντιστροφή φύλου.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Περιεχόμενα.....	5
1. Εισαγωγή	6
2. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	8
3. Γενετική βελτίωση	15
3.1. Εννοιολογικό περιεχόμενο γενετικής βελτίωσης.....	15
3.2. Σχεδιασμός και στρατηγική ανάπτυξης	16
3.2.1.Μακροπρόθεσμη στρατηγική	16
3.2.2.Βραχυπρόθεσμη στρατηγική	17
4. Στρατηγικές διαχείρισης των αποθεμάτων για την καταστολή της πρώιμης ωρίμανσης.....	22
4.1. Παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων	22
4.2.Ορμονική θεραπεία.....	23
4.3. Γυνογένεση	24
4.4.Χρωμοσωμικός διαχωρισμός σπέρματος.....	24
4.5. Στείρωση εκτρεφόμενων οργανισμών.....	25
4.6. Τεχνικές τριπλοϊδίας	25
4.7. Άτομα με αρσενικά χαρακτηριστικά «αρρενοποίηση»	28
4.8. Γενετικός έλεγχος	28
4.9. Ανάπτυξη γενετικού δείκτη	28
5. Αντιστροφή φύλου και είδη ψαριών.....	30
6. Συμπεράσματα	36
7. Abstract.....	38
8. Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	39

1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες ο κύκλος στον οποίο κυριαρχεί η φύση η οποία μέσα από τη διαδικασία της φυσικής επιλογής και των ποικιλιών των ειδών καθορίζει τις ισορροπίες και καθοδηγεί τη ζωή στον πλανήτη. Οι δραματικές εξελίξεις των επιστημών και της τεχνολογίας βρίσκουν τον άνθρωπο πανίσχυρο και δυναμικό να παραβιάζει επισφράγιστα μυστικά, να είναι εξερευνητής των μυστηρίων της ζωής αλλά και καθοδηγητή της. Οι γραμμές της φυσικής επιλογής τείνουν να ατονήσουν μέσα από τις ανθρώπινες παρεμβάσεις.

Εξαιτίας της μοριακής επανάστασης θα λέγαμε, ότι άνθρωπος απέκτησε για πρώτη φορά στην ιστορία την δυνατότητα, όχι απλώς να κατανοεί την δομή και την λειτουργία των γονιδίων, αλλά και να τροποποιεί κατά βούληση τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά της ζωής. Συνεπώς, με την τεχνολογία συνεχώς να αναπτύσσεται δεν θα μπορούσε κι ο χώρος της γεωργίας και φυσικά οι ιχθυοκαλλιέργειες να μην επηρεαστούν από τις εξελίξεις. Αναπτύχθηκαν νέες εφαρμογές γενετικών τεχνικών, ονομάστηκαν με τον όρο βιοτεχνολογία και είχαν ως στόχο τη γενετική βελτίωση των ειδών, και την δημιουργία νέων ποικιλιών ψαριών με νέα χαρακτηριστικά και νέο φαινότυπο κυρίως για τα διακοσμητικά ψάρια, όπου το χρώμα και το σχήμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο.

Η μηχανική χρωμοσωμάτων, οι τριπλοειδή οργανισμοί, ο έλεγχος της αναλογίας των φύλων, και κυρίως η τεχνική της διαγονιδίωσης είναι κάποιες από αυτές τις τεχνικές που εκπληρώνουν τους στόχους αυτούς. Όταν αναφερόμαστε στην βελτίωση των ειδών η βελτίωση αυτή έχει να κάνει με κυρίως με την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των ψαριών, την ισχυρότερη αντίσταση στις ασθένειες, και τη μεγαλύτερη περιβαλλοντική ανεκτικότητα. Η πιο πετυχημένη και πιο διαδεδομένη τεχνική της βιοτεχνολογίας είναι αυτή της διαγονιδίωσης, με την εισαγωγή ενός ξένου γονιδίου σε έναν οργανισμό δίνοντας του τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Με τις ελεγχόμενες διασταυρώσεις δίνεται η δυνατότητα επιλογής των χαρακτηριστικών των γονέων διαφορετικών ειδών η υποειδών που θα διασταυρωθούν μεταφέροντας τα χαρακτηριστικά αυτά στους απογόνους. Στον τομέα των διακοσμητικών ψαριών πολλά είδη και ποικιλίες δημιουργήθηκαν μετά από συνεχείς διασταυρώσεις κατά την διάρκεια των ετών, με αποτέλεσμα δύσκολα να συναντήσεις τ' αρχικά είδη από όπου δημιουργήθηκαν.

Η προώθηση της βιομηχανίας της υδατοκαλλιέργειας και η ανάπτυξη του εμπορίου των εδώδιμων ψαριών πραγματοποιείται μέσω της τεχνικής της διακοπής ή καθυστέρησης της γενετικής ωρίμανσης των ψαριών που εκτρέφονται. Η επίλυση του προβλήματος προϋποθέτει την εφαρμογή τριών βασικών στρατηγικών που πρέπει να εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιέργειες (Cowan et al., 2010). Οι τεχνικές που εφαρμόζονται με επιτυχία σήμερα, είναι η παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων, η τριπλοϊδία και η διαχείριση της φωτοπερίοδου η οποία δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα.

Η παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων αφορά στην παραγωγή ενός φύλου με άμεση ή με έμμεση αντιστροφή του φύλου ή μέσω της γυνογένεσης. Η τεχνική διαφοροποίησης των χρωμοσωμάτων στο σπέρμα είναι μια νέα διαδικασία η οποία έχει πλεονεκτήματα σε ότι αφορά στην τεχνική και πρακτική διαχείριση της μεθόδου και στο οικονομικό αποτέλεσμα (Cowan et al., 2010).

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι να μελετηθούν οι παράμετροι και η μεθοδολογία που εφαρμόζεται σχετικά με την παραγωγή όλο θηλυκών ατόμων. Ουσιαστικά επιχειρείται η ανάλυση των σημαντικότερων παραγόντων που σχετίζονται με τις γενετικές τεχνικές καθώς και τις πιθανές συνέπειες για τα είδη και την οικολογία των ειδών.

2. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

Στις Ιχθυοκαλλιέργειες, πολλών εκτρεφόμενων ειδών ψαριών, τα θηλυκά εκδηλώνουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση με τα αρσενικά, προκειμένου να αποκτήσουν μεγαλύτερα μεγέθη, ενώ τα αρσενικά ωριμάζουν επιβραδύνοντας την ανάπτυξή τους πριν φθάσουν σε εμπορεύσιμο μέγεθος.

Σε πολλά είδη εκτρεφόμενων ψαριών, τα θηλυκά παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από τα αρσενικά επιτυγχάνοντας μεγαλύτερο μέγεθος. Επιπροσθέτως, σε πολλά είδη τα αρσενικά ωριμάζουν πριν φθάσουν το εμπορεύσιμο μέγεθος. Τα παραπάνω αποτελέσματα και λαμβάνοντας υπόψη όλα τα μεγέθη και το συνολικό βαθμό μείωσης της παραγωγής. Συνεπώς, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον του ιδιωτικού τομέα για την παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων (Piferrer, 2001).

Η ανασκόπηση, επικεντρώνεται στη χρήση οιστρογόνων για τον έλεγχο του φύλου, ενώ η ερμηνεία των πλεονεκτημάτων από την παραγωγή όλο-θηλυκών αποθεμάτων από υδατοκαλλιέργεια, επισημαίνοντας τις περιπτώσεις όπου η τεχνολογία για την ορμονική αντιστροφή του φύλου αξίζει να εφαρμόζεται.

Η βιολογική βάση της ορμονικής επίδρασης του φύλου, η διαδικασία της φυλετικής διαφοροποίησης που σε σχέση με άλλα σπονδυλωτά είναι αρκετά ασταθή στους τελεόστεους οργανισμούς, ενώ περιγράφεται με σκοπό να κατανοηθεί η επίδραση της επιρροής αυτής. Ο έλεγχος του φύλου είναι χαρακτηριστικό επίτευγμα, ανακαλύπτοντας σεξουαλικά αδιαφοροποίητα ψάρια σε εξαγενή στεροειδή με σκοπό να κατευθύνουν τη διαδικασία της φυλετικής διαφοροποίησης προς το επιθυμητό φύλο (Miles-Richardson et al., 1999).

Αυτές οι επεξεργασίες ολοκληρώνονται μήνες ή χρόνια πριν την εμπορευματοποίηση και τα υπολείμματα στεροειδών έχουν εξαφανιστεί σε λιγότερο από ένα μήνα από το τέλος της διαδικασίας. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την παραγωγή αποθεμάτων όλο-θηλυκών ψαριών είναι οι άμεσες και έμμεσες διαδικασίες που εξηγούνται συγκρίνοντας τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Οι διαδικασίες παραγωγής όλο-θηλυκών χρησιμοποιούνται σε κοινά είδη επίσης για την παραγωγή μόνο αρσενικών αποθεμάτων. Ο απολογισμός επικεντρώνεται στη χρήση οιστρογόνων για τον έλεγχο του φύλου με άμεσες ή έμμεσες μεθόδους παραγωγής ατόμων με αρσενικά χαρακτηριστικά «αρρενοποίηση» (Piferrer, 2001).

Τα οιστρογόνα έχουν εφαρμοστεί σε τουλάχιστον 56 διαφορετικά είδη και χρησιμοποιήθηκαν 12 διαφορετικές οιστρογονικές ουσίες (3 φυσικά και 9 συνθετικά). Μεγάλη προσοχή δόθηκε στη μέθοδο χορήγησης συμπεριλαμβανομένου της εμφάνισης και της διατροφής, καθώς και την αστάθεια των ιδίων των ορμονικών διαδικασιών. Μεγάλη προσοχή δόθηκε στη σωστή διάρκεια των διαδικασιών σε σχέση με τον βαθμό ανάπτυξης των γονάδων και η αναλογία των φύλων, η επίδοση ανάπτυξης και οι δυσμορφίες (Antilla, 1984 ; Piferrer, 2001).

Ο Piferrer (2001), επικεντρώνεται στη χρησιμοποίηση οιστρογόνων για την παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων. Επίσης, αναφέρονται περιπτώσεις όπου η χρήση οιστρογόνων γίνεται ώστε τα ψάρια να αποκτήσουν αρσενικά χαρακτηριστικά με έμμεσο τρόπο («αρρενοποίηση»). Η χρήση οιστρογόνων για την παραγωγή όλο-θηλυκών αποθεμάτων ψαριών στην υδατοκαλλιέργεια τα τελευταία χρόνια αυξήθηκε. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα είδη των ψαριών που έχουν υποστεί επεξεργασία με φυσικά ή συνθετικά οιστρογόνα με σκοπό την ελεγχόμενη διαφοροποίηση του φύλου.

Επίσης, οι τρέχουσες μέθοδοι για την παραγωγή όλο-θηλυκών για 35 διαφορετικά είδη συμπεριλαμβανομένου των χελιών, των σολομών, τα κυπρινοειδή, οι κηλίδες, τα gourami, τα πλατύψαρα, οι μονομάχοι και τα άτομα της οικογένειας Poeciliidae (George & Pandian, 1995 ; Piferrer & Lim, 1997 ; Κίρουρος et al., 2011). Η ερμηνεία των πλεονεκτημάτων από τη χρήση των έμμεσων διαδικασιών για την παραγωγή όλο-θηλυκών, όταν είναι εφικτό και δίνει σημασία στην άνεση για τη χρήση φυσικών οιστρογόνων estradiol-17β, από τα συνθετικά οιστρογόνα (Dunham, 1990 ; Piferrer, 2001). Υπάρχουν περισσότερα από 25.000 είδη ψαριών στα οποία έχει γίνει ορμονική θεραπεία με οιστρογόνα, εκ των οποίων το 64% είναι ψάρια γλυκού νερού, το 21% είναι ψάρια θαλασσινού νερού. Το 11% των ψαριών είναι ανάδρομα και το 4% αυτών είναι κατάδρομα. Το 91% των ψαριών είναι γονοχωριστικά, ενώ τα υπόλοιπα παρουσιάζουν πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό, προκειμένου να προωθήσουν την αλλαγή του φύλου σε θηλυκά.

Δεν υπάρχουν αναφορές χορήγησης οιστρογόνων σε ερμαφρόδιτα άτομα, για την παραγωγή όλο-θηλυκών ψαριών και για τον έλεγχο του φύλου με χορήγηση ορμονών στα ψάρια (αρρενοποίηση, θηλυκοποίηση στείρα) συμπεριλαμβανομένων των ερευνών των: Schreck (1974), Hunter & Donaldson (1983), Yamazaki (1983), Billard (1989), Dunham (1990), Pandian & Sheela (1995) και Patin (1997).

