

Αναστροφή φύλου και θηλυκοποίηση της τσιπούρας (*Sparus aurata*) ηλικίας 2+ ετών μετά από θεραπεία εμφυτευμάτων 17β- οιστραδιόλης

Κατερίνα Σαμιωτάκη

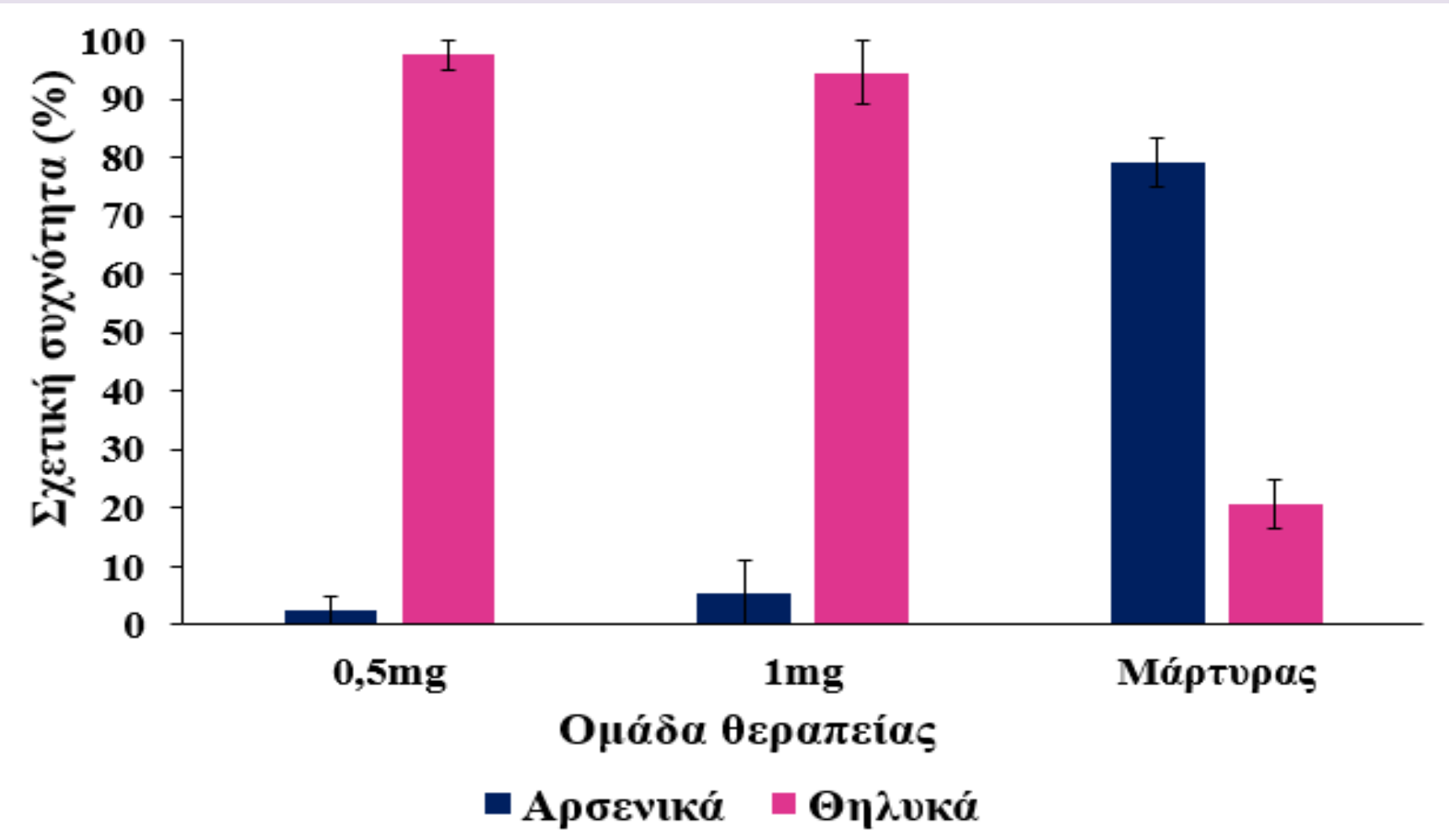
Επιβλέπων: Μιχαήλ Παυλίδης

Υλικά και Μέθοδοι

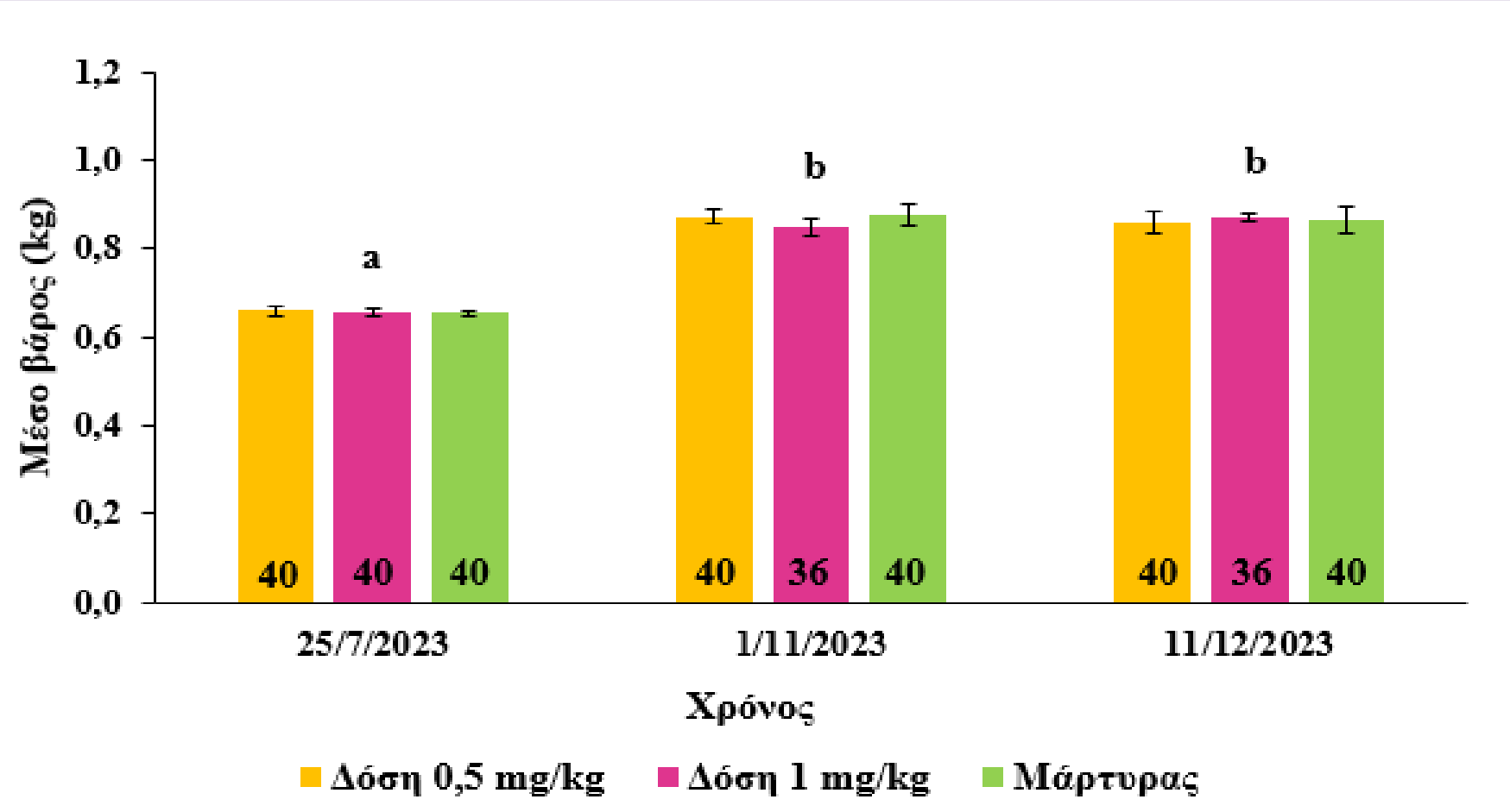
Κατά το πείραμα εφαρμογής της θεραπείας E2 σε τσιπούρες ηλικίας 2+ ετών, χρησιμοποιήθηκαν εμφυτεύματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης (EVAc). Η θεραπεία ξεκίνησε στις 25/7/2023 με τη χρήση δύο δόσεων (0,5 και 1 mg kg⁻¹) και τα ψάρια υποβλήθηκαν σε τρίμηνη θεραπεία εμφυτευμάτων (κάθε 28 ημέρες). Τρεις μήνες μετά τη χορήγηση του πρώτου εμφυτεύματος (1/11/2023) έγινε ενδιάμεση δειγματοληψία για τον προσδιορισμό της αύξησης του σωματικού βάρους. Κατά την τελική δειγματοληψία (11/12/2023) εξετάστηκαν ένα προς ένα όλα τα άτομα ως προς την αναστροφή φύλου μακροσκοπικά και ιστολογικά και το σωματικό τους βάρος. Έπειτα, επιλέχθηκαν ανεστραμμένα θηλυκά άτομα που είχαν ωθήκες με ωοκύτταρα τουλάχιστον στο στάδιο της λεκιθογένεσης για την διαμόρφωση των αναπαραγωγικών αποθεμάτων, στα οποία προστέθηκαν αρσενικές τσιπούρες ηλικίας 2 ετών για την καθημερινή παρακολούθηση της παραγωγής των αυγών και τον υπολογισμό της γονιμότητας και του ποσοστού γονιμοποίησης. Η εκτίμηση της ποιότητας των αυγών (εμβρυική επιβίωση στις 24h, εκκόλαψη και νυμφική επιβίωση την 5^η ημέρα μετά την συλλογή) πραγματοποιήθηκε μέσω της παρακολούθησης 96 αυγών σε βοθρία πλακών μικροτιτλοδότησης σε επωαστήρα για 3 επαναλήψεις για κάθε δεξαμενή ωοτοκίας.

