

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

Κατερίνα Σαμιωτάκη
Επιβλέπων: Μιχαήλ Παυλίδης

Εισαγωγή

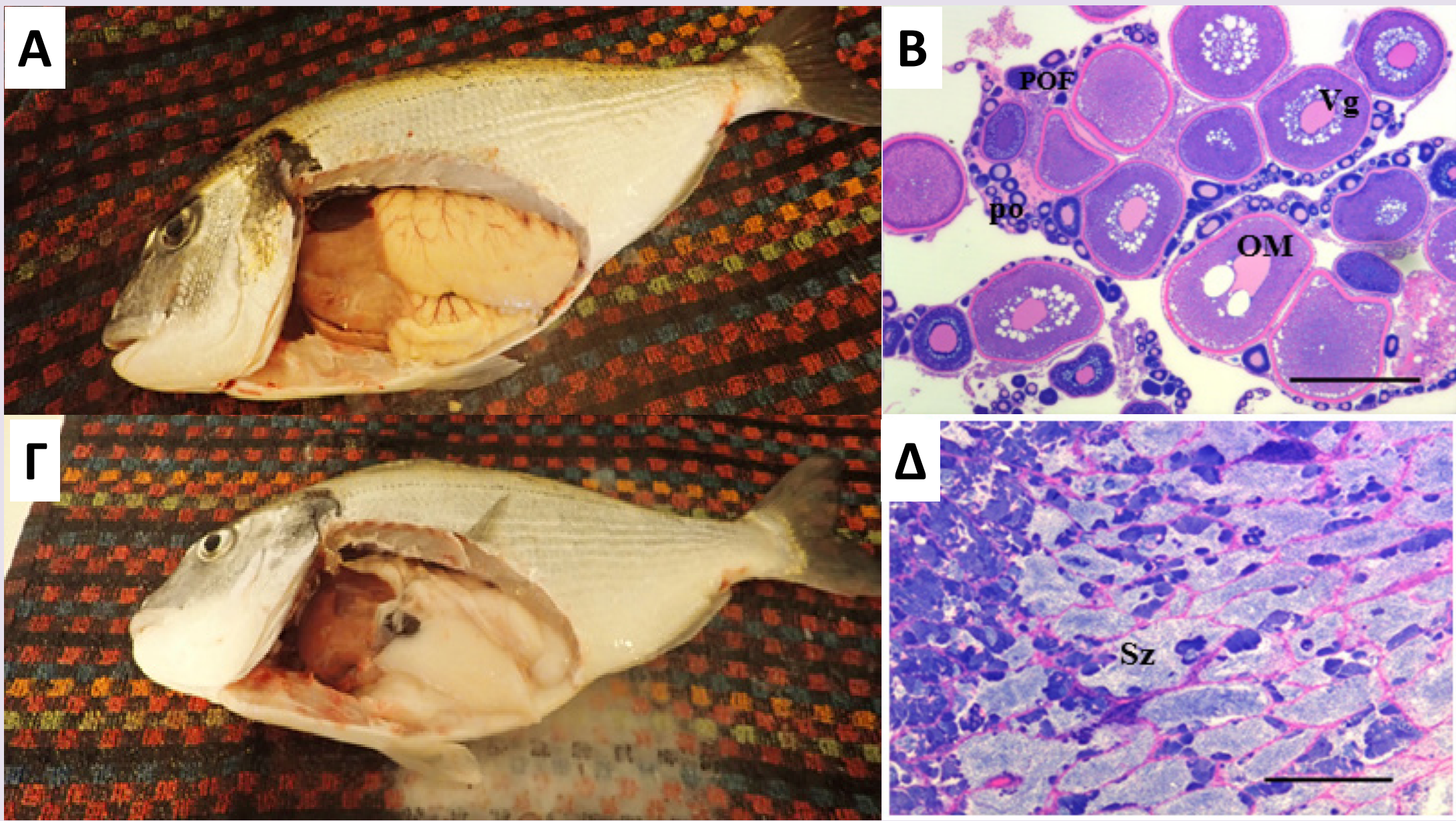
Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο, με το 15-80% των λειτουργικών αρσενικών να μετατρέπονται σε θηλυκά για πρώτη φορά στα 3 έτη ζωής. Στα προγράμματα γενετικής επιλογής, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το φύλο ενός ατόμου κατά τη στιγμή της εκτίμησης της αναπαραγωγής αξίας και της 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

