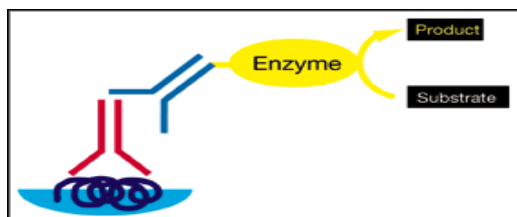
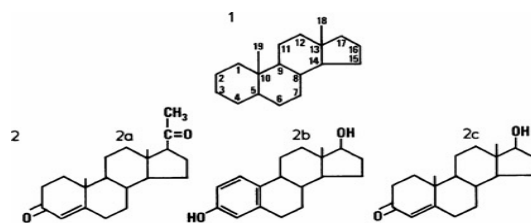


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΚΑΙ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΛΟΥ ΣΤΟ
ΛΑΒΡΑΚΙ, *Dicentrarchus labrax*»



Μαρία Παπαδάκη
Σεπτέμβριος 2003

Διμελής επιτροπή:

Δερμών Αικατερίνη, Επίκουρος καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μυλωνάς Κωνσταντίνος, Ερευνητής Β', Ι.Θ.Α.ΒΙ.Κ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) αποτελεί πολύ σημαντικό εμπορικό είδος στην Ευρώπη, η παραγωγή του οποίου από την ιχθυοκαλλιέργεια τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί κατά πολύ. Όμως, το υψηλό ποσοστό αρσενικών ατόμων (70-90%) που παρατηρείται κατά την καλλιέργειά του και η πρόωρη ωρίμανση μερικών από αυτά τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, σε συνδυασμό με τη μικρότερη ανάπτυξή τους σε σχέση με τα θηλυκά (40% μικρότερο βάρος σώματος κατά τη συγκομιδή τους) καθιστούν αναγκαία την ανάπτυξη μεθοδολογιών είτε για τη μείωση του αριθμού των αρσενικών είτε για τη δημιουργία πληθυσμών μόνο με θηλυκά άτομα. Οι γενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι σήμερα δεν απέφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα στον έλεγχο φύλου, με αποτέλεσμα να θεωρηθεί ότι ο καθορισμός φύλου του λαβρακιού δεν είναι απόλυτα γενετικός, αλλά επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η βελτίωση της γνώσης μας σχετικά με τη διαφοροποίηση φύλου του λαβρακιού και η μελέτη του συσχετισμού ανάμεσα στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών οιστραδιόλη (E2), τεστοστερόνη (T) και 11-κετοτεστοστερόνη (11-KT) με τη διαδικασία της γοναδικής διαφοροποίησης. Για το σκοπό αυτό ήταν απαραίτητη η δημιουργία πληθυσμών με κυρίαρχο το ένα φύλο. Με βάση το γεγονός ότι τα θηλυκά άτομα λαβρακιού αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος από τα αρσενικά από πολύ μικρή ηλικία, παρήχθησαν λάρβες με τη μέθοδο καλλιέργειας του μεσόκοσμου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν εντατικές διαλογές. Οι διαλογές πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 66, 130, 180 και 220 μετά την εκκόλαση των λαρβών και οδήγησαν στη δημιουργία ενός πληθυσμού με μεγάλα άτομα (L-άκρο) και ενός πληθυσμού με μικρά άτομα (S-άκρο). Κρατήθηκε και ένας πληθυσμός στον οποίο δεν πραγματοποιήθηκαν διαλογές (Μάρτυρας). Δείγματα γονάδων και αίματος πάρθηκαν από το L-άκρο και S-άκρο κάθε 50 ημέρες, από την ημέρα 50 μέχρι και την ημέρα 300 μετά την εκκόλαση. Οι γονάδες εξετάστηκαν ιστολογικά για τον καθορισμό των αναλογιών φύλου των δύο πληθυσμών. Η παραγωγή πληθυσμών με κυρίαρχο το ένα φύλο επιτεύχθηκε. Το τελικό ποσοστό των θηλυκών στον πληθυσμό Μάρτυρα ήταν 56%, στον πληθυσμό L-άκρο 96% και στον πληθυσμό S-άκρο 30%. Όσο αφορά στη διαφορά στην ανάπτυξη ανάμεσα