Αποτελέσματα

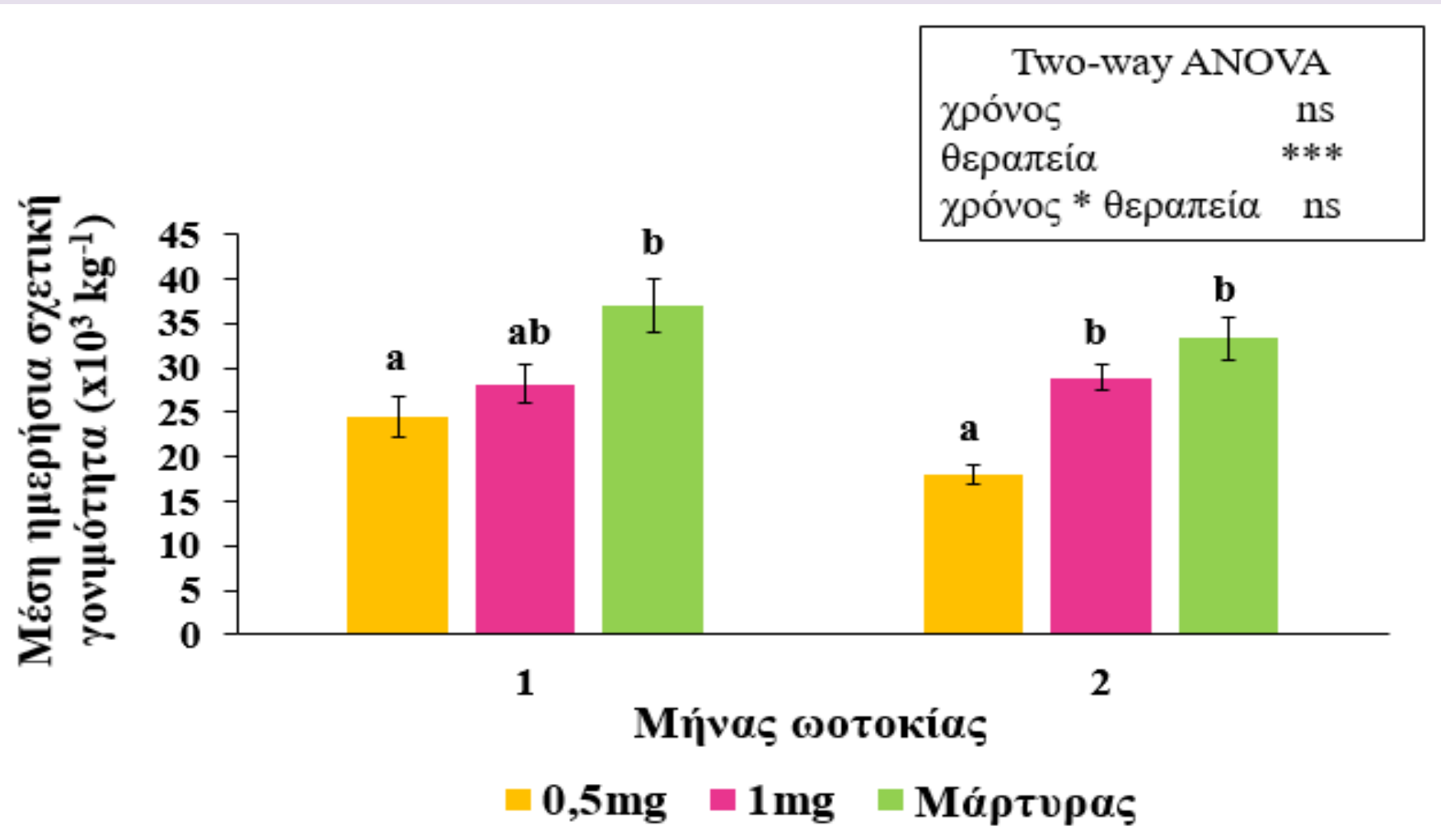
- Η ορμονική επαγωγή της αναστροφής φύλου οδήγησε σε θηλυκοποίηση του 97,5 ± 2,5 % και 94,5 ± 5,5 % του πληθυσμού στις ομάδες θεραπείας 0,5 και 1 mg kg⁻¹ αντίστοιχα ενώ στο μάρτυρα ήταν 20,8 ± 4,2 % (Εικόνα 2). Τα θηλυκά άτομα που προέκυψαν είχαν ωθήκες αποτελούμενες από πρωτογενή ωοκύτταρα (po) έως ωθηλακιορρηκτικά (OV) (Εικόνα 1.A), ενώ όλα τα αρσενικά άτομα ήταν ώριμα σπερμαάζοντα (Εικόνα 1.B).
- Το μέσο σωματικό βάρος των ατόμων ανά ομάδα θεραπείας, δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες θεραπείας (two-way ANOVA, Tukey HSD, P<0,001) (Εικόνα 3).
- Οι τιμές της μέσης ημερήσιας σχετικής γονιμότητας και για τους δύο μήνες ωοτοκίας στην ομάδα με θηλυκά της δόσης 0,5 mg kg⁻¹ ήταν μικρότερες σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα (two-way ANOVA, Tukey HSD, P<0,001) (Εικόνα 4)
- Τα ανεστραμμένα θηλυκά άτομα από τις θεραπείες E2 παρήγαγαν καθημερινά αυγά κατά την διάρκεια τις αναπαραγωγικής περιόδου που δεν διέφεραν ποιοτικά από τα αυγά της ομάδας του μάρτυρα (Kruskal-Wallis, P>0,05).