Πίνακας 1: Είδη ψαριών που χορηγήθηκαν συνθετικά και φυσικά οιστρογόνα με σκοπό τον έλεγχο του φύλου

Οικογένεια	Είδη	Κοινό όνομα	Οιστρογόνα	Διαχείριση	Αναφορές
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i> <i>Anguilla japonica</i>	European eel Japanese eel	EE2 E2	Τροφή Τροφή	Colombo and Grandi (1990, 1995) Degani and Kushnirov 1992 , Andersen et al., 1996
Cyprinidae	<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp	DES E2 E1 E2 DES E1 , E 1	Τροφή Ένεση Τροφή Τροφή Τροφή Τροφή	Satoh et al., 1992 Chiba et al. 1993 Castelnuovo, 1937 Sathyanarayana Rao and Satyanarayana Rao 1983 Komen et al., 1989
Cobitidae	<i>Carassius auratus Pimephales promelas</i> <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> <i>M. mizolepis</i>	Goldfish Fathead minnow Mud loach Mud loach	E 1 E1 DES E2 E1	Τροφή Τροφή Τροφή Εμβάπτιση	Basavaraja et al., 1989, 1997 Sehgal and Saxena 1997a,b Yamamoto and Kajishima 1969 Yamamoto 1975b
Ictaluridae	<i>Ictalurus punctatus</i>	Catfish	E2	E2	Schreck 1974
Clariidae	<i>Clarias lazera</i>	Airbreathing catfish	E2	E2	Miles 1997 , Kramer et al., 1998 Miles-Richardson et al., 1999
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	E2 E1 E2 E1.E1 E2	Τροφή Τροφή Εμβάπτιση Τροφή Τροφή Εμβάπτιση/ τροφή	Kubota and Hatakeyama 1987 ,.Kubota et al. 1988 Kim et al. 1997 Goudie et al. 1983 Gannam and Lovell 1991. Ž .Liu et al. 1996 Padoa 1937, 1939a Okada 1973, 1985 Ž .Jalabert et al., 1975 Simpson 1976 Johnstone et al. 1978 Bye and Lincoln 1986 Goryczko et al., 1991
			DES, E2 E1E2,EE2, Hexestrol	Τροφή Τροφή	Sower et al. 1983 Chevassus et al. 1988

Salmonidae	<i>Salmo trutta</i>	Brown trout	E2 Estrogenic compound	Εμβάπτιση	Ashby, 1957 Poston, 1968
	<i>S. fontinalis</i>	Brook trout	E2	Τροφή και εμβάπτιση	Johnstone et al. 1979b , Parks and Parks, 1991.
	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon	E2	Τροφή και εμβάπτιση	Simpson,1976 , Johnstone et al., 1978 , Herman and Kincaid, 1991
	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Coho salmon	DES, E 2	Τροφή και εμβάπτιση	Sower et al., 1984 Goetz et al., 1979 , Donaldson and Hunter, 1982
			E2	Εμβάπτιση	Hunter et al., 1986 , Piferrer and Donaldson, 1989, 1994
Poeciliidae	<i>Poecilia reticulata</i>	Guppy	E1 E2 DES	Τροφή/Εμβάπτιση	Redding et al.,1987 Kavumpurath & Pandian,1992,1993
			E2, EE2, ME 2	εμβάπτιση	Hunter et al., 1986 Piferrer and Donaldson, 1992 Solar et al., 1994
	<i>O. masou</i>	Masu salmon			
Mugilidae Atherinidae	<i>O. gorbuscha</i> <i>O. keta</i> <i>Mugil cephalus</i> <i>Odontesthes bonariensis</i>	Pink salmon Chum salmon Grey mullet Pejerrey	E2	Εμβάπτιση και τροφή	Donaldson and Hunter, 1982 Nakamura, 1984 Redding et al.,1987 Chang et al., 1995c

Centrarchidae e Percidae	<i>Pomoxis nigromaculatus</i> <i>Lepomis macrochirus</i> <i>Perca flaescens</i>	Black crappie Bluegill Yellow perch	DES, E2 DES, E2 E2	Diet Diet Diet	Al-Ablani 1997 Malison et al. 1986 , Malison and Garcia-Abiado 1996.
Sparidae Cichlidae	<i>Mylio macrocephalus</i> <i>Acanthopagrus schlegeli</i> <i>Sparus auratus</i> <i>Oreochromis aureus</i> <i>Hemihaplochromis multicolor</i>	Black sea bream Black porgy Sea bream Tilapia aurea	? E2 E , EE 2 2 AFemale hormone DES, DES-DP E , E , E 1 2 3 DES, E , EE 2 2 EE2 E , EE 2 2 DES, EE 2 EBA	Diet Diet Immersionq diet Immersion Diet Diet Diet Diet Diet Immersion	Hibiya 1972 Chang and Lin 1998 Chang et al. 1994, 1995a,b Condec and Canario 1999 Jensen 1976 Hopkins 1977, Hopkins et al. 1979 Melard 1995 Mair et al. 1987 Rosenstein and Hulata 1994
	<i>Oreochromis mossambicus</i> <i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia mossambica Tilapia nilotica	EE2 E1 DES DES EE2 DES, EE 2 DES, E2 , EE2 DES	Diet Diet Diet Diet Immersion Diet Diet Diet Diet Diet Immersion Diet	Nakamura and Takahashi 1973 Guerrero and Guerrero 1976 Varadaraj 1989 Basavaraja et al.,1990 Rosenstein and Hulata 1992 Rosenstein and Hulata 1994 Tayamen and Shelton 1978 Chipunga 1987 Potts and Phelps 1995 Gilling et al. 1996 Abucay and Mair 1997 Tuan et al. 1999

Ο οδηγός για την ανάπτυξη μηχανισμών ενός φύλου παρουσιάζεται σε νέα είδη ψαριών, με σκοπό να δοθεί σημασία στη χρήση έμμεσων μεθόδων, που σημαίνει ότι το εμπορεύσιμο ψάρι δεν έχει εκτεθεί ποτέ σε στεροειδή. Σε περίπτωση που η μέθοδος δεν είναι εφικτή τότε εφαρμόζεται η άμεση μέθοδος, η οποία πραγματοποιείται βάση συγκεκριμένου πρωτοκόλλου, ώστε να επιτευχθούν αποδοτικότερες διαδικασίες με λιγότερη έκθεση σε στεροειδή (Piferrer, 2001).

Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στο ρυθμό ανάπτυξης, τη διάρκεια ωρίμανσης ενός πληθυσμού και στην αύξηση του μέγεθους τους, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή. Ως εκ τούτου, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την παραγωγή όλο-θηλυκών ψαριών ώστε να αυξηθεί η απόδοση στην υδατοκαλλιέργεια (Piferrer, 2001).

Η γυνογένεση είναι μια μέθοδος γενετικής βελτίωσης των ψαριών, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη βελτίωση των γενετικών χαρακτηριστικών σε διάφορα είδη ψαριών (Liu,1993 ; Arai,2001). Ως γυνογένεση ορίζεται η παραγωγή και ανάπτυξη όλο-θηλυκών ψαριών χωρίς τη γενετική συνεισφορά του σπέρματος και εμφανίζεται κυρίως σε φυσικούς πληθυσμούς των κατώτερων σπονδυλωτών (Zhang, 1996 ; Luo et al.,2011).

Η εξέλιξη της υδατοκαλλιέργειας στο χρόνο παρουσιάζει ανοδική πορεία, με αποτέλεσμα από το 1984 και μετά όλο και περισσότερα είδη ψαριών εκτρέφονται για οικονομικά και εμπορικά οφέλη (FAO,1997). Ο Bartley (1999), αναφέρει ότι η παραγωγή στην υδατοκαλλιέργεια στηρίζεται σε νέες τεχνικές, όπως για παράδειγμα η παραγωγή σολομού στην Νορβηγία. Οι αρχές της γενετικής εφαρμόζονται για την παραγωγή θαλασσινών ειδών ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του κόστους διαμέσου της γενετικής βελτίωσης. Η εφαρμογή των τεχνικών που χρησιμοποιούνται διαχωρίζονται σε δυο ομάδες ανάλογα με τη χρονική διάρκεια και την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Ο υβριδισμός, ο επιδέξις χειρισμός των χρωμοσωμάτων και η αντιστροφή του φύλου θεωρούνται μέθοδοι άμεσων αποτελεσμάτων και πραγματοποιούνται για 1 με 2 γενιές, δεν είναι αθροιστικά γεγονότα και πραγματοποιούνται χωρίς επαναληψιμότητα (Bartley, 1999).

Η επιλεκτική γενετική αποτελεί ένα μακροπρόθεσμο πρόγραμμα βελτίωσης με μικρά οφέλη τα οποία συσσωρεύονται από γενιά σε γενιά. Η μεταφορά γονιδίων χαρακτηρίζεται μακροπρόθεσμη γενετική παρέμβαση με ουσιαστικά οφέλη, χωρίς να συσσωρεύεται στις γενεές. Πολλές από τις μεθόδους αυτές αποτελούν μια σύνθετη

διαδικασία ενώ μπορούν να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα. Η εφαρμογή των γενετικών τεχνολογιών, στοχεύει στην ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών κινδύνων που δημιουργούνται από τους εκτρεφόμενους οργανισμούς.

Η γενετική βελτίωση στον κοινό κυπρίνο, ξεκίνησε αρκετές δεκαετίες πριν (Balon, 1995), η εφαρμογή των αρχών της Γενετικής στα περισσότερα είδη ψαριών είναι μια σχετικά πρόσφατη διαδικασία. Συνεπώς, η γενετική βελτίωση που εφαρμόζεται στην Ιχθυοκαλλιέργεια βρίσκεται σε πρωταρχικό στάδιο σε αντίθεση με την γεωργία και την κτηνοτροφία που είναι ευρύτατα διαδεδομένη και αναπτυγμένη (Eknath et al., 1991). Παρ' όλο που οι συνθήκες εκτροφής των υδρόβιων ζώων και φυτών είναι παρόμοιες με αυτές του φυσικού περιβάλλοντος, η συνήθης πρακτική που εφαρμόζεται στα διάφορα προγράμματα γενετικής βελτίωσης απαιτεί την άμεση εφαρμογή της τεχνολογίας προκειμένου να παρατηρούνται αξιόπιστα αποτελέσματα (Bartley & Hallerman, 1998).

Τα αποτελέσματα της αύξησης της παραγωγής στην υδατοκαλλιέργεια είναι η μείωση των τιμών σε πολλά προϊόντα με επακόλουθο να αυξάνεται η διαφοροποίηση των προϊόντων τα οποία στοχεύουν στη διατήρηση μιας οικονομικά βιώσιμης βιομηχανίας. Οι τεχνολογίες που εφαρμόζονται καθορίζουν τις στρατηγικές ώστε να αυξηθεί και να προωθηθεί η αποτελεσματικότητα (Bartley & Hallerman, 1995).

Η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας συνεχίζει να προκαλεί ανησυχίες σχετικά με τον κίνδυνο διαφυγής στο περιβάλλον ενδημικών ειδών που εκτρέφονται σε μεγάλη κλίμακα με αποτέλεσμα να ανταγωνίζονται τα τοπικά είδη. Επίσης, η εμπειρία δείχνει ότι, τα εκτρεφόμενα είδη ψαριών συνήθως διαφεύγουν στο φυσικό περιβάλλον, ενώ εγκυμονούν κίνδυνοι μετάδοσης ασθενειών σε περίπτωση που είναι φορείς κάποιας ασθένειας (Welcomme, 1988).

Οι Hindar et al., (1991) στην έρευνά τους αναφέρουν ότι, τα εκκολαπτήρια των εκτρεφόμενων ψαριών αποτελούν τον κίνδυνο για τα μητρικά γονίδια τα οποία έχουν εισαχθεί στην ιχθυοκαλλιέργεια, όπως για παράδειγμα τα γονίδια που έχουν προσαρμοστεί στην εκτροφή και όχι στη φύση. Ο Crampton (1995), αναφέρει τις πιθανές επιπτώσεις που δημιουργούνται από την ανάμειξη των πληθυσμών που εκτρέφονται, με τους φυσικούς πληθυσμούς των ψαριών. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται στη γενετική έχουν αυξηθεί τόσο σε συχνότητα εφαρμογής όσο και σε θέματα αλλοίωσης των φαινοτύπων, τα οποία ερμηνεύονται ως ασφάλεια του περιβάλλοντος.

3. Γενετική βελτίωση

3.1. Εννοιολογικό περιεχόμενο γενετικής βελτίωσης

Η γενετική βελτίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και εφαρμόζεται στην υδατοκαλλιέργεια όχι μόνο για τη βελτίωση της παραγωγής, αλλά με την κατάλληλη τεχνολογία οδηγεί στην αύξηση της εμπορευσιμότητας των ειδών, στην ικανότητα που έχει το είδος να εκτρέφεται, στη διατήρηση των φυσικών πόρων και έχει βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα οφέλη (Πιν. 2).

Πίνακας 2:Στρατηγικές Γενετικής Βελτίωσης

Διαχείριση	Βελτίωση
Μακροπρόθεσμες στρατηγικές	
Ρυθμός ανάπτυξης	Αύξηση 50% μετά από 10 γενιές στο σολομό coho (Hershberger et al., 1990), Τσιπούρες μαζικής επιλογής έδωσε αύξηση 20% ανά γενιά (Hulata,1995). Στρείδια Χιλής 10-13% αύξηση σε μια γενιά (Toro et al.,1996).
Σώμα	Υψηλή κληρονομικότητα σε κυπρίνο, γατόψαρο και πέστροφα (Dunham, 1995, Tave,1986).
Ανθεκτικότητα	Η πέστροφα έδειξε μεγάλη αντίδραση στα αυξημένα επίπεδα στην κορτιζόλη του πλάσματος (Pottinger et al., 1995).
Ανθεκτικότητα σε ασθένειες	Αύξηση ανθεκτικότητας στην ασθένεια υδροπικίαση στον κοινό κυπρίνο (Kyprichicon,1981).
Ανθεκτικότητα σε ρύπανση	Η τιλάπια επιλέχθηκε να είναι ανθεκτική σε βαρέα μέταλλα Hg,Cd & Zn, επιβίωσαν 3-5 φορές καλύτερη απ' ότι αυτά που δεν εκτίθενται (Lourdes et al., 1995).
Ωριμότητα και χρόνος ωοτοκίας	Πρώιμος χρόνος ωοτοκίας για την πέστροφα 60 ημέρες (Dunham,1995).
Διαγωνιδίωση	Μεταφορά γονιδίων από τον σολομό coho και υποδοχέα από τον σολομό sockeye ο οποίος μεγαλώνει 11 φορές περισσότερο πιο γρήγορα σε σχέση με τα υπόλοιπα (Devlin et al., 1994). Ο σολομός του Ατλαντικού μεγαλώνει 400% πιο γρήγορα σε σχέση με τους κανονικούς κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους.
Βραχυπρόθεσμες στρατηγικές	
Διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών	Το γατόψαρο παρουσιάζει ετερότητα στην αύξηση περίπου 55 και 22% των διασταυρώσεων γατόψαρων και της πέστροφας (Dunham,1995).Ο σολομός Chum και το λαβράκι δεν έδειξαν ετερότητα. Ετερότητα παρουσίασαν τα διασταυρωμένα άγρια άτομα τσιπούρας με άτομα που προέρχονται από εκκολαπτήρια (Haluta,1995). Διασταυρώσεις μεταξύ ειδών γατόψαρου παρουσίασαν ετερότητα της τάξης 30-60%.
Αντιστροφή φύλου	Αρσενικά άτομα τιλάπιας έδειξαν βελτίωση στην εκτροφή κατά 60% (Mair et al.,1995), μη θελημένη αναπαραγωγή και νανισμό. Τα θηλυκά άτομα πέστροφας έδειξαν καλύτερη ανάπτυξη και καλύτερη ποιότητα.
Χρωμοσωμικός χειρισμός	Το φαγκρί ηλικίας 10 μηνών έδειξε παρόμοια ανάπτυξη μεταξύ των ατόμων που προέχονταν από τριπλοειδία και διπλοειδία (Sugama et al., 1992).Το λαβράκι που προέχονταν από τριπλοειδία έδειξε την ασυνεπής ανάπτυξη και χαμηλότερο GSI, σε σχέση με τα άτομα λαβρακιού που