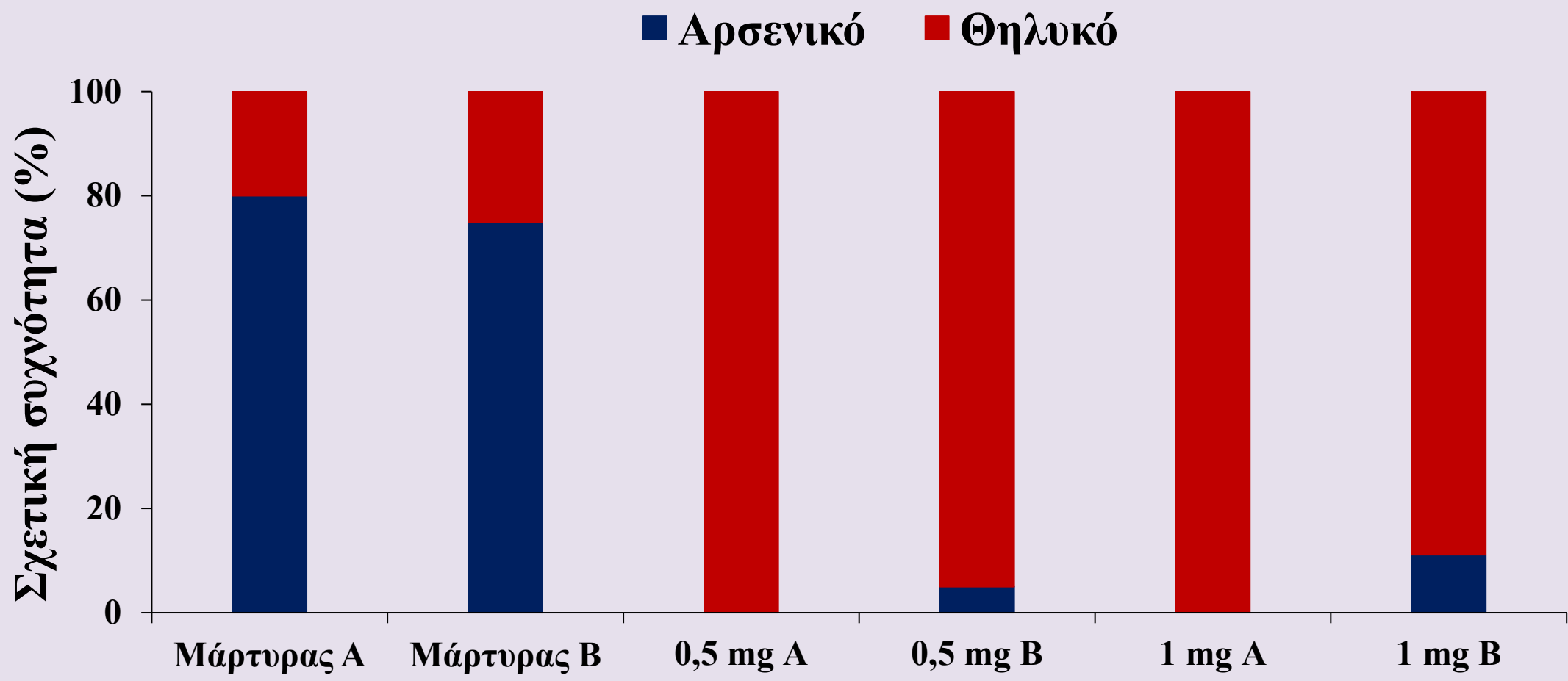
Η παρούσα μελέτη αποσκοπούσε στην ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα εξασφαλίσει ότι όλες οι τσιπούρες 3 ετών θα είναι λειτουργικά θηλυκά, χρησιμοποιώντας βραχυπρόθεσμη θεραπεία με 17β-οιστραδιόλη (E2). Για την επίτευξη του στόχου αρχικά προσδιορίστηκε η βέλτιστη δόση και ο χρόνος χορήγησης της E2 σε τσιπούρες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