Εικόνα 2. Μέσος όρος (± SEM) σχετικής συχνότητας αρσενικών και θηλυκών τσιπούρων 3 ετών σε κάθε ομάδα θεραπείας E2 κατά την τελική δειγματοληψία (11/12/2023) μετά από μακροσκοπική αξιολόγηση



Εικόνα 3. Μέσο (± SEM) σωματικό βάρος (kg) των ατόμων τσιπούρας από κάθε ομάδα θεραπείας πριν από την έναρξη (25/7/2023) κατά την ενδιάμεση (1/11/2023) και την τελική δειγματοληψία (11/12/2023) του πειράματος (two-way ANOVA, Tukey's HSD, P < 0,001). Πάνω στις μπάρες αναγράφεται ο αριθμός των ατόμων ανά ομάδα θεραπείας. Οι διαφορές οφείλονται στις θνησιμότητες.



Εικόνα 4. Μέση (± SEM) ημερήσια σχετική γονιμότητα (μπάρες, ×10³ αυγά kg⁻¹) για κάθε μήνα (μήνας 1: 13/12/2023 έως 13/1/2024 και μήνας 2: 14/1/2024 έως 14/2/2024) για τις ομάδες ωοτοκίας. Με λατινικούς χαρακτήρες απεικονίζονται οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες ωοτοκίας ξεχωριστά για τους δύο μήνες. (two-way ANOVA, Tukey's HSD, P < 0,001).

Συζήτηση

- Η θεραπεία με E2 προκάλεσε θηλυκοποίηση και ανάπτυξη τη ωθήκης σε τσιπούρες 2+ ετών.
- Δεν προέκυψαν θνησιμότητες στην ομάδα θεραπείας 0,5 mg kg⁻¹, και η τρίμηνη χορήγηση εμφυτευμάτων E2 δεν είχε επίδραση στον ρυθμό αύξησης σωματικού βάρους.
- Τα θηλυκά άτομα ηλικίας 3 ετών που ανέστρεψαν το φύλο τους έπειτα από θεραπεία με E2 ήταν ικανά για αναπαραγωγή και τα αυγά δεν διέφεραν ποιοτικά από τα αυτά του μάρτυρα.