	προέρχονται από διπλοειδία (Knibb,1997)
	Οι ενδο-διασταυρώσεις που προέρχονται από πολυπλοειδία είναι βιώσιμες (Wikins et al.,1995).
	Η πέστροφα που προέρχεται από τριπλοειδία παρουσιάζει καλύτερη αύξηση και συντελεστή μετατροπής της τροφής. Η τιλάπια του Νείλου που προέρχεται από τριπλοειδία εμφανίζει καλύτερη ανάπτυξη (66-90%) σε σχέση με τα άτομα που προέρχονται από διπλοειδία. Επίσης έδειξε μειωμένο σεξουαλικό διμορφισμό (Dunham,1995).
	Τα στρείδια που προέρχονται από τριπλοειδία έδειξαν αύξηση 13-51% σε σχέση με τα άτομα που προέρχονται από διπλοειδία σς ηλικία 8-10 μηνών και καλύτερη εμπορευσιμότητα εξαιτίας των μειωμένων γονάδων (Guo et al., 1996). Τα τριπλοειδή άτομα του στρειδιού (Sydney rock) έδειξαν 41% αύξηση στο βάρος σώματος στα 2,5 χρόνια (Nell et al.,1994).

Τα βραχυπρόθεσμα οφέλη είναι άμεσα και μέσα σε δυο γενεές, σε σχέση με τα μακροπρόθεσμα τα οποία εμφανίζονται σε κάθε γενιά, όπως για παράδειγμα η επιλεκτική αναπαραγωγή και εκτροφή ειδών (Falconer, 1981).

3.2. Σχεδιασμός και στρατηγική ανάπτυξης

3.2.1.Μακροπρόθεσμη στρατηγική

Τα ελάχιστα προγράμματα αναπαραγωγής που εφαρμόστηκαν και συνεχίζουν να εφαρμόζονται στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας αφορούν τον σολομού του Ατλαντικού, την τιλάπια (Eknath et al.,1993). Σε ότι αφορά τα θαλάσσια είδη η γενετική βελτίωση άρχισε να εφαρμόζεται στην τσιπούρα Ιαπωνίας με σκοπό την παραγωγή εμπορικών μεγεθών (Murata et al., 1996).

Απώτερος στόχος της γενετικής βελτίωσης αφενός είναι η βελτιστοποίηση των δεικτών ανάπτυξης των ψαριών (ρυθμός ανάπτυξης, αύξηση βάρους), εξαιτίας της διαφοροποίησης που παρουσιάζουν ανά είδος ψαριού και επιδέχονται βελτίωση (Tave, 1995) και αφετέρου η παραγωγή στελεχών τα οποία θα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις ασθένειες. Η ανθεκτικότητα των ψαριών σε ρυπασμένα νερά είναι επίσης επιθυμητή, ιδίως σε περιοχές όπου για παράδειγμα υπάρχουν βαρέα μέταλλα (Lourdes et al.,1995).

Το ποσοστό των πρόσθετων γενετικών διακυμάνσεων που σχετίζονται με ένα γενετικό τύπο υπερβαίνει την κληρονομικότητα ενός χαρακτηριστικού έχει ως αποτέλεσμα να ενισχύεται η επιλογή ενός συγκεκριμένου γονιδίου που καλείται «δείκτης υποβοηθούμενης επιλογής» (Danzmann & Ferguson, 1995).

Η παραγωγή διαγονιδιακών ψαριών είναι ένας τρόπος μια μακροπρόθεσμη στρατηγική που αποσκοπεί στην παραγωγή νέων γονιδίων και του υποδοχέα που θα εισαχθεί στο ζώο και στη συνέχεια να διεξάγει τον έλεγχο που απαιτείται για την επιβεβαίωση της κληρονομικότητας στη διαγονιδίωση. Πολλά εμπορικά είδη ψαριών έχουν δεχθεί διάφορα γονίδια από άλλα ψάρια.

Για παράδειγμα στο σολομό cocho, προστέθηκε το αυξητικό γονίδιο και ο υποδοχέας από τον σολομό sockeye μεγάλωσε 11 φορές πιο γρήγορα από τη φυσιολογική ανάπτυξη (Devlin et al., 1994). Ο μακροπρόθεσμος σχεδιασμός της γενετικής βελτίωσης απαιτεί συλλογή όγκου δεδομένων μεγάλης περιόδου, έλεγχος και διαχείριση των γεννητόρων (Tave, 1995).

3.2.2. Βραχυπρόθεσμη στρατηγική

Ο βραχυπρόθεσμος προγραμματισμός για τη γενετική βελτίωση απαιτεί, την τήρηση αρχείων καθώς και τη διαχείριση βραχυπρόθεσμων σχεδίων με στόχο να μεταδώσει τα οφέλη σε σύντομο χρονικό διάστημα υπό την προϋπόθεση να διατηρούν υγιή και κατάλληλα γενετικά αποθέματα (Bartley, 1998).

Ο υβριδισμός συνδυάζει δυο διαφορετικές γενετικά ομάδες με σκοπό την παραγωγή ατόμων τα οποία επωφελούνται από τα πλεονεκτήματα των υβριδίων. Στείρα ή μη αναπαραγωγικά άτομα μπορούν να παραχθούν από διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών. Η F1 γενιά παρουσιάζει ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες ως εκ τούτου η καθαρή μητρική γενιά διατηρείται και θα πρέπει να διαχειρίζεται κατά την αναπαραγωγική διαδικασία. Ομάδες ψαριών όπως κάποια είδη της οικογένειας Salmonidae και οι γαρίδες του γένους *Penaeus*, δεν παράγουν χρήσιμα υβρίδια για την υδατοκαλλιέργεια (Benzie et al., 1995).

Όλο και περισσότερα υβρίδια στα θαλασσινά είδη παράγονται, ενώ οι δυνατότητες εκτροφής τους θα πρέπει να αξιολογούνται. Για παράδειγμα, υβρίδιο τσιπούρας προήλθε από διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών *Acanthopagus latus* X *Sparidentex hasta*, φαίνεται να είναι γόνιμο, ενώ διεξάγονται έρευνες σχετικά με την ανάπτυξή του και την ποιότητα της σάρκας (Bartley, 1998). Η αξιολόγηση του υβριδίου προϋποθέτει σε πρώτη φάση την αξιολόγηση των διασταυρώσεων μεταξύ των ειδών.

Το υβρίδιο striped bass (λαβράκι), το sunshine bass (λαβράκι), προέρχεται από διασταύρωση μεταξύ αρσενικού *Marone saxatilis* X θηλυκού *M.chrysops*, παρουσιάζει καλύτερη ανάπτυξη όταν εκτρέφεται σε σχέση με το υβρίδιο palmetto bass γνωστό ως «υβρίδιο reprocal». Περίπου το 70% της εκτροφής των γατόψαρων στην Ταϊλάνδη προέρχονται από διασταυρώσεις των *Clarias macrocephalus* και του *Clarias batrachus* με θηλυκά *Clarias macrocephalus*.

Πολλά υβρίδια είναι γόνιμα και μπορούν να δώσουν απογόνους μεταξύ τους ή με την πατρική γενιά. Το υβρίδιο της κόκκινης τιλάπια (Red Florida tilapia X *Oreochromis uloropsis honorum*) διασταυρώνεται με άτομα της μητρικής γενιάς στα πλαίσια των προσπαθειών που γίνονται για τη βελτίωση της ανάπτυξης και του σχήματος του σώματος. Η πολυπλοειδία, πραγματοποιείται σε πολλά είδη ψαριών και περιλαμβάνει το σύνολο της χρωμοσωμικής διαχείρισης προκαλώντας θερμική και χημική διαταραχή (σοκ) με αποτέλεσμα να παρεμβαίνει στην ανάπτυξη του εμβρύου. Τα τριπλοειδή άτομα, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της στειρότητας που παρουσιάζουν και ως εκ τούτου χρησιμοποιούν τα ενεργειακά τους αποθέματα για αύξηση σώματος και όχι για να ωριμάσουν γεννητικά και να αναπαραχθούν.

Ωστόσο, η υπόθεση αυτή δεν ισχύει για όλα τα άτομα που παρουσιάζουν τριπλοειδία, τεκμηριώνοντας τη διαφορά μεταξύ των επιπέδων κατά την αναπαραγωγική δραστηριότητα και ανάπτυξη που παρατηρείται στα διπλοειδή άτομα (Mair, 1993 ; Hussain et al., 1995).

Η αποτελεσματικότητα στην εκτροφή των τριπλοειδών ατόμων σε σχέση με τα διπλοειδή άτομα φαίνεται να υπάρχει μεταξύ συγκεκριμένων ειδών (Sugama et al., 1992). Μεταξύ των τριπλοειδών ατόμων της ιριδίζουσας πέστροφας και του σολομού του Ατλαντικού παρατηρείται ανομοιογενής απόδοση. Επίσης, στα τριπλοειδή άτομα του σολομού coho σύμφωνα με την έρευνα του Withler et al (1995), παρατηρήθηκε φτωχή ανάπτυξη και μικρή επιβίωση. Στο στρείδι, η τριπλοειδία επέδρασε στην αύξηση της παραγωγικότητας και της εμπορευσιμότητας του είδους. Οι Guo et al (1996), στην ερευνά τους, έδειξαν ότι τα τριπλοειδή στρείδια που παράγονται από σύζευξη τετραπλοειδών με διπλοειδή άτομα, παρουσίασαν μεγαλύτερη επιβίωση και μεγαλύτερο μέγεθος και μεγαλύτερες από τα διπλοειδή στείδια, σε σχέση με τα τριπλοειδή στρείδια που παράγονται με χημικό σοκ.

Η παραγωγή ατόμων του ίδιου φύλου, αποτελεί αλλά μια βραχυπρόθεσμη στρατηγική της γενετικής βελτίωσης, ενώ λαμβάνει χώρα όταν υπάρχει μειωμένη

πιθανότητα αναπαραγωγής και παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα του φυλετικού διμορφισμού. Για παράδειγμα αρσενικά άτομα τιλάπια αναπτύσσονται καλύτερα σε σχέση με τα θηλυκά, ενώ ο πληθυσμός τιλάπια με ένα φύλο θα ήταν επιρρεπής στην αναπαραγωγή νανισμού (Mair et al., 1995). Τα θηλυκά άτομα πέστροφας είναι κατάλληλα εξαιτίας του καλύτερου ρυθμού ανάπτυξης και της μειωμένης γενετικής ωρίμανσης που παρουσιάζουν (Bye & Lincoln, 1986). Τα είδη ψαριών που παράγουν αυγοτάραχο, όπως για παράδειγμα το χαβιάρι από οξύρυγχους, η παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων είναι απαραίτητη.

Η αντιστροφή φύλου στα ψάρια, επιτυγχάνεται με χορήγηση ανδρογόνων και οιστρογόνων στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης, με αποτέλεσμα παράγονται άτομα ενός φύλου (Dunham, 1995). Η χρήση ορμονών στα αρχικά στάδια της εκτροφής των ζώων είναι ευρέως αποδεκτή εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν υπολείμματα όταν το ζώο θα φθάσει σε εμπορεύσιμο μέγεθος, παρόλο που σε ορισμένες χώρες υπάρχουν περιορισμοί για την κατανάλωση των ψαριών που έχουν υποστεί επεξεργασία με ορμόνες. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με την αντιστροφή φύλου, με αποτέλεσμα να παράγονται άτομα ενός φύλου, χωρίς τα ζώα να έρχονται σε επαφή με ορμόνες (Mair et al., 1995).

Η παραγωγή ενός μόνου φύλου είναι μια αποτελεσματική τεχνική διαχείρισης που χρησιμοποιείται για να αντιμετωπισθούν προβλήματα πρώιμης ωρίμανσης των ψαριών, που παρατηρείται σε μια σειρά εμπορικών ειδών που εκτρέφονται και παρουσιάζουν σεξουαλικό διμορφισμό (Pandian & Kirankumar, 2003 ; Piferrer, 2001). Τα θηλυκά άτομα του καλκανιού του Ατλαντικού, *Hippoglossus hippoglossus*, αναπτύσσονται γρήγορα και αυξάνουν περισσότερο σε σχέση με τα αρσενικά άτομα, φθάνοντας σε εμπορικό μέγεθος πριν την ωρίμανση (Hendry et al., 2002, 2003 ; Tvedt et al., 2006). Η ωρίμανση είναι το μείζον πρόβλημα, με αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια της εκτροφής, τα ενεργειακά αποθέματα που διαθέτουν μετατοπίζονται στη σεξουαλική ανάπτυξη, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αύξηση του ψαριού και να αλλοιώνεται η ποιότητα της σάρκας και να γίνονται περισσότερο ευπαθή στις ασθένειες (Taranger et al., 2009).