Υλικά και Μέθοδοι

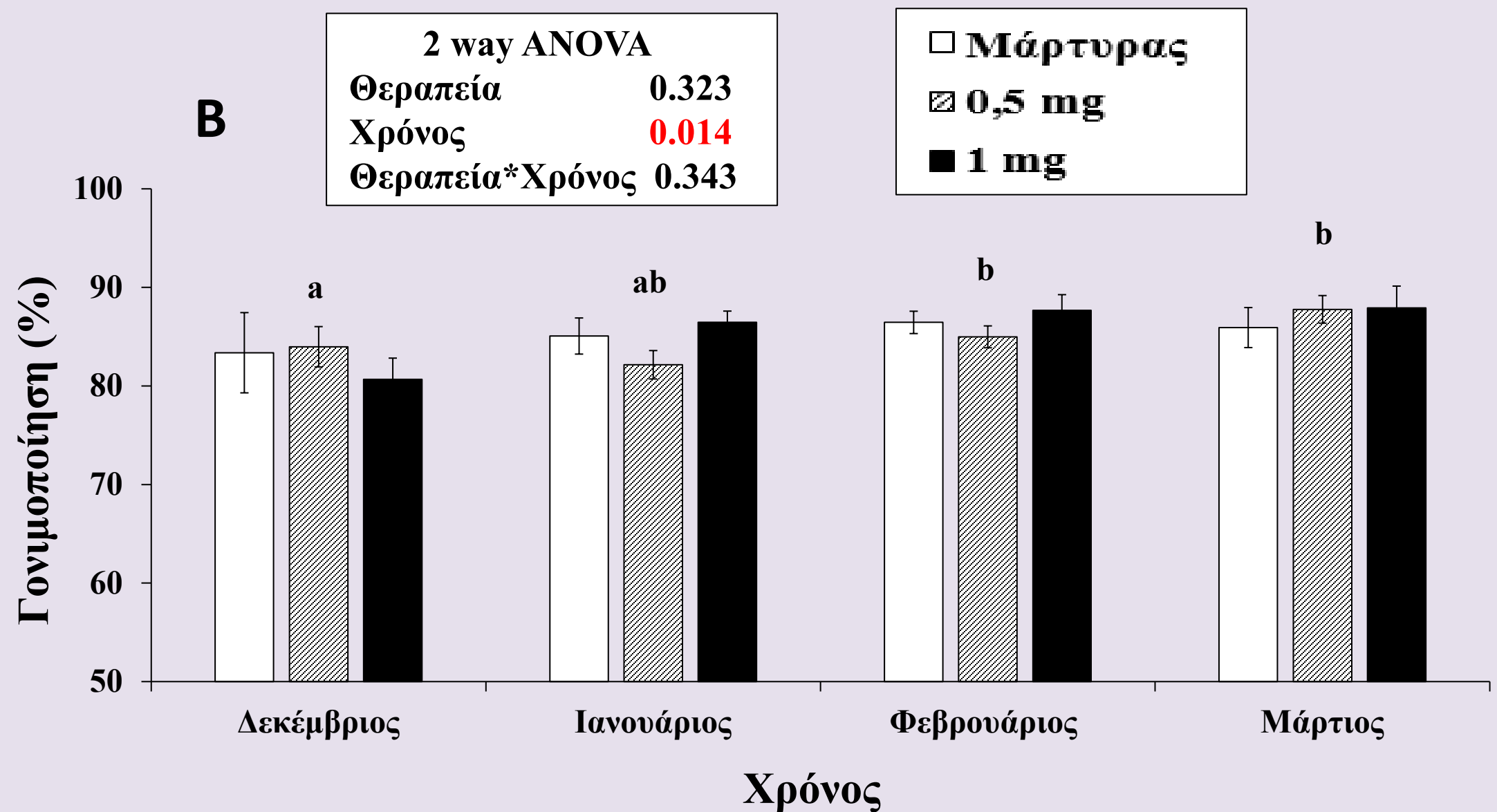
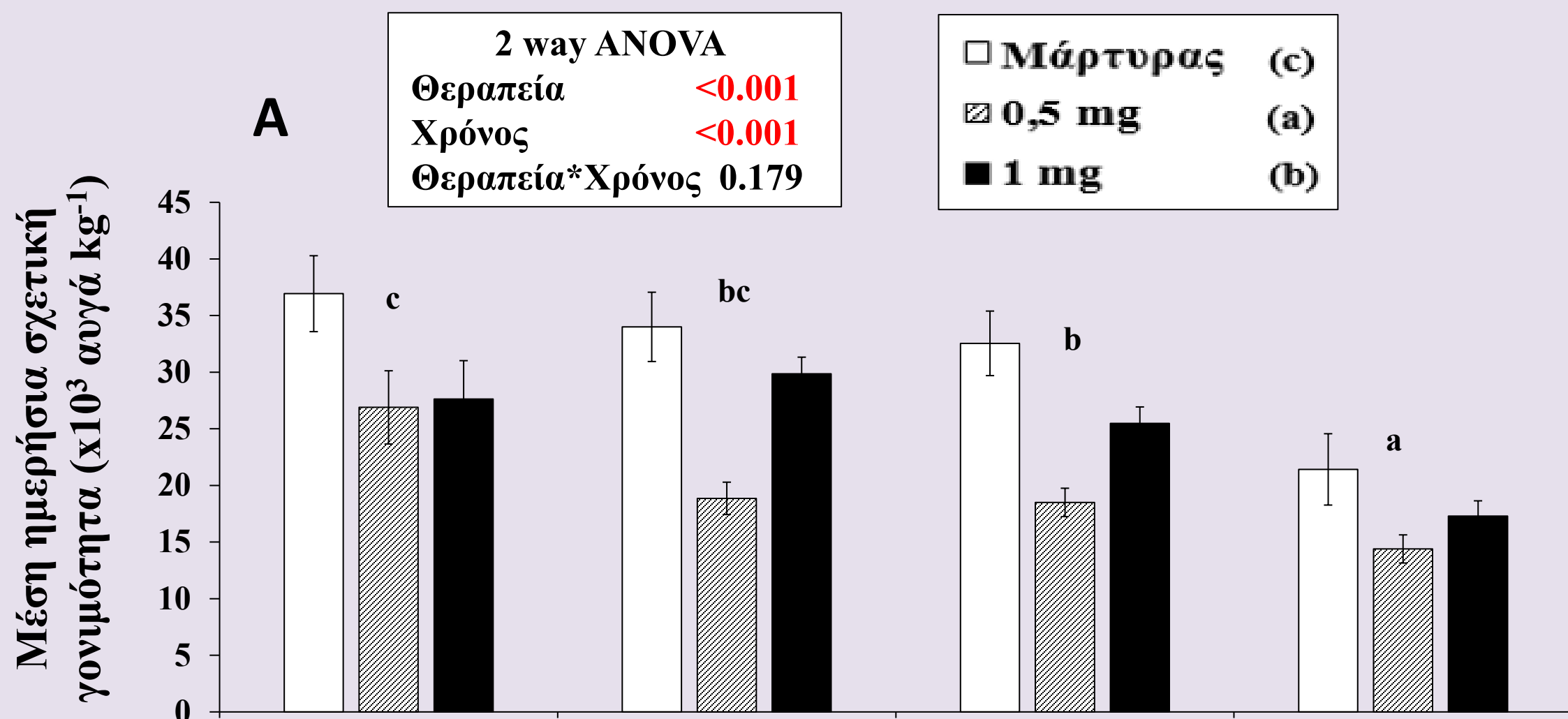
Κατά το πείραμα εφαρμογής της θεραπείας E2 σε τσιπούρες ηλικίας 2+ ετών, χρησιμοποιήθηκαν εμφυτεύματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης (EVAc). Η θεραπεία ξεκίνησε στις 25/7/2023 με τη χρήση δύο δόσεων (0,5 και 1 mg kg⁻¹) και τα ψάρια υποβλήθηκαν σε τρίμηνη θεραπεία εμφυτευμάτων (κάθε 28 ημέρες). Τρεις μήνες 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. Τα θηλυκά ελέγχθηκαν ξανά ως προς το φύλο τους και την επόμενη αναπαραγωγική περίοδο (29/01/2025).