Συμπεράσματα

Με βάση το μέγιστο ποσοστό θηλυκοποίησης, τις μηδενικές θνησιμότητες και την ικανότητα παραγωγής αυγών, για την παραγωγή θηλυκών ατόμων τσιπούρας 3 ετών προτείνεται η εφαρμογή τρίμηνης (κάθε 28 ημέρες) θεραπείας με εμφυτεύματα E2 δόσης 0,5 mg kg⁻¹, ξεκινώντας από το καλοκαίρι. Για την βελτίωση της παραγωγής των αυγών συνίσταται η διαμόρφωση των αναπαραγωγικών αποθεμάτων με την προσθήκη αρσενικών ατόμων μικρότερης ηλικίας (2 ετών) αμέσως μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας με E2.

Περίληψη

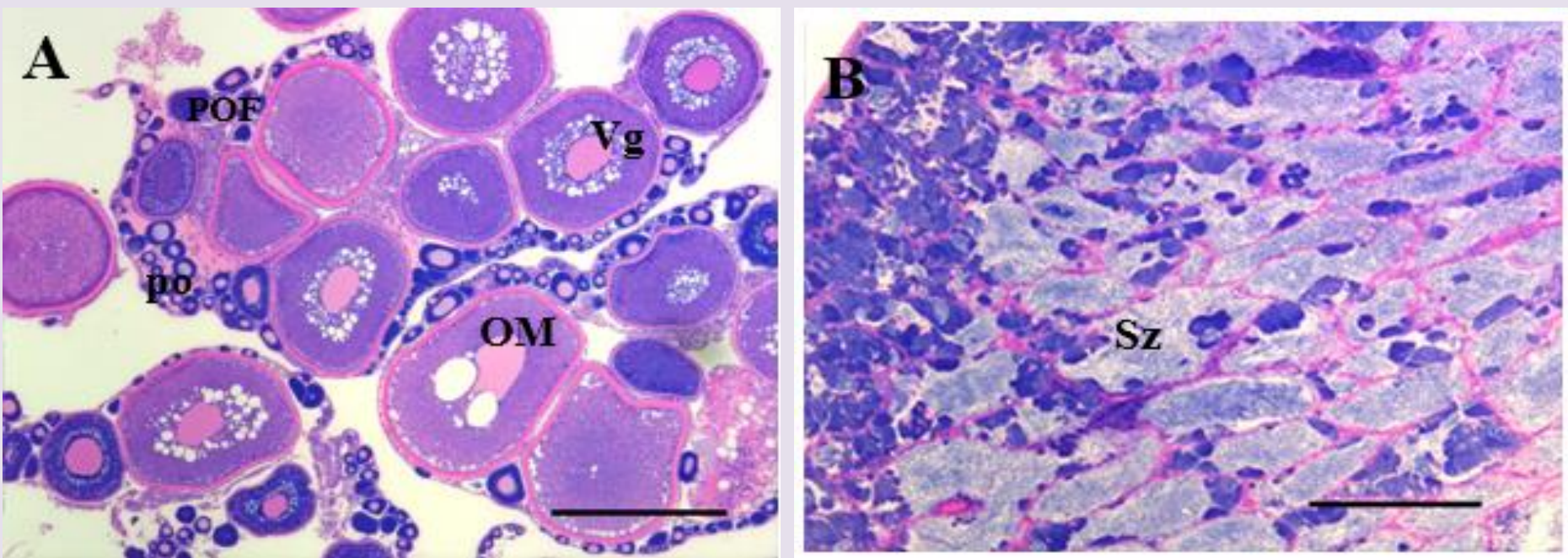
Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα από τα κυριότερα είδη υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο και παρουσιάζει πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό, με περίπου 15 - 80 % των αρσενικών ατόμων να μετατρέπεται σε θηλυκά μετά τα 2 έτη ζωής, αφού πρώτα αναπαραχθούν σαν αρσενικά. Έτσι, δεν είναι γνωστό εάν ένα αρσενικό 2+ ετών θα αναπαραχθεί σαν αρσενικό ή θηλυκό στην επόμενη αναπαραγωγική περίοδο (3 ετών). Για την επιβεβαίωση του φύλου των γεννητόρων που επιλέγονται να συμμετάσχουν σε προγράμματα γενετικής επιλογής είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μιας μεθόδου επαγωγής 100% θηλυκοποίησης αφού τα επιλεγμένα για θηλυκά 3 ετών δεν επιτρέπεται να αναπαραχθούν με τα συγγενικά τους μη αναστρέψιμα αρσενικά 3 ετών. Χρησιμοποιήθηκαν εμφυτεύματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης 17β-οιστραδιόλης (E2) για τρεις μηνιαίες χορηγήσεις σε τσιπούρες ηλικίας 2+ ετών σε 3 ομάδες (n = 40), μάρτυρα και δύο δόσεις E2 (0,5 και 1 mg kg⁻¹). Το ποσοστό θηλυκών στις θεραπείες με 0,5 και 1 mg kg⁻¹ ήταν 97,5 ± 2,5 % και 94,5 ± 5,5 % αντίστοιχα ενώ στο μάρτυρα ήταν 20,8 ± 4,2 %. Θνησιμότητες παρατηρήθηκαν μόνο στην ομάδα θεραπείας E2 1mg kg⁻¹ (10%) ενώ η E2 δεν είχε αρνητική επίδραση στο ρυθμό αύξησης σωματικού βάρους. Τα ανεστραμμένα θηλυκά άτομα από τις θεραπείες E2 παρήγαγαν καθημερινά αυγά κατά την διάρκεια τις αναπαραγωγικής περιόδου που δεν διέφεραν ποιοτικά από τα αυγά της ομάδας του μάρτυρα ωστόσο οι τιμές της μέσης ημερήσιας σχετικής γονιμότητας και για τους δύο μήνες ωοτοκίας ήταν μικρότερες σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Με βάση το μέγιστο ποσοστό θηλυκοποίησης, την μηδενική πρόκληση θνησιμότητας και την ικανότητα παραγωγής αυγών η παρούσα μελέτη προτείνει ότι η θεραπεία 3 εμφυτευμάτων με δόση 0,5 mg kg⁻¹ είναι η βέλτιστη για την επαγωγή μέγιστης θηλυκοποίησης σε τσιπούρες 3 ετών.