Η παραγωγή μόνο ενός φύλου και ιδίως θηλυκών ατόμων, θα αυξήσει τα οικονομικά οφέλη για τη βιομηχανία του εμπορίου των ψαριών. Μέχρι σήμερα οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ στο Ηνωμένο Βασίλειο, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων

(Cawan et al., 2010). Στο καλκάνι το φύλο, προσδιορίζεται μέσω της γονιμοποίησης των γαμετών από ένα ετερογαμέτη αρσενικό (X ή Y). Η διαφοροποίηση του φύλου προσδιορίζεται μέσω των γονάδων και εκφράζεται μέσω του κατάλληλου φαινοτύπου (Hendri et al., 2002).

Προκειμένου να δημιουργηθεί ένας πληθυσμός που να αποτελείται από ένα φύλο, εφαρμόζεται η τεχνική της αντιστροφής φύλου (χρησιμοποιούνται στεροειδή με σκοπό να παρακαμφτεί η φυσική έκκριση ορμονών), η οποία εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης περιόδου μετά το γενετικό προσδιορισμό του φύλου, πριν τη σεξουαλική διαφοροποίηση, όταν οι γονάδες δεν έχουν διαφοροποιηθεί, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός πληθυσμού με ένα φύλο (Hendri et al., 2002). Η διαδικασία περιγράφεται ως αντιστροφή φύλου και χρησιμοποιείται ευρέως στην εκτροφή της τιλάπια (Fitzpatrick et al., 1998 ; Fitzpatrick et al., 1999 ; Gale et al., 1996 ; Kwon et al., 2000 ; Wassermann et al., 2003).

Έμμεση αντιστροφή φύλου, εφαρμόζεται κυρίως για τα ψάρια τα οποία προορίζονται για κατανάλωση προκειμένου να μην έλθουν σε άμεση επαφή με προσθήκη ορμονών, υπό την προϋπόθεση ότι ένα μέρος του πληθυσμού είναι άμεσα συνδεδεμένο με την αντιστροφή φύλου, ενώ κατά τη ωρίμανση οι «νέοι γονείς» που αναγνωρίζονται διασταυρώνονται με την μητρική γενιά ώστε να παραχθεί πληθυσμός με ένα φύλο (Cowan et al., 2010). Έμμεση αντιστροφή φύλου, έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία στο καλκάνι, σύμφωνα με τη μελέτη των Hendri et al (2003), όπου όλα τα θηλυκά άτομα γίνονται αρσενικά (XX νέο-αρσενικά), στα οποία χορηγείται μεθυλ-υδρο-τεστοστερόνη (MDHT, συνθετική τεστοστερόνη), πριν διαφοροποιηθεί το φύλο, διασταυρώνονται με θηλυκά άτομα (XX) προκειμένου να παραχθούν ολο-θηλυκά άτομα (Piferrer, 2001).

Το καλκάνι είναι από τα είδη ψαριών που προσφέρονται για αντιστροφή φύλου, αρχίζουν να διαφοροποιούνται μετά την αρχική χορήγηση των ορμονών η οποία μπορεί να γίνει με προσθήκη στις τροφές, τα αποτελέσματα της οποίας δείχνουν, μια περίοδο που χαρακτηρίζεται αδιάφορη και διαρκεί από το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο μέχρι το μήκος της προνύμφης φθάνει τα 38 mm (Lf), (Hendri et al., 2002). Στον κλάδο της κτηνοτροφίας η αντιστροφή φύλου χρησιμοποιείται στην παραγωγή ενός φύλου, προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή κρέατος και γάλατος (Joerg et al., 2004).

Ο φθορισμός ενεργοποιεί την ταξινόμηση των κυττάρων (FACS), ενώ χρησιμοποιείται στα σταγονίδια που περιέχουν επιθυμητά κύτταρα, ενώ ταξινομούνται σε πληθυσμούς με αρσενικά και θηλυκά, οι οποίοι μπορούν να ψυχθούν, να αποθηκευτούν και να χρησιμοποιηθούν για τεχνητή γονιμοποίηση (Seidal, 2009). Η τεχνική διαφοροποίησης του σπέρματος αποτελεί ένα πλεονέκτημα για τον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας διότι παρέχει πολλά οφέλη για την παραγωγή πληθυσμών που αποτελούνται από ένα φύλο και σχετίζονται με τις διαφορές στο DNA (Ocalewacz et al., 2008a).

Μελέτες για τον καθορισμό του φύλου στα *O.latipes*, πραγματοποιήθηκαν από τον Aida (1921) (επισκόπηση από Hamaguchi et al., 2004) που υποδεικνύει το γονίδιο *r*, ως υπεύθυνο για την παρουσία ή απουσία χρωστικής κίτρινου χρώματος στα ξανθοφόρα, αυτό συνδέεται με το φυλετικό χρωμόσωμα και αποδεικνύει ότι τα *O.latipes*, έχουν XX-XY σύστημα καθορισμού του φύλου. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν μοριακοί δείκτες για τα φυλετικά χρωμοσώματα (Matsuda et al., 1997) και ακολούθησε η ακριβής εικόνα των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Matsuda et al., 1997).

Ο ακριβής γενετικός χάρτης των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Sato et al., 2001) και της BAC-βιβλιοθήκης (Matsuda et al., 2001) κλωνοποιήθηκαν υποψήφια ψάρια για τον καθορισμό του φύλου των *O.latipes* και του γονιδίου DMY (Matsuda et al., 2002). Η εισαγωγή του γονιδίου DMY, στα αυγά χρωμοσώματος XX οδήγησε στην ανάπτυξη δοκιμών προκαλώντας λειτουργική αντιστροφή του φύλου από θηλυκό σε αρσενικό, αποδεικνύοντας ότι τα DMY, είναι φυλοκαθαριστικό γονίδιο των ψαριών (Σχ.1).

	Σύστημα προσδιορισμού φύλου	Προσδιορισμός γονιδίου
<i>O.mekongensis</i>	XX-XY	άγνωστο
<i>O.latipes</i>	XX-XY	DMY
<i>O.curvinotus</i>	XX-XY	DMY
<i>O.luzonensis</i>	XX-XY	άγνωστο

Σχήμα 1: Σύστημα προσδιορισμού φύλου και γονιδίου των ψαριών *Oryzias* (Πηγή: Hamaguchi et al., 2004).

4. Στρατηγικές διαχείρισης των αποθεμάτων για την καταστολή της πρώιμης ωρίμανσης

Οι στρατηγικές διαχείρισης που χρησιμοποιούνται για την άμβλυνση των προβλημάτων τα οποία οδηγούν στην αποφυγή 1) της παραγωγής ενός φύλου ή έλεγχος της παραγωγής, 2) της στειρότητας, 3) του περιβαλλοντικού έλεγχου. Οι στρατηγικές που εφαρμόζονται είναι η παραγωγή όλο θηλυκών ατόμων, η ορμονική θεραπεία, η γυνογένεση, ο χρωμοσωμικός διαχωρισμός σπέρματος, η στειρότητα των εκτρεφόμενων οργανισμών και η τεχνικές τριπλοειδίας που εφαρμόζονται.

4.1. Παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων

Η παραγωγή ενός φύλου σ' ένα πληθυσμό μπορεί να εφαρμοστεί σε είδη ψαριών που παρουσιάζουν σεξουαλικό διμορφισμό, όπου το άτομο φθάνει σε εμπορικό μέγεθος πριν ωριμάσει γενετικά. Για παράδειγμα οι θηλυκοί πληθυσμοί του καλκανιού κατά την εξαλίευσή, ενώ βρίσκονται σε πλεονεκτική θέση εξαιτίας του μεγέθους τους δεν είναι ώριμοι (Hendri et al., 2002 ; Hendri et al., 2003 ; Tvedt et al., 2006). Σε αντίθεση με την τιλάπια του Νείλου όπου τα αρσενικά άτομα αναπτύσσονται ταχύτερα με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων είναι η αντιστροφή φύλου με χρήση ορμονών (Shelton et al., 1978 ; kommen, 1989 ; Piferrer, 2001). Η αντιστροφή του φύλου καθορίζεται από την περίοδο χορήγησης των στεροειδών και λαμβάνει χώρα πριν το μήκος του ιχθυδίου φθάσει τα 38mm. Σύμφωνα με το πείραμα που διεξήγαγαν οι Hendri et al (2003),

Η επιτυχία αντιστροφής φύλου εξαρτάται από τη διάρκεια της ορμονικής θεραπείας (διαρκεί 6 εβδομάδες όταν τα ιχθύδια καλκανιού έχουν μέσο μήκος 30mm, Lf) και τη χορηγούμενη ποσότητα (5ppm, MDHT).

Οι έμμεσες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενός φύλου στα ψαρια είναι χρονοβόρα διαδικασία, ενώ απαιτούνται 2 γενιές προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα (Piferrer, 2001), για παράδειγμα, στην περίπτωση του καλκανιού απαιτούνται 4-5 χρόνια. Συνεπώς, η ταυτοποίηση οποιασδήποτε εναλλακτικής και ταχύτερης παραγωγής όλο-θηλυκών ατόμων συμβάλει στην αξιοποίηση του εμπορικού οφέλους που προκύπτει από την εκτροφή.

4.2.Ορμονική θεραπεία

Πληθυσμοί ψαριών που να αποτελούνται από ένα φύλο, παράγονται με έμμεση ή με άμεση αντιστροφή του φύλου. Η άμεση αντιστροφή του φύλου αναφέρεται στην έκθεση των προνυμφών των ψαριών, πριν τη διαφοροποίηση του φύλου σε αγωγή με ορμόνη, ώστε με την πάροδο του χρόνου να παράγονται απευθείας άτομα ενός φύλου.

Τα αποτελέσματα της αγωγής με συνθετική τεστοστερόνη στην τιλάπια του Νείλου, είναι η παραγωγή ενός πληθυσμού που να αποτελείται από ένα φύλο (Fitzpatrick et al., 1998 ; Fitzpatrick et al., 1999 ; Gale et al., 1996 ; Known et al., 2000 ; Wasserman et al., 2003). Στην Ινδία και στην Ευρωπαϊκή ένωση, απαγορεύεται η χρησιμοποίηση ορμονικής θεραπείας για παραγωγή ψαριών που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση (Cowan et al., 2010).

Η έμμεση αντιστροφή φύλου περιλαμβάνει την ορμονική θεραπεία ιχθυδίων τα οποία χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για γεννήτορες προκειμένου να παράγουν απογόνους επιθυμητού φύλου. Γι παράδειγμα στο καλκάνι με χρωμόσωμα XY ο προσδιορισμός όλο-θηλυκών ατόμων αποτελεί πρωταρχικό στόχο και επιτυγχάνεται μέσω της «αρρενοποίησης» των θηλυκών αποθεμάτων χορηγώντας την τεχνητή τεστοστερόνη MDHT (η οποία χρησιμοποιείται για την διαφοροποίηση του φύλου), ώστε να παραχθεί ένα νέος γενότυπος τα οποία αναφέρονται ως «νέο-αρσενικά». Στη συνέχεια τα «νέο-αρσενικά» άτομα που παράγονται διασταυρώνονται με κανονικά θηλυκά XX, παράγοντας όλο-θηλυκούς απογόνους (Piferrer, 2001).

Οι Hendry et al (2003), εφάρμοσαν ένα επιτυχές πρωτόκολλο για την ελεγχόμενη παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων καλκανιού. Άλλα είδη ψαριών στα οποία πραγματοποιήθηκε αντιστροφή φύλου με επιτυχία είναι η πέστροφα, *Salmo gairdneri* (Bye & Lincoln, 1986) και η κίτρινη πέκρα, *Perca flavescens* (Malison & Garcia-Abiando, 1996). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η άμεση κατανάλωση των ψαριών από τον άνθρωπο επειδή δεν έχουν έρθει σε απευθείας επαφή με τη συνθετική ορμόνη. Η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα καθώς απαιτεί περισσότερες από μια γενιές για να ληφθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα (Piferrer, 2001).

4.3. Γυνογένεση

Πληθυσμοί ενός μόνο φύλου, παράγονται με γυνογένεση. Η μέθοδος αυτή είναι μια διαδικασία αγενούς αναπαραγωγής όπου οι απόγονοι των ψαριών κληρονομούν μόνο το μητρικό γενετικό υλικό (Piferrer, 2001). Η γυνογένεση μπορεί να προκληθεί με την παρότρυνση ενός ωαρίου και να διαιεθεί χρησιμοποιώντας γενετικά ανενεργά σπερματοζωάρια, μέσω υπερϊώδης ακτινοβολίας γάμμα.

Το απλοειδές έμβρυο υφίσταται θερμικό σοκ και σοκ πίεσης με αποτέλεσμα να αποκαθιστά τη διπλοϊδία του. (Piferrer, 2001). Η γυνογένεση χρησιμοποιείται ως μια τεχνική για την παραγωγή ενός μόνου φύλου όπως για παράδειγμα συμβαίνει στην παραγωγή του *Puntius gonionotus* (Silver barb) στην Ταϊλάνδη (Pongthana et al., 1999), εντούτοις σήμερα χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς από πολλούς ερευνητές (Piferrer, 2001).

4.4. Χρωμοσωμικός διαχωρισμός σπέρματος

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενός φύλου παρουσιάζουν μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα η χρήση ορμονών. Η μέθοδος που καθιερώθηκε για την παραγωγή ενός φύλου συνίσταται στον χρωμοσωμικό διαχωρισμό του σπέρματος (Garner, 2001). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στον γεωργικό τομέα μέσω της διαδικασίας απομόνωσης των χρωμοσωμικών σπερματοζωαρίων.

Η τεχνική περιλαμβάνει, τη χρήση κυτταρόμετρων ροής προκειμένου να διαφοροποιηθούν τα χρωμοσώματα X και Y των σπερματοζωαρίων βασιζόμενοι στο χρωμοσωμικό DNA. Τα σπερματικά κύτταρα στη συνέχεια ταξινομούνται αυτόματα με βάση το φύλο, ενώ το επιθυμητό φύλο του σπερματοζωαρίου επιλέγεται προκειμένου να γονιμοποιηθεί το ωάριο (Garner, 2001). Μέχρι σήμερα, δεν έχει υπάρξει εκτεταμένη επιστημονική έρευνα όσον αφορά τη χρήση σπερματοζωαρίων για την παραγωγή όλο-θηλυκών πληθυσμών στους τελεόστεους οργανισμούς (Cowan et al., 2010).