στους δύο πληθυσμούς, τα άτομα στο L-άκρο απέκτησαν σχεδόν το διπλάσιο βάρος από αυτά στο S-άκρο κατά την ημέρα 300 μετά την εκκόλαση ($P < 0.05$). Από τα ιστολογικά δείγματα των γονάδων των πληθυσμών μελετήθηκε η οντογένεση της διαφοροποίησης του φύλου. Στις ηλικίες 50 και 100 ημερών οι γονάδες παρέμεναν αδιαφοροποίητες και ο πρώτος εντοπισμός αρσενικών και θηλυκών γονάδων έγινε δυνατός την 150 μέρα μετά την εκκόλαση. Οι γονάδες ήταν πλήρως διαφοροποιημένες την ημέρα 250 μετά την εκκόλαση. Από το αίμα απομονώθηκε το πλάσμα, με σκοπό την ανάλυση των στεροειδών ορμονών E2, T και 11-KT σε αυτό. Οι συγκεντρώσεις των γοναδικών στεροειδών μετρήθηκαν και σε δείγματα γονάδων. Η 11-KT βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος, τόσο στο πλάσμα όσο και στις γονάδες, και φάνηκε να συσχετίζεται με τη διαφοροποίηση φύλου. Η E2 επίσης έδωσε θετικό συσχετισμό, ενώ στην T δεν αποδόθηκε σημαντικός ρόλος στη διαφοροποίηση του φύλου στο λαβράκι. Φαίνεται, λοιπόν, ότι τόσο τα οιστρογόνα (E2) όσο και τα ανδρογόνα (11-KT) εμπλέκονται στη διαφοροποίηση του φύλου για το είδος αυτό. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες σε σχέση με ένζυμα και υποδοχείς που σχετίζονται με τις γοναδικές στεροειδείς ορμόνες, καθώς και με γονίδια που ενδέχεται να συμμετέχουν στον καθορισμό του φύλου στο λαβράκι είναι απαραίτητες για την απόκτηση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας της διαφοροποίησης φύλου στο λαβράκι.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων, Τμήμα Υδατοκαλλιεργειών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών ετών 2001-2003. Ένα μέρος της πραγματοποιήθηκε και στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών Torre la Sal, Benicasim, Ισπανία. Ευχαριστώ θερμά τον ερευνητή Β' Βαθμίδας Μυλωνά Κωνσταντίνο, Ι.ΘΑ.ΒΙ.Κ., για τη συνεχή επίβλεψη και υποστήριξη που μου παρείχε τα δύο αυτά χρόνια, τόσο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη συγγραφή της μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ την επίκουρο καθηγήτρια Δερμών Αικατερίνη του Τμήματος Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, που δέχτηκε να αποτελεί μέλος της διμελούς επιτροπής, καθώς και για τα σχόλια και της παρατηρήσεις της. Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω εξίσου και τους Silvia Zanuy και Manuel Carillo, οι οποίοι με μύησαν στα μυστικά της ιστολογίας των γονάδων. Αλλά θερμά ευχαριστώ χρωστάω και στη Συγγελάκη Ειρήνη, τεχνικό της μονάδας Υδατοκαλλιεργειών του Ι.ΘΑ.ΒΙ.Κ., η οποία, εκτός από τη διαχείριση των ιχθυδίων καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, με στήριξε ηθικά στην προσπάθεια αυτή. Θα ήταν, όμως παράβλεψή μου, να μην ευχαριστήσω και όλους τους υπόλοιπους τεχνικούς του Τμήματος Υδατοκαλλιεργειών στο Φάρο, καθώς και τον Pepe Monfort από το Ινστιτούτο Υδατοκαλλιέργειας Torre la Sal, τόσο για τις γνώσεις που μου παρείχαν, όσο και για την υποστήριξή τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	I
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	III
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	8
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ ΠΟΥ ΝΑ ΑΠΟΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΚΥΡΙΩΣ ΑΠΟ ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΑ	
ΑΤΟΜΑ	8
1.1 Εισαγωγή	8
1.2 Υλικά και μέθοδοι	12
1.2.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής	12
1.2.2 Παραγωγή πληθυσμών με κυρίαρχο το θηλυκό και το αρσενικό φύλο	13
1.2.3 Δειγματοληψίες	13
1.2.4 Ανάλυση δεδομένων	15
1.3 Αποτελέσματα.....	16
1.4 Συζήτηση.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	27
ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ	
2.1 Εισαγωγή	27
2.2 Υλικά και μέθοδοι	32
2.3 Αποτελέσματα.....	33
2.4 Συζήτηση.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	44
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΙΚΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ	
3.1 Εισαγωγή	44
3.2 Υλικά και μέθοδοι	49
3.2.1 Στοιχεία ενζυμικής ανοσοανάλυσης.....	49
3.2.3 Στατιστική ανάλυση και έκφραση των δεδομένων.....	50
3.3 Αποτελέσματα.....	51
3.3.1 Στοιχεία ενζυμικής ανοσοανάλυσης.....	51
3.3.2 Επίπεδα στεροειδών ορμονών	55
3.3.2.1 Επίπεδα οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και 11 - κετοτεστοστερόνης στο πλάσμα	55
3.3.2.2 Επίπεδα οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και 11 - κετοτεστοστερόνης στις γονάδες	56
3.4 Συζήτηση.....	61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	67
ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	84
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ	84
I. Παρασκευή μονιμοποιητικού διαλύματος.....	84
II. Αφυδάτωση δειγμάτων	84
III. Πολυμερισμός ρητίνης.....	85
IV. Χρώση δειγμάτων.....	85
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	87
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	87
I. Εισαγωγή στην ενζυμική ανοσοανάλυση.....	87
II. Πρωτόκολλο ενζυμικής ανοσοανάλυσης.....	92
II.I Εκχύλιση στεροειδών ορμονών.....	933
II.II Coating των microtiter plates.	93
II.III Προετοιμασία assay	93
II.V Χρησιμοποιούμενα υλικά.....	93
II.VI Πρότυπες καμπύλες	97
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....	100
ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΡΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	100
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV.....	101
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	101