Εισαγωγή

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο, με το 15-80% των λειτουργικών αρσενικών να μετατρέπονται σε θηλυκά για πρώτη φορά στα 3 έτη ζωής. Στα προγράμματα γενετικής επιλογής, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το φύλο ενός ατόμου κατά τη στιγμή της εκτίμησης της αναπαραγωγής αξίας και της επιλογής του για να συμβάλει στον επόμενο κύκλο επιλεγμένων διασταυρώσεων. Στην τσιπούρα, η αβεβαιότητα ως προς το φαινοτυπικό φύλο των ψαριών κατά τον αναμενόμενο χρόνο αναπαραγωγής και η αποτυχία ενός ατόμου να εξελιχθεί ως θηλυκό, απαιτεί περαιτέρω διαχείριση του πληθυσμού και απομάκρυνση των ψαριών από το απόθεμα αναπαραγωγής.

Στόχος

Η παρούσα μελέτη αποσκοπούσε στην ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα εξασφαλίσει ότι όλες οι τσιπούρες 3 ετών θα είναι λειτουργικά θηλυκά, χρησιμοποιώντας βραχυπρόθεσμη θεραπεία με 17β-οιστραδιόλη (E2). Για την επίτευξη του στόχου αρχικά προσδιορίστηκε η βέλτιστη δόση και ο χρόνος χορήγησης της E2 σε τσιπούρες ηλικίας 1+ έτους και στην συνέχεια η θεραπεία εφαρμόστηκε και βελτιστοποιήθηκε σε τσιπούρες 2+ ετών.



Εικόνα 1. Α. Ιστολογική φωτογραφία από θηλυκή ωθήκη τσιπούρας 3 ετών κατά την τελική δειγματοληψία. Απεικόνιση πρωτογενών ωοκυττάρων (po), ωοκυττάρων σε λεκιθογένεση (Vg), σε φάση ωρίμανσης (OM) και μετα ωοθηλακιορρηκτικών σωματίων (POFs). **Β.** Ιστολογική φωτογραφία από ώριμο όρχι (παρουσία σπέρματος, Sz) αρσενικής τσιπούρας 3 ετών κατά την τελική δειγματοληψία