Εικόνα 1. Α. Φωτογραφία από θηλυκή ωθήκη τσιπούρας 3 ετών κατά την τελική δειγματοληψία. **Β.** Ιστολογική απεικόνιση πρωτογενών ωοκυττάρων (po), ωοκυττάρων σε λεκιθογένεση (Vg), σε φάση ωρίμανσης (OM) και μετα ωοθυλακιωρρηκτικών σωματίων (POFs). **Γ.** Φωτογραφία από αρσενική τσιπούρα 3 ετών κατά την τελική δειγματοληψία. **Δ.** Ιστολογική απεικόνιση ώριμου όρχι (προυσία σπέρματος, Sz).



Εικόνα 2. Σχετική συχνότητα αρσενικών και θηλυκών τσιπουρών 3 ετών σε κάθε ομάδα θεραπείας E2 (n=2 δεξαμενές ανά θεραπεία, 20 ψάρια αρχικά σε κάθε δεξαμενή), κατά την τελική δειγματοληψία του πειράματος εφαρμογής της θεραπείας (11/12/2023) μετά από μακροσκοπική αξιολόγηση.



Εικόνα 3. Α. Μέση (±SEM) ημερήσια σχετική γονιμότητα (x10³ αυγά kg⁻¹ σωματικού βάρους θηλυκών) και **Β.** Μέσο (±SEM) ποσοστό γονιμοποίησης (%) των ομάδων ωοτοκίας τσιπούρας ου διαμορφώθηκαν από θηλυκά της ομάδας του μάρτυρα και των ομάδων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με E2 (0,5 και 1 mg). Οι λατινικοί χαρακτήρες πάνω από τις μπάρες υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μηνών και οι δείκτες δίπλα στον υπόμνημα δείχνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων θεραπείας (two-way ANOVA, Tukey's HSD, p<0,05)

Αποτελέσματα

- Η ορμονική επαγωγή της αναστροφής φύλου οδήγησε σε θηλυκοποίηση του το 100 και 95% των επαναλαμβανόμενων πληθυσμών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 0,5 mg kg⁻¹ E2, ενώ 100 και 89% των επαναλαμβανόμενων πληθυσμών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 1 mg kg⁻¹ E2 ήταν επίσης θηλυκά (Εικόνα 2). Οι αντίστοιχες τιμές στις επαναλαμβανόμενους πληθυσμούς του μάρτυρα που δεν υποβλήθηκαν σε ορμονική θεραπεία ήταν 20 και 25%. Τα θηλυκά άτομα που προέκυψαν είχαν ωθήκες αποτελούμενες από πρωτογενή ωοκύτταρα (po) έως ωοθυλακιωρρηκτικά (OV) (Εικόνες 1.Α και 1.Β), ενώ όλα τα αρσενικά άτομα ήταν ώριμα σπερμιάζοντα (Εικόνες 1.Γ και 1.Δ).
- 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).
- Οι μεγαλύτερες τιμές της μέσης ημερήσιας σχετικής γονιμότητας καταγράφηκαν τον Δεκέμβριο και τον Ιανουάριο και οι χαμηλότερες τιμές τον μήνα Μάρτιο, με την ομάδα ωοτοκίας του μάρτυρα να παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερες τιμές από τις υπόλοιπες ομάδες ωοτοκίας E2 (two-way ANOVA, Tukey's HSD, p<0,001, Εικόνα 3.Α). Οι τιμές του μέσου ποσοστού γονιμοποίησης παρουσίασαν την αντίθετη τάση, με τις χαμηλότερες τιμές να εμφανίζονται τον Δεκέμβριο και τις υψηλότερες τον Φεβρουάριο και τον Μάρτιο, χωρίς διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ωοτοκίας E2 (two-way ANOVA, Tukey's HSD, p=0,014, Εικόνα 3.Β).
- Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ωοτοκίας E2 όσον αφορά στα ποσοστά της εμβρυικής επιβίωσης στις 24 ώρες, της εκκόλαψης και της νυμφικής επιβίωσης την 5η ημέρα μετά την συλλογή, με την τελευταία να είναι σημαντικά χαμηλότερη από τις άλλες δύο παραμέτρους ανάπτυξης εμβρύων (two-way ANOVA, Tukey's HSD, p=0,002).

Συζήτηση

- Η θεραπεία με E2 προκάλεσε μόνιμη 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.