4.5. Στείρωση εκτρεφόμενων οργανισμών

Η παραγωγή στειρών πληθυσμών πραγματοποιείται σε είδη, όπου τα δύο φύλα ωριμάζουν πριν φθάσουν σε εμπορικό μέγεθος. Η μέθοδος αυτή είναι περιορισμένη και εστιάζεται κυρίως στην διαχείριση της πλοϊδίας. Η τριπλοϊδία αναφέρεται σε άτομα που φέρουν τρία χρωμοσώματα στα σωματικά κύτταρα (Benfey, 2001), σε αντίθεση με την κανονική διπλοϊδία η οποία φέρει δύο χρωμοσώματα, και οδηγεί σε μη φυσιολογική μειωτική διαίρεση των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης (Benfey, 1999 ; Tiwary et al., 2004 ; Taranger, 2009).

Επομένως, για περαιτέρω αύξηση της παραγωγής ενισχύεται η άποψη ότι η παραγωγή όλο-θηλυκών αποθεμάτων είναι ευνοϊκότερα για εκτροφή από μικτή τριπλοειδία. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ήδη και εφαρμόζεται με επιτυχία στην ιριδίζουσα πέστροφα, διερευνάται στο λαβράκι και είναι υπό έλεγχο στον σολομό του Ατλαντικού (Zanuy et al, 2001).

4.6. Τεχνικές τριπλοϊδίας

Η τριπλοϊδία, προκαλείται τεχνητά για εμπορικούς λόγους με σοκ στα πρόσφατα γονιμοποιημένα αυγά (ζυγωτό κύτταρο) ώστε να ανασταλεί η δεύτερη μειωτική διαίρεση (Malison et al., 1996 ; Mexime, 2008). Αυτό αποτρέπει τον αποκλεισμό του δεύτερου πολικού σωματίου από το αυγό με αποτέλεσμα να διατηρούνται τρία ζεύγη χρωμοσωμάτων (Benfey, 1999 ; Tiwary et al., 2004 ; Maxime, 2008). Η πρόκληση μπορεί να γίνει με φυσικές ή χημικές τεχνικές (Maxime, 2008).

Η φυσική πρόκληση είναι η προτιμώμενη μέθοδος όσο το χημικό σοκ (με χρήση κολχικίνης ή αναισθητικού), βρέθηκε να οδηγεί στην ασθένεια του μωσαϊκού (Maxime, 2008). Η φυσική πρόκληση περιλαμβάνει σοκ υπό πίεση και είναι μια μέθοδος που έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην ιριδίζουσα πέστροφα (Taylor et al., 2007) και θερμικό σοκ (ζεστό και κρύο), το οποίο έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στο καλκάνι (Piferrer et al., 2003), στην πέρκα *Perca fluviatilis* (Rougeot et al., 2003) και στην τιλάπια, *Oreochromis aureus* (Byamungu et al., 2001).

Συγκρίνοντας το βαθμό επιτυχίας, το σοκ πίεσης βρέθηκε να είναι μια τεχνική πιο αποτελεσματική παράγοντας υψηλότερες αποδόσεις τριπλοειδίων (McGeachy et al., 1995 ; Maxime, 2008). Επίσης, το σοκ πίεσης όπως περιγράφηκε προκαλεί μικρότερα προβλήματα σε σχέση με το θερμικό σοκ (Peruzzi & Chatain, 2000 ; Maxime, 2008). Ο Maxime (2008), στην ερευνά του αναφέρει ότι η πρόκληση τριπλοειδίας σπάνια οδηγεί σε βλάβες. Για την ανίχνευση της τριπλοειδίας χρησιμοποιούνται έμμεσες τεχνικές όπως ο έλεγχος των κυττάρων πυρηνικά ή διαμέσου της ροής της κυτταρομετρίας. Το μέγεθος των ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιούνται ως δείκτης για τριπλοειδία στα ψάρια (Benfey, 1999).

Τα αρσενικά άτομα, ορισμένων στελεχών σολομού ωριμάζουν γενετικά νωρίτερα, προκειμένου να επιτευχθεί το βέλτιστο εμπορικό μέγεθος του ψαριού. Η αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού επιτυγχάνεται με παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων σολομού (*Oncorhynchus tshawytscha*), οι οποίοι αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής στον Καναδά (Anonymous, 2009). Ο σολομός διαθέτει το χρωμόσωμα XY το οποίο καθορίζει το φύλο και είναι σταθερό, επιτρέποντας την παραγωγή καθαρών πληθυσμών που αποτελούνται από άτομα με χρωμόσωμα XX.

Ιστορικά αυτό έχει επιτευχθεί με αλλαγή του φύλου, όπου σε ένα μεικτό αριθμό ατόμων χορηγούνται ανδρογόνα σε νεαρή ηλικία με στόχο να παραχθούν XX θηλυκά τα οποία αποκτούν αρσενικά χαρακτηριστικά (αρρενοποίηση πληθυσμού) τα οποία περιέχουν το χρωμόσωμα XX και XY.

Οι δυο τύποι αρσενικών ατόμων έχουν διαχωριστεί ο ένας από τον άλλο ως εξής:

Διασταύρωση κάθε ατόμου που παράγεται με τα κανονικά θηλυκά άτομα προκειμένου να παραχθούν θηλυκά άτομα (η μέθοδος είναι χρονοβόρα διαδικασία).

Χρησιμοποιώντας ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που υπάρχουν μεταξύ XX και XY αρσενικών ατόμων (προκαλώντας το χαρακτηριστικό αυτό απαιτούνται μακροχρόνιες διατροφικές αγωγές, ενώ τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα).

Ταυτοποίηση των ερμαφρόδιτων γονάδων, η οποία είναι ενδεικτική του χρωμοσώματος XX (αλλά εμφανίζεται μόνο σε ένα μικρό ποσοστό του φύλου που αντιστράφηκε και είναι αναξιόπιστο). Η χρήση του χρωμοσωμικού δείκτη Y στο γενετικό υλικό όπου μπορεί να διακριθεί ο γονότυπος XX και XY.

Ο σολομός, ένα άλλο είδος ψαριού με μεγάλη εμπορική σημασία παρουσιάζει μέτρια έως υψηλά επίπεδα πρόωρης ωρίμανσης σε ορισμένα στελέχη. Επιπρόσθετα, η απόδοση του κεφαλαίου αυτού του είδους είναι εξαιρετικά πολύτιμη, ενώ η ανάπτυξη όλο-θηλυκών ατόμων παρουσιάζει σημαντικό όφελος για την υδατοκαλλιέργεια. Η μέθοδος για την παραγωγή ενός όλο-θηλυκού ατόμου πρώτου στελέχους συνίσταται στην εξής διαδικασία (Anonymous, 2009) (Σχ. 2):

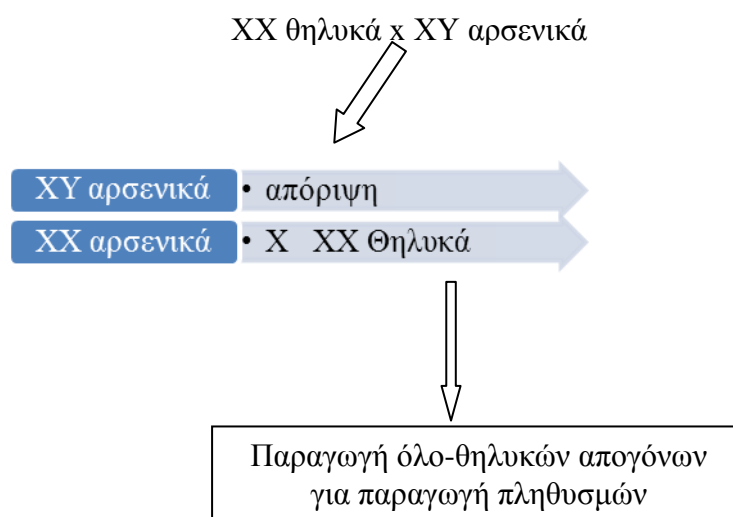
Η πρώτη γενιά αποκτά αρσενικά χαρακτηριστικά (αρρενοποίηση).

Ανάπτυξη ενός γενετικού δείκτη όπου θα χρησιμοποιείται για να διακριθούν τα αρσενικά άτομα (XY) από τα θηλυκά άτομα (XX).

Έλεγχος κάθε ψαριού με το γενετικό δείκτη για την απομάκρυνση των αρσενικών (XY).

Επαλήθευση της απομάκρυνσης των αρσενικών (XY) που παρουσιάζουν αυξημένη ωρίμανση και το ζευγάρι που παρουσιάζει το θηλυκό χρωμόσωμα (XX), για να παραχθεί ένα μείγμα αρσενικών (XY) και θηλυκών (XX) απογόνων.

Έλεγχος ζευγαρώματος στα ψάρια τα οποία είναι γενετικά θηλυκά άτομα (XX-αλλά φαίνονται να είναι αρσενικά και παράγουν σπέρμα) με φυσιολογικά θηλυκά (XX) προκειμένου να παραχθούν όλο-θηλυκοί απόγονοι ψαριών (XX).



Σχήμα 2: Διαγραμματική πορεία παραγωγής όλο-θηλυκών διαμέσου της απόκτησης αρσενικών χαρακτηριστικών (αρρενοποίηση) και γενετικός έλεγχος.

4.7. Άτομα με αρσενικά χαρακτηριστικά «αρρενοποίηση»

Ο σολομός αποκτά αρσενικά χαρακτηριστικά, όταν στα νεοεκκολαπτόμενα άτομα σολομού χορηγηθεί μεθυλο-τεστοστερόνη και μεθυλο-διυδρο-τεστοστερόνη, που παράγουν τα ψάρια από μεικτή γενετική σύσταση (χρωμοσώματος XX και XY) ή έχουν μόνο αρσενικά χαρακτηριστικά. Τα ψάρια μπορούν να υποβάλλονται σε γονοτυπική ανάλυση και τα γενετικά αρσενικά απορρίπτονται, εξοικονομώντας κατά αυτό τον τρόπο διαφορετικό κόστος εκτροφής. Ο έλεγχος πραγματοποιείται σε νεαρούς σολομούς ή σε μεγαλύτερα άτομα επιλέγοντας τα άτομα με το χρωμόσωμα XX τα οποία μπορεί να είναι σε σεξουαλική ωριμότητα.

4.8. Γενετικός έλεγχος

Ο προσδιορισμός του φύλου πραγματοποιείται με επιλογή θηλυκών χρωμοσωμάτων, τα οποία εξετάζονται για την ανάπτυξη αρσενικών χαρακτηριστικών (παραγωγή σπέρματος ή μορφολογικά χαρακτηριστικά). Το παραγόμενο σπέρμα για ανάλυση συλλέχθηκε απευθείας από τους σπερματογωγούς, ενώ τα θηλυκά υποβλήθηκαν σε ευθανασία προκειμένου να ληφθεί δείγμα ιστού από τις γονάδες ώστε να εξεταστούν για τυχόν δείγματα ανάπτυξης όρχεων. Το σπέρμα συλλέγεται από το ήπια εκφυλισμένο ιστό του σπέρματος.

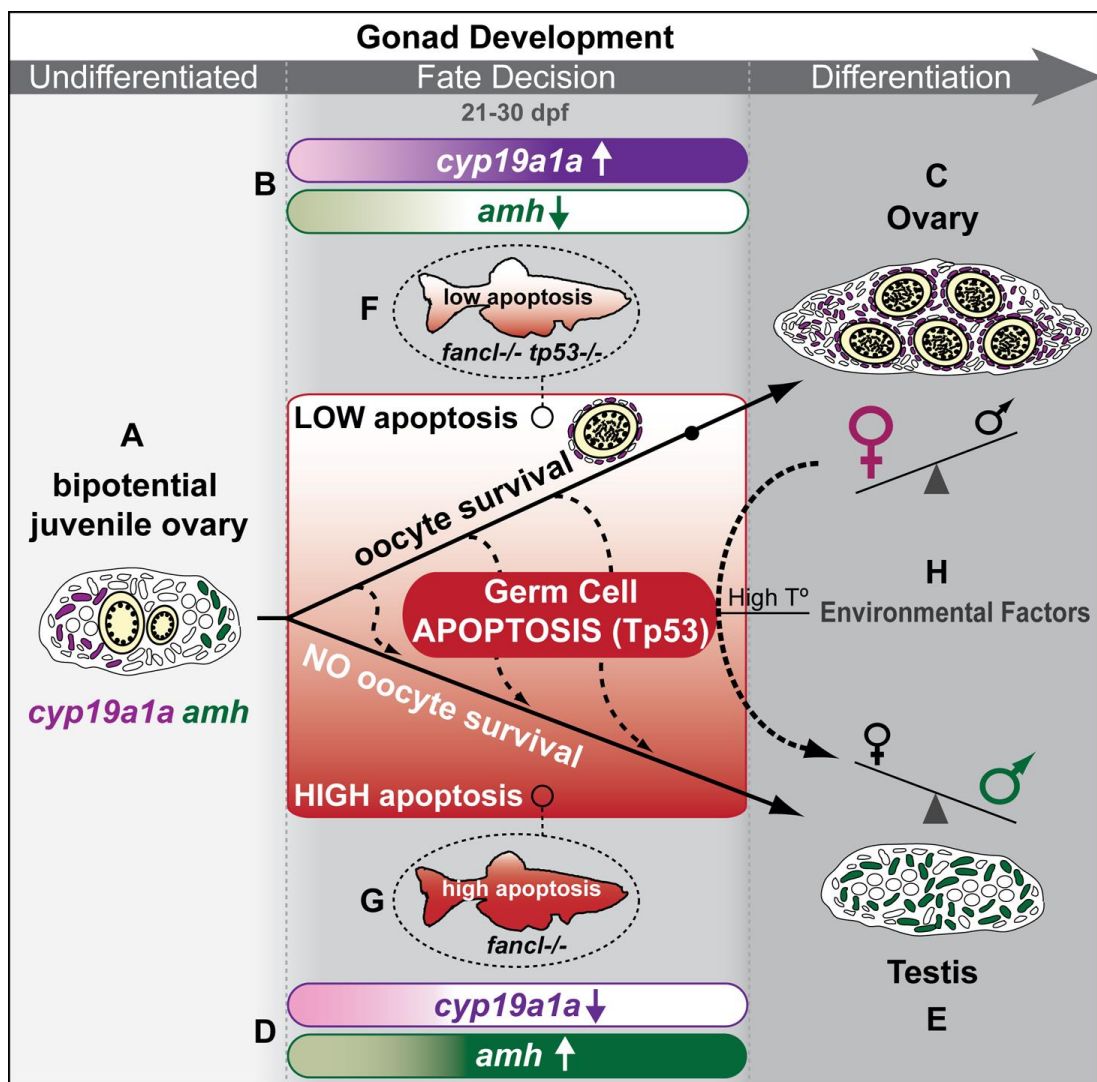
Το σπέρμα χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να διασταυρωθεί με κανονικούς θηλυκούς γεννήτορες (χρωμοσώματος XX) και οι απόγονοι εκτρέφονται σε γλυκό νερό μέχρι να επιτευχθούν τα προ-στάδια ανάπτυξης των μικρών σολομών. Οι απόγονοι αποτέλεσαν αντικείμενο δειγματοληψίας και υποβάλλονται σε φύλου γονοτυπική ανάλυση προκειμένου να επαληθευτεί το μοναδικό φύλο.