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ψάρια, με πάνω από 24000 είδη, είναι αναμφίβολα η πιο διαφοροποιημένη ομάδα ανάμεσα στα σπονδυλωτά. Παρόλο που μεγάλη ποικιλία ειδών είναι γονοχωριστικά, μεγάλος είναι και ο αριθμός των ερμαφρόδιτων ειδών. Το φαινόμενο του ερμαφροδιτισμού είναι ιδιαίτερα έντονο στην υπέρταξη των τελεόστεων, όπου η αναστροφή φύλου αποτελεί ένα κοινό φυσικό φαινόμενο (Chan και Yeung, 1983). Τα ερμαφρόδιτα είδη αναπτύσσονται αρχικά είτε ως αρσενικά (πρώτανδρα) είτε ως θηλυκά (πρωτόγυνα) (Devlin και Nagahama, 2002) και στη συνέχεια μεταβάλλουν το φύλο τους. Ο καθορισμός του φύλου στα ψάρια είναι μια ιδιαίτερα ευμετάβλητη διαδικασία και μπορεί να μεταβληθεί από εξωγενείς παράγοντες, όπως γενετικούς, περιβαλλοντικούς, φυσιολογικούς και παράγοντες συμπεριφοράς (Devlin και Nagahama, 2002).

Στις ιχθυοκαλλιέργειες, λόγω της επιδείνωσης στη ζήτηση του κοινού και της απρόβλεπτης φύσης των ποικίλων αλλαγών στην ανάπτυξη, στην αποτελεσματικότητα στη χρήση της τροφής, στη συμπεριφορά, στο χρώμα του σώματος και στην ευαισθησία στις αρρώστιες που συμβαίνουν κατά την αναπαραγωγική ωρίμανση, κάποιες φορές είναι προτιμότερο να αναστέλλεται ή να καθυστερεί η ωρίμανση κι έτσι να παίρνονται ανώριμα ή στείρα αποθέματα από τα ψάρια που προορίζονται για κατανάλωση (Bromage, 1988• Strüssman και Nakamura, 2002). Συχνά αυτά τα προβλήματα είναι πιο σοβαρά σε ένα από