4.9. Ανάπτυξη γενετικού δείκτη

Ο προσδιορισμός των χρωμοσωμάτων XX και XY πραγματοποιείται μέσω γονοτυπικού ελέγχου προκειμένου να ανιχνευθεί το χρωμόσωμα Y. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην παρουσία της αυξητικής ορμόνης GH-P, στο χρωμόσωμα Y που μπορεί να διακριθεί από άλλα αντίγραφα των γονιδίων GH χρησιμοποιώντας τη

μέθοδο PCR. Στη μέθοδος PCR, χρησιμοποιούνται υποκινητές (primers) GH5 και GH6 οι οποίοι διασπών το ιντρονίο E (αλληλουχία) όλων των γονιδίων GH στο γονιδίωμα σε θερμοκρασίες μεταξύ 50°C και 60°C. Στη συνέχεια στα προϊόντα της PCR, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε ζελέ αγαρώζης περιεκτικότητας 0,8% με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την αναγνώριση του Y χρωμοσώματος στο αίμα ή σε ιστό με τον τρόπο αυτό μαρκάρει με τα ψάρια που γενετικά είναι αρσενικά (XY) ή θηλυκά που έχουν αποκτήσει αρσενικά χαρακτηριστικά (XX) (Σχ.3).



Σχήμα 3: Διαδικασία αντιστροφής φύλου στη ζέμπρα (*Danio rerio*) (Πηγή: www.plosgenetics.org)

5. Αντιστροφή φύλου και είδη ψαριών

Στα ψάρια η τεχνική της αντιστροφής φύλου είναι ευρύτατα διαδεδομένη σε πολλές χώρες. Η ανάπτυξη αυτών των τεχνικών-μεθόδων γίνεται σκόπιμα γιατί στις ιριδίζουσες πέστροφες το αρσενικό ωριμάζει νωρίτερα σε σύγκριση με το θηλυκό. Η επίδραση τριών ορμονών (17α-μεθυλ-τεστοστερόνη, 11β υδροξυ-ανδροστεδεριόνη και 17 α αιθιν-τεστοστερόνη) στην αντιστροφή του φύλου και στην ανάπτυξη της ιριδίζουσας πέστροφας μελετήθηκε από τους Atar et al (2009). Η ομάδα του μάρτυρα διατράφηκε με εμπορικές τροφές για πέστροφες χωρίς την προσθήκη ορμονών.

Τα λειτουργικά αρσενικά με αντιστροφή φύλου ανατράφηκαν από νεογέννητα μέχρι να φθάσουν σε σεξουαλική ωρίμανση. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η 17 α-μεθυλ-τεστοστερόνη ήταν περισσότερο αποτελεσματική ορμόνη. Ο μεγαλύτερος λόγος αντιστροφής φύλου ($86.67 \pm 6.67\%$), παρατηρήθηκε στην ομάδα που χορηγήθηκε 3 mg/Kg 17 α μεθυλ-τεστοστερόνη για διάστημα 60 ημερών (Atar et al., 2009). Οι υπόλοιπες δύο ορμόνες (17α αιθιν-τεστοστερόνη και 11β υδροξυ-ανδροστεδεριόνη) έδειξαν μικρότερους ρυθμούς ανάπτυξης και παρόμοια αποτελέσματα. Ωστόσο ο μεγαλύτερος λόγος μεσόφυλου ($46.67 \pm 6.67\%$) καταγράφηκε στην ομάδα που χορηγήθηκε 30mg/k 17 α αιθιν-τεστοστερόνη για χρονικό διάστημα 40 ημερών, αλλά ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν κατώτερος του 20% περίπου για όλα τα υπόλοιπες ομάδες. Η 17 α αιθιν-τεστοστερόνη

Σύμφωνα με την έρευνα που διεξήγαγε ο Anonymous (2009), ο πληθυσμός του σολομού, αποκτά αρσενικά χαρακτηριστικά σε μια περίοδο πέντε ετών μετά από χορήγηση μεθυλ-τεστοστερόνης. Η εκτροφή των ψαριών συνεχίστηκε μέχρι να ωριμάσουν γενετικά ώστε να χρησιμοποιηθούν για γεννήτορες. Η γονοτυπική ανάλυση και το γενετικό φύλο για την παραγωγή ατόμων σολομού παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Παραγωγή ατόμων σολομού ενός φύλου (Πηγή: Anonymous,2009).

Χαρακτηριστικά	Έτος				
	1ο	2ο	3ο	4ο	5ο
Άτομα	522	591	582	158	210
% ατόμων με αρσενικά χαρακτηριστικά	1%	4%	33%	41%	86%
% ανώριμα άτομα	9%	38%	55%	41%	14%
Αριθμός απογόνων	1600	1600	1600	600	600
% θηλυκών απογόνων	100%	95%	100%	100%	100%

Φαινοτυπικά αρσενικά που προέρχονται από θηλυκό γενότυπο (XX) επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν ως γεννήτορες για να διασταυρωθούν με κανονικά θηλυκά. Το πρώτο έτος της παραγωγής, ένα μεγάλο ποσοστό θηλυκών ατόμων παρήγαγε απογόνους που προέρχονταν από τέτοιες διασταυρώσεις (Πιν.1). Το δεύτερο χρόνο τα αρσενικά που επιλέχθηκαν, αναλύθηκαν και βρέθηκε να περιέχουν το Y χρωμόσωμα. Το δεύτερο έτος τα αρσενικά που παρήχθησαν εξετάστηκαν και βρέθηκε να περιέχουν το χρωμόσωμα Y.

Επομένως τα αρσενικά που εμφανίστηκαν προκύπτουν από αυτοσωμικές γενετικές ή περιβαλλοντικές επιδράσεις, αλλά κατά πάσα πιθανότητα προέκυψαν από μια τυχαία διασταύρωση μεταξύ αρσενικών γεννητόρων που φέρουν το χρωμόσωμα XY. Τα επόμενα έτη το 100% των απογόνων που παρήχθησαν ήταν θηλυκά άτομα, αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό τη χρησιμότητα της μεθόδου για την παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων σολομού, *Oncorhynchus kisutch* (Anonymous, 2009).

Με τα όλο-θηλυκά άτομα επιτρέπεται η παραγωγή χαβιαριού και ως εκ τούτου θα πρέπει να ενισχύεται η εκτροφή και η παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων για εμπορικούς λόγους. Συνεπώς, τα θηλυκά στελέχη που προέρχονται από τον σολομό coho, οδήγησαν σε αύξηση της ικανότητας του ψαριού να παράγει αυγοτάραχο, αφού διπλασιάστηκε η ποσότητα, που προέρχονταν από τον ίδιο αριθμό ατόμων σε σχέση με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στη κανονική εκτροφή ψαριών (Σχ.4).

φυσιολογικά άτομα όλο-θηλυκά άτομα



Σχήμα 4: Παραγωγή χαβιαριού μεταξύ φυσιολογικών και όλο-θηλυκών ατόμων σολομού (Πηγή: Anonymous, 2009).

Σε ότι αφορά στην ανάπτυξη του σολομού δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο βάρος και στο μήκος μεταξύ των θεραπειών κατά τη διάρκεια χορήγησης ορμόνης (μεθυλ-τεστοστερόνης) στις τροφές. Η αύξηση βάρους είναι μεγαλύτερη όταν

χορηγούνται 5 ppm ορμόνης (1847 g) σε σχέση με τους σολομούς που δεν χορηγήθηκε καθόλου ορμόνη και είχαν μέσο τελικό βάρος 1548 g για διάστημα 26 μηνών (Hendri et al., 2003 ; Imsland & Jonassen, 2005).

Επίσης, σύμφωνα με την ίδια έρευνα, η ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερη στα θηλυκά ψάρια (50%) σε σχέση με τα αρσενικά άτομα και κατά συνέπεια η αύξηση αυτή οφείλεται στη διαφοροποίηση του φύλου. Το 50% των θηλυκών στον πληθυσμό που δεν χορηγήθηκε ορμονική θεραπεία αυξήθηκαν πιο γρήγορα σε σχέση με τα αρσενικά άτομα και επομένως η αύξηση του πληθυσμού που χορηγήθηκε MDHT, οφειλόταν κατά κύριο λόγο στο αυξημένο ποσοστό των φαινοτυπικών αρσενικών που ήταν 97% του πληθυσμού (Hendri et al., 2003 ; Imsland & Jonassen, 2005).

Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα της έρευνας που διεξήγαγαν οι Gullu et al (2005), ήταν παρόμοια με αυτή των Atar et al (2009) δείχνοντας την επίδραση της οιστραδιόλης στην αντιστροφή του φύλου για χρονικό διάστημα 140 ημερών οι οποίες χωρίστηκαν σε 5 περιόδους. Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη στα νεαρά και αναπτυσσόμενα ιχθύδια πέστροφας ηλικίας 35 ημερών μετά την εκκόλαψη, χορηγήθηκαν 400mg/L με εμβάπτιση, διαλύματος οιστραδιόλης, για 2 ώρες, 2 φορές την εβδομάδα για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων. Στη συνέχεια ο γόνος της πέστροφας διατράφηκαν για διάστημα 60 ημερών με 20mg/k οιστραδιόλη (Gullu et al., 2005).

Η ποσότητα χορήγησης της οιστραδιόλης επηρεάζει το ρυθμό αλλαγής του φύλου και βρέθηκε να είναι της τάξης του 100%. Επίσης τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι η E2V μειώνει την ανάπτυξη, το ρυθμό μετατροπής της τροφής και το ρυθμό επιβίωσης του γόνου των πεστροφών, επηρεάζοντας θετικά την παραγωγή όλο-θηλυκών πληθυσμών στις πέστροφες (Gullu et al., 2005).

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα της επίδρασης της οιστραδιόλης στην αντιστροφή του φύλου στις γαρίδες (Aktas & Genc, 2011). Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη οι επιδράσεις της 17 β –οιστραδιόλης που παρατηρήθηκαν στην επιβίωση, τη θηλεοποίηση και στην ανάπτυξη των γαριδών *Penaeus semisilcatus*, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Τα αυγά, οι προνύμφες, τα πρωτόζωα και οι νύμφες γαρίδας εμβαπτίστηκαν σε νερό που περιείχε 50μg/L β-οιστραδιόλης από την αρχή αυτού του σταδίου έως το τέλος του για διάστημα 4 μηνών μέχρι να εμφανίσουν τα δευτερεύοντα σεξουαλικά χαρακτηριστικά στην κοιλιακή τους χώρα (Aktas & Genc, 2011). Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η μέθοδος της εμβάπτισης σε

διάλυμα 50μg/L 17β-οιστραδιόλης στο στάδιο ανάπτυξης του αυγού, των προνυμφών μειώνει το ρυθμό επιβίωσης. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη ο βαθμός θηλεοποίησης (71.88%) παρατηρήθηκε στις ομάδες των προνυμφών παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ($P < 0.0001$). Σε σχέση με το ρυθμό ανάπτυξης, η μεγαλύτερη αύξηση στο βάρος ήταν στην ομάδα των προνυμφών ($14.15 \pm 2.41g$), στο μάρτυρα ($13.66 \pm 2.48g$) και στα αυγά ($12.04 \pm 0.68g$), παρουσιάζοντας σημαντικές στατιστικές διαφορές σε σχέση με τα υπόλοιπες ομάδες γαριδών ($P < 0.005$) (Aktas & Genc, 2011).

Τα αποτελέσματα της μελέτης των Aktas & Genc (2011), συμφωνούν με εκείνα των Hossain et al (2002), οι οποίοι μελέτησαν το Αφρικανικό γατόψαρο και την επίδραση διαφορετικών επιπέδων 17β –οιστραδιόλης, στην ανάπτυξη, επιβίωση και αναλογία φύλου. Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές δοσολογίες (50,100,200 και 400mg) 17β-οιστραδιόλης ανά κιλό χορηγούμενης τροφής.

Τα γατόψαρα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν μέσο βάρος 4.7 mg και μέσο βάρος 5.1mm. Η ανάπτυξη, η επιβίωση και η αναλογία του φύλου βρέθηκε να είναι σημαντικά μεγαλύτερη όταν χορηγείται 100 mg οιστραδιόλη από το γόνο που χορηγήθηκε οιστραδιόλη σε συγκεντρώσεις 50,200 και 400mg (Hossain et al., 2002). Επίσης στην ίδια μελέτη δεν υπήρχαν αρνητικά αποτελέσματα σε ότι αφορά στην ανάπτυξη και επιβίωση σε ότι αφορά την χορηγούμενη ορμόνη.

Η συγκέντρωση των 100 και 50 mg 17β-οιστραδιόλης/κτροφής έδωσαν 87.76% και 80.85% θηλυκών ψαριών αντίστοιχα, τα οποία παρουσίασαν σημαντικές στατιστικές διαφορές ($P < 0.01$) σε σχέση με την αναμενόμενη συχνότητα θηλυκών ψαριών σε κανονικούς πληθυσμούς. Η συγκέντρωση των 400mg 17β- οιστραδιόλη έδωσε σχετικά μικρή συχνότητα θηλυκών ψαριών (Hossain et al.,2002).

Οι Kirouros et al (2011), στην έρευνά τους μελέτησαν την επίδραση της 17α-μεθυλ-τεστοστερόνη στην απόκτηση αρσενικών χαρακτηριστικών (αρρενοποίηση) του τροπικού μονομάχου, *Betta splendens*. Τα αποτελέσματα της έρευνάς τους, έδειξαν 100% απόκτηση αρσενικών χαρακτηριστικών στο μονομάχο, όταν χορηγείται 17α-μεθυλ-τεστοστερόνη σε συγκεντρώσεις 3 και 4 mg/k σε σχέση με τις υπόλοιπες (1 και 2 mg/k), αυξάνοντας το ρυθμό επιβίωσης των απογόνων, όταν τα ψάρια βρίσκονται σε εκτεταμένη περίοδο παροχής εμπλουτισμένων ναύπλιων *artemia*. Η

θνησιμότητα ήταν αυξημένη και στις 4 ομάδες που χορηγήθηκε 17α-μεθυλ-τεστοστερόνη (Kipouros et al., 2011).

Οι Hendri et al (2003), στη ερευνά τους, καταδεικνύουν τη βασική μεθοδολογία προκειμένου να «αρρενοποιηθούν» νεαρά άτομα καλκανιού του Ατλαντικού, τα οποία χρησιμοποιούνται ως γεννήτορες με σκοπό τη δημιουργία θηλυκών ατόμων, μετά από θεραπεία με 5 ppm MDHT (μεθυλοτεστοστερόνη) για διάστημα 6 εβδομάδων. Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί υψηλότερη συγκέντρωση (10 ppm MDHT), συνίσταται η μείωση της χρονικής διάρκειας της θεραπείας (περίπου στις 3 εβδομάδες), ώστε να «αρρενοποιηθεί» ένας πληθυσμός νεαρών ατόμων μέσα στον ετερογενή πληθυσμό.

Η προτεινόμενη αγωγή (5ppm MDHT για διάστημα 6 εβδομάδες), είναι μια ισχυρή και αποτελεσματική μέθοδος ώστε τα νεαρά άτομα να αποκτήσουν χαρακτηριστικά αρσενικών ατόμων τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων. Η ποσοτικοποίηση της αναλογίας του φύλου μεταξύ των απογόνων προσδιορίζει την παρουσία των νέο-αρσενικών στον πληθυσμό (Cowan et al., 2010).

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν, τις διαφορές που υπάρχουν στη μορφολογία των χρωμοσωμάτων και σχετίζονται με το φύλο ως προς το μέγεθος που παρουσιάζουν τα σπερματοζώαρια και σχετίζεται με τον ετερομορφισμό που παρουσιάζει του μήκος του χρωμοσώματος του είδος *Gasterosteus aculeatus* (Ocalewicz et al., 2008a).

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για την μελέτη του σπέρματος των ψαριών είναι ευαίσθητα και στηρίζονται κυρίως στις διαφορές που προκύπτουν μεταξύ των κυττάρων του σπέρματος των ψαριών. Οι Rens et al (1999), στην έρευνά τους εστίασαν στο σχεδιασμό των ακροφυσίων ενός κυτταρόμετρου ροής με ακτίνα λέιζερ ώστε να διατηρείται ο προσανατολισμός των σπερματοζωαρίων στο κυτταρόμετρο.

Πρωταρχικός σκοπός της παραγωγής ατόμων ενός φύλου είναι η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας και η ενίσχυση της παραγωγής σε πληθυσμούς που αποτελούνται από ένα φύλο. Σε μερικές περιπτώσεις οι πληθυσμοί που αποτελούνται από ένα φύλο ενδέχεται να παρέχουν περισσότερα περιβαλλοντικά οφέλη. Για παράδειγμα, σε περιοχές όπου δεν υπάρχουν ενδημικά είδη ψαριών συνίσταται η εκτροφή ψαριών ενός φύλου, η οποία μπορεί να αποτελέσει μια εξαιρετική και αποτελεσματική μέθοδο για την αναπαραγωγική συνοχή των ψαριών. Τα άτομα ενός

πληθυσμού που αποτελείται από ένα φύλο, χρησιμεύουν για την παραγωγή των ψαριών που δεν αναπαράγονται και προέρχονται από τριπλοϊδία.

Για πολλά τριπλοϊδή αρσενικά εξακολουθεί να υφίστανται σεξουαλική ωρίμανση, παράγοντας ανευπλοϊδή σπέρμα, ενώ τα θηλυκά άτομα δεν παρουσιάζουν αναπτυγμένες ωοθήκες. Επομένως η παραγωγή όλο-θηλυκών τριπλοϊδών, εξυπηρετεί σκοπούς περιορισμού για την καταστολή της γενετικής ωρίμανσης (Anonymous, 2009).

Τα αποτελέσματα των μελετών που προκύπτουν από την τριπλοϊδία στα ψάρια δείχνουν ότι θα πρέπει να ορίζονται οι βέλτιστες συνθήκες εκτροφής, ώστε να βελτιώνονται οι επιδόσεις και η επιβίωση των ατόμων. Η έμμεση αντιστροφή φύλου είναι μια τυπική και αποδεκτή μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια για την παραγωγή ενός πληθυσμού που αποτελείται από ένα φύλο (Pandian & Kirankumar, 2003; Piferrer, 2001 ; Taranger et al., 2009).

Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων X και Y από το σπέρμα είναι μια συνήθης πρακτική που χρησιμοποιείται για τη μαζική παραγωγή βοοειδών και στηρίζεται στη διαφορά που παρουσιάζει το περιεχόμενο DNA των X και Y σπερματοζωαρίων (Siedel & Garner, 2002 ; Joerg et al., 2004). Σε ότι αφορά τα εμπορικά είδη ψαριών είναι δύσκολο να διαχωριστεί το χρωμόσωμα X από το Y. Πρόσφατες μελέτες στα πλατύψαρα έδειξαν ότι δεν υπάρχουν ορατές μορφολογικές διαφορές μεταξύ των χρωμοσωμάτων X και Y (Azevedo et al., 2007 ; Ocalewicz et al., 2008b).

6. Συμπεράσματα

Η προώθηση της βιομηχανίας της υδατοκαλλιέργειας και η ανάπτυξη του εμπορίου των εδώδιμων ψαριών πραγματοποιείται μέσω της τεχνικής της διακοπής ή καθυστέρησης της γενετικής ωρίμανσης των ψαριών που εκτρέφονται. Η επίλυση του προβλήματος προϋποθέτει την εφαρμογή τριών βασικών στρατηγικών που πρέπει να εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιέργειες (Cowan et al., 2010). Οι τεχνικές που εφαρμόζονται με επιτυχία σήμερα, είναι η παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων, η τριπλοϊδία. Η διαχείριση της φωτοπεριόδου είναι μια νέα τεχνική που άρχισε να εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια, χωρίς να υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές. Η μέθοδος αυτή θα αποτελέσει το αντικείμενο μελέτης μελλοντικών ερευνών.

Η παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων αφορά στην παραγωγή ενός φύλου με άμεση ή με έμμεση αντιστροφή του φύλου ή μέσω της γυνογένεσης. Η τεχνική διαφοροποίησης των χρωμοσωμάτων στο σπέρμα είναι μια νέα διαδικασία η οποία έχει πλεονεκτήματα σε ότι αφορά στην τεχνική και πρακτική διαχείριση της μεθόδου και στο οικονομικό αποτέλεσμα (Cowan et al., 2010).

Συμπερασματικά φαίνεται, ότι:

- δεν υπάρχει ανιχνεύσιμη διαφορά μεταξύ του φύλου των σπερματοζωαρίων ανάμεσα στα διάφορα είδη ψαριών που μελετήθηκαν. Επομένως, φαίνεται ότι οι δυνατότητες που υπάρχουν για διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων του σπέρματος για την παραγωγή πληθυσμών ενός φύλου στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών περιορίζονται, σε μη βιώσιμα αποτελέσματα.
- η παραγωγή όλο-θηλυκών ατόμων απαιτεί επιστημονική γνώση καθώς και διαχείριση των τεχνικών που χρησιμοποιούνται ώστε να βελτιωθεί και να σταθεροποιηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Απώτερος στόχος είναι η βελτίωση της βιωσιμότητας και η αύξηση του κέρδους της υδατοκαλλιέργειας προκειμένου να εξασφαλιστεί και να παραχθεί ένα προϊόν το οποίο θα είναι υψηλών ποιοτικών προδιαγραφών και άμεσα διαθέσιμο στον καταναλωτή.
- Χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης 3 έως 4 mg/k είναι ασφαλές και αποτελεσματικό κόστος για την παραγωγή ατόμων με αρσενικά

χαρακτηριστικά (αρρενοποίηση) στον τροπικό μονομάχο. Μία μακρά περίοδο χορήγησης ναύπλιων artemia έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πυκνότητα των ψαριών και έχει ως αποτέλεσμα την παράταση της περιόδου παροχής διαμέσου στόματος. Οι τεχνικές ορμονικής διαχείρισης για συγκεκριμένες περιόδους είναι αναγκαίες για την αύξηση του ρυθμού επιβίωσης των απογόνων (Kiriouros et al., 2011).

7. Abstract

The technique of sex reversal in fish is a technique widely used in many countries and it is desirable process since females are mainly due to the faster growth and maturation of the gonads that are relative to males.

Production target of mono sex is the development of aquaculture and enhancement of production in populations consisting of one sex. In some cases the population consisting of a sheet may provide further environmental benefits. For example, in areas where there are endemic species of fish farming consists of one sex, which can be an excellent and effective method for consistent reproduction of fish.

The production of sex in a population may be applied to the fish species are sexually dimorphic, wherein the atom reaches commercial size Uncured genetically. The techniques applied for the production of a single-sex hormonal therapy, gynogenesis, chromosomal segregation sperm sterility of farmed organisms, the triploidy and genetic testing with the development of the genetic marker chromosome.

A feeding trial was conducted to examine the supplemental effects of three hormones- 17α -Methyltestosteron, 11β -hydroxyandrostenedione, 17^{α} Ethynyl-testosterone on sex reversal and growth performance of the fish.

Key Words: all female, sexual dimorphism, production methods of mono sex fish , gynogenesis, sex reversal.

8. Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Aktas, M., and Genc,A.M., (2011).The effect of 17 β -estradiol on growth, survival and Feminization of Green Tiger Shrimp, *P.semisulcatus* (Decapoda:Penaeidae). Journal of animal and Veterinary Advances 10(5):562-565.
- Anonymous., (2009). Production of All female Populations of Coho Salmon *Oncorhynchus kisutch*, using Y-Chromosomal DNA markers. Aquaculture Collaborative Research and Development Program (ACRDP) Fast sheet. Fisheries and Oceans., 3:1-4
- Arai, K., (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture. 197: 205-228.
- Atar,H.H., Beckan,S., and Dogankaya,L., (2009).Effects of different hormones on sex reversal of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum) and production of all-female populations. Biotechnol. & Biotechnol. Eq.,23(4):1509-1514.
- Azevedo, M. F. C., Oliveira, C., Pardo, B.G., Martinez, P. and Foresti, F. (2007) Cytogenetic charaterization of six species of flatfishes with comments to karyotype differentiation patterns in Pleuronectiformes (Teleostei). Journal of Fish Biology **70**, 1-15.
- Balon, E.K. (1995). The common carp, *Cyprinus Carpio*: Its wild origin, domestication in aquaculture, and selection as colored nishikigoi.Guelph Ich. Rev.,3 : 1-55.
- Bartley, D.M. and Hallerman, E.M. (1995). A global perspective on the utilization of genetically modified organisms in aquaculture and fisheries. Aquaculture, 137: 1-8.
- Bartley,D.M., (1998). Genetics and breeding in aquaculture: current status and trends, CHIEN-Option Mediterraneennes.,eds: DM Bartley and B.Basurco., pp13-30.
- Benfey, T. J. (1999) The physiology and behaviour of triploid fishes. Reviews in Fisheries Sciences **7**, 38-67.
- Benfey, T. J. (2001) Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. ICES Journal of Marine Science **58**, 525-529.

- Benzie, J.A.H., Kenway, M., Ballment, E., Frusher, S. and Trstt, L. (1995). Interspecific hybridization of the tiger prawns *Peneaus monodon* and *Penaeus esculentus*. *Aquaculture*, 133: 103-111.
- Billard, R., (1989). Endocrinology and fish culture. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 49–58.
- Byamungu, N., Darras, V. M. and Kuhn, E. R. (2001) Growth of heat-shock induced triploids of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in tanks and in ponds in Eastern Congo: feeding regimes and compensatory growth response of triploid females. *Aquaculture* **198**, 109-122.
- Bye, V. J. & Lincoln, R. F. (1986) Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* **57**, 299-309.
- Bye, V.J. and Lincoln, R.F. (1986). Commercial methods for the control of, sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 57: 299-309.
- Campton, D.E. (1995). Genetic effects of hatchery fish on wild populations of Pacific salmon and steelhead: What do we really know? In: *Uses and Effects of Cultured Fishes in Aquatic Ecosystems*, Schramm, H.L. and Piper, R.G. (eds), American Fisheries Society Symposium 15, Bethesda, MD, pp. 337-353.
- Cowan, M., Migaud, H., Davie, A. (2010) Research and development of stock management in ongrowing of marine fish. Published by the: Scottish Aquaculture Research Forum (SARF) pp 100. ISBN: 978-1-907266-35-5.
- Danzmann, R.G. and Ferguson, M.M. (1995). Heterogeneity in the body size of Ontario cultured rainbow trout with different mitochondrial DNA haplotypes. *Aquaculture*, 137: 231 -244.
- Danzmann, R.G. and Ferguson, M.M. (1995). Heterogeneity in the body size of Ontario cultured rainbow trout with different mitochondrial DNA haplotypes. *Aquaculture*, 137:231-244.
- Devlin, B.H., Yesakl, T.Y., Blagl, E.A. and Donaldson, E.M. (1994). Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209-210.
- Devlin, B.H., Yesakl, T.Y., Blagl, E.A. and Donaldson, E.M. (1994). Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371:209-210.
- Donaldson, E.M., Devlin, R.H., Piferrer, F and Solar, L.I., (1996). Hormones and sex control in Fish with Particular Empasis on Salmon. *Asian Fisheries Science*. 9:1-8.

- Dunham, R.A. (1995). The Contribution of Genetically Improved Aquatic Organisms to Global Food Security. Thematic paper presented to the Japan/FAO International Conference on Sustainable Contribution of Fisheries to Food Security, 4-9 December, Kyoto, Japan.
- Dunham, R.A., 1990. Production and use of monosex or sterile fishes in aquaculture. *Rev. Aquat. Sci.* 2:1-17.
- Eknath, A., Tayamen, M.M., Palada de Vera, M.S., Danting, J.C., Reyes, R.A., Dionisio, E.E., Capili, J.B., Bolivar, J.L., Abella, T.A., Circa, A.V., Bensten, H.B., Gjerde, B., Gjedrem, T., and Pullin, R.S.V.P. (1993). Genetic improvement of farmed tilapia: The growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments *Aquaculture*, 111:171-188.
- Eknath, A.E., Bentsen, H.B., Gjerde, B., Tayamen, M.M., Abella, T.A., Gjedrem, T., and Pullin, R.S.V.P. (1991). Approaches to national fish breeding programs: Pointers from a tilapia study. *NAGA the ICLARM Quarterly*, April, 199: 10-12.
- Falconer, D.S. (1981). *Introduction to Quantitative Genetics*, 2nd ed. Longman, London.
- Falconer, D.S. (1981). *Introduction to Quantitative Genetics*, 2nd ed. Longman, London.
- Fitzpatrick, M. S., Contreras-Sanchez, W. M., Milston, R. H., Lucero, M., Feist, G. W. and Schreck, C. B. (1998) Steroid Immersion for Masculinization of Tilapia. *PD/A CRSP Fifteenth Annual Technical Report*, 7-12.
- Fitzpatrick, M. S., Contreras-Sanchez, W. M., Milston, R. H., Lucero, M., Feist, G. W. and Schreck, C. B. (1999) Steroid Immersion for Masculinization of Tilapia: Immersion of Tilapia Fry in MDHT. *PD/A CRSP Sixteenth Annual Technical Report*, 73-74.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1997). *Aquaculture Development*. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries, No. 5. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Gale, W. L., Fitzpatrick, M. S. and Schreck, C. B. (1996) Masculinization of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) through Immersion in 17-Methyltestosterone or 17-Methyldihydrotestosterone. *PD/A CRSP Thirteenth Annual Technical Report*, 96-100.

- Garner, D. L. (2001) Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals. *Journal of Andrology* **22**, 519-526.
- Gullu, K., Guzel,S., Guner,Y., (2005). Effect of Estradiol Valerate Applied by Immersion and Oral Administration on Growth and Sex Reversal of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biotechnology* 4(3):202-205.
- Guo, X., DeBrosse, G.A. and Allen, S.K. (1996). All-triploid oysters (*Crassostrea gigas Thunberg*) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142:149-161.
- gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* **189**, 23-37.
- Hamaguchi,S., Toyazaki, Y., Shinomiya,Ai., and Mitsuru,S., (2004). The XX-XY sex determination system in *Ozuriaws luzonensis* and *O. mekongensis* Revealed by the sex ratio of the progeny of sex-reversal Fish. *Zoological Science.*, 21:1015-1018.
- Hendry, C. I., Martin-Robichaud, D. J. and Benfey, T. J. (2002) Gonadal sex differentiation in Atlantic halibut. *Journal of Fish Biology* **60**, 1431-1442.
- Hendry, C. I., Martin-Robichaud, D. J. and Benfey, T. J. (2003) Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **219**, 769-781.
- Hershberger, W.K., Myers, J.M., Iwamoto, R.N., Mcauley, W.C. and Saxton, A.M.(1990). Genetic changes in the growth of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in marine net-pens, produced by ten years of selection. *Aquaculture*, 85:187-197.
- Hindar, K., Ryman, N. & Utter, F. (1991). Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 945-957.
- Hossain,Z.,Rahman,M., and Afrui,S., (2002). Effects of different levels of Estradiol-17 β on growth, Survival and sex ratio of African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5(3):355-358.
- Hulata, G. (1995). The history and current status of aquaculture genetics in Israel. *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh*, 47: 142-154.
- Hunter, G.A., Donaldson, E.M., Stoss, J., Baker, I., (1983). Production of monosex female groups of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. *Aquaculture* 33: 355-364.

- Hussain, M. G., Rao, G.P.S., Humayun, N.M., Randall, C.F., Penman, D.J., Kime, D., Bromage, N.R., Myers, J.M. and McAndrew, B.J. (1995). Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 138:87-97.
- Imsland, A. K. & Jonassen, T. M. (2005) The relation between age at first maturity and growth in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) reared at four different light regimes. *Aquaculture Research* **36**, 1-7.
- Joerg H., Asai M., Graphodatskaya D., Janett F. and Stranzinger G. (2004) Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **121**, 209-215.
- Kipouros, K., Paschos, I., Gouva, E., Ergolavou, A., Perdikaris, C., (2011). Masculinization of the ornamental Siamese fighting fish with oral hormonal administration. *Science Asia* 37:277-280.
- Kirpichnicov, V.S. (1981). *Genetic Basis of Fish Selection*. Springer-Verlag, Berlin.
- Komen, J., Lodder, P.A.J. and Huskens F., (1989). Effects of oral administration of 17 alpha-methyltestosterone and 17 beta-estradiol on gonadal development in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 78:349-363.
- Kwon, J. Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L. M., McAndrew, B. J. and Penman, D. J. (2000) Masculinization of Genetic Female Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Dietary Administration of an Aromatase Inhibitor During Sexual Differentiation. *Journal of Experimental Zoology* **287**, 46-53.
- Liu, Y., (1993). *Propagation Physiology of Main Cultivated Fish in Chi-na*. Beijing, China: Agricultural Publishing House.
- Lourdes, M., Cuvin-Aralar, A. and Aralar, E.V. (1995). Resistance to heavy metal mixture in *Oreochromis niloticus* progenies of parents chronically exposed to the same metals. *Aquaculture*, 137: 271 -284
- Lourdes, M., Cuvin-Aralar, A. and Aralar, E.V. (1995). Resistance to heavy metal mixture in *Oreochromis niloticus* progenies of parents chronically exposed to the same metals. *Aquaculture*, 137:271-284.
- Mair, G.C. (1993). Chromosome-set manipulation in tilapia - Techniques, problems and prospects. *Aquaculture*, 111: 227-244.
- Mair, G.C., Abucay, J.S., Beardmore, J.A. and Skibinski, D.O.F. (1995). Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY-males in

- L.:On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture*, 137: 313-342.
- Malison, J. A. & Garcia-Abiado, M. A. R. (1996) Sex control and ploidy manipulations in yellow perch (*Perca flavescens*) and walleye (*Stizostedion vitreum*). *Journal of Applied Ichthyology* **12**, 189-194.
- Matsuda, M., Kusama, T., Oshiro, T., Kurihara, Y., Hamaguchi, S., Saikazumi, M. (1997). Isolation of sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. *Genes Genet Syst.* 72:263-268.
- Matsuda, M., Matsuda, C., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. (1998). Identification of the sex of sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 82:257-262.
- Matsuda, M., Kawato, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Nagahama, Y., Hamaguchi, S.,
- Maxime, V. (2008) The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries* **9**, 67-78.
- McGeachy, S. A., Benfey, T. J. and Friars, G. W. (1995) Freshwater performance of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) in New Brunswick aquaculture. *Aquaculture* **137**, 333-341.
- Murata, O., Harada, T., Miyashita, S., Izumi, K., Maeda, S., Kato, K. and Kumai, H. (1996). Selective breeding for growth in red sea bream. *Fish. Sci.*, 62: 845-849.
- Murata, O., Harada, T., Miyashita, S., Izumi, K., Maeda, S., Kato, K. and Kumai, H. (1996). Selective breeding for growth in red sea bream. *Fish. Sci.*, 62: 845-849.
- Nell, J.A., Cox, E., Smith, I.R. and Maguire, G.B. (1994). Studies on triploid oysters in Australia. 1. The farming potential of triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquaculture*, 126: 243-255.
- Ocalewicz K., Fopp-Bayat D., Woznicki P. & Jankun M. (2008a) Heteromorphic sex chromosomes in the nine-spine stickleback *Pungitius pungitius*. *Journal of Fish Biology* **73**, 456-462.
- Ocalewicz K., Penman D.J. & Babiak I. (2008b) Variation in size and location of the AgNOR in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Genetica* **133**, 261-267.

- Pandian T.J. and Kirankumar, S. (2003) Recent advances in hormonal induction of sex reversal in fish. *Journal of Applied Aquaculture* **13**, 205-230.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138:1–22.
- Patino, R., (1997). Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *Prog. Fish Cult.* 59:118–128.
- Peruzzi, S. & Chatain, B. (2000) Pressure and cold shock induction of meiotic
- Piferrer, F. (2001) Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* **197**, 229-281.
- Piferrer, F., (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*. 197: 229– 281.
- Piferrer, F., (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197:229-281.
- Piferrer, F., Cal R.C., Gomez C., Bouzza ., Martinez P. (2003) Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture* **220**, 821-831.
- Pongthana, N., Penman, D. J., Baoprasertkul, P., Hussain, M. G., Islam, M. S., Powell, S. F. and McAndrew, B. J. (1999) Monosex female production in the silver barb (*Puntius gonionotus* Bleeker). *Aquaculture* **173**, 247-256.
- Pottinger, T.G., Moran, T.A. and Morgan, J.A.W. (1995). Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low responsiveness to stress. *J. Fish Bol.*, 44: 149-163.
- Rens W., Welch G.R. and Lawrence A.J. (1999) Improved flow cytometric sorting of X- and Y bearing sperm: substantial increase in yield of sexed semen. *Molecular Reproduction and Development* **52**, 50-56.
- Rougeot, C., Minet, I., Prignon, C., Vanderplasschen, A., Detry, B., Pastoret, P. and Melard, C. (2003) Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources* **16**, 90-94.
- Saikazumi, M., (2001). Construction of BAC library derived from the inbred Hd-rR strain of the teleost fish *Ozyrias latipes*. *Genes Genet Syst.* 76:61-63.
- Schreck, C.B., (1974). Hormonal treatment and sex manipulation in fishes. In: Schreck, C.B. Ed., *Control of Sex in Fishes*. Virginia Polytechnic Institute and State University Sea Grant Program, pp. 84–106.

- Seidel Jr G.E. (2009) Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology, and biology. *Animal Reproduction Science* **79**, 145-156.
- Seidel Jr G.E. and Garner D.L. (2002) Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* **124**, 733-743.
- Shelton, W.L., Hopkins, K.D., and Jensen, G.L.,(1978). Use of hormones to produce monosex Tilapia for aquaculture. In: Smitherman RO, Shelton WL and Grover JH, eds. Culture of exotic fishes symposium proceedings Fish Culture Section. Auburn, Alabama, USA: American Fisheries Society.pp10-33.
- Sugama, K., Taniguchi, N. and Seki, S. (1992). Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temminck et Schlegel): Use of allozyme markers of ploidy and family identification. *Aqua. fish. Manag.*, 23:149-159.
- Sugama, K.,Taniguchi, N. and Seki, S. (1992). Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temminck et Schlegel): Use of allozyme markers of ploidy and family identification. *Aqua. fish. Manag.*, 23:149-159.
- Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, D.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T. (2009) Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology* **165** (3), 483-515.
- Tave, D. (1995). Selective Breeding Programmes for Medium-sized Fish Farms. *FAO Fisheries Technical Paper* 352. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Taylor, J. F., Needham, M. P., North, B. P., Morgan, A., Thompson, K. and Migaud, H. (2007) The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* **152**, 314-325.
- Tiwary, B. K., Kirubakaran, R. and Ray, A. K. (2004) The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **14**, 391-402.
- Toro, J.E., Aguila, P. and Vergara, A.M. (1996). Spatial variation in response to selection for live weight and shell length from data on individually tagged Chilean native oysters (*Ostrea chilensis* Philippi, 1845). *Aquaculture*, 146: 27-36.

- Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J., McGowan, C. and Reith, M. (2006) Gynogenesis and sex determination in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 252, 573-583.
- Wassermann, G. J. & Afonso, L. O. B. (2003) Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research* 34, 65-71.
- Welcomme, R.L. (1988). International Introductions of Inland Aquatic Species. FAO Fisheries Technical Paper 294. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Wilkins, N.P., Gosling, E., Curatolo, A., Linnane, A., Jordan, C., Courtney, H.P.(1995). Fluctuating asymmetry in Atlantic salmon, European trout and their hybrids, including triploids. *Aquaculture*, 137: 77-85.
- Withler, R. E., Beacham, T. D., Solar, I. and Donaldson, E. M. (1995). Freshwater growth, smolting, and maine survival and growth of diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 136: 91-107.
- Yamazaki, F., (1983). Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33: 329–354.
- Zanuy, S., Carrillo, M., Felip, A., Rodriguez, L., Blazquez, M., Ramos, J. and Piferrer, F. (2001) Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 202, 187-203.
- Zhang, Q., & Arai, K.,(1996). Flow cytometric DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach *Fish Sci.* 62:870-877.

2. Διαδικτυακή βιβλιογραφία

www.plosgenetics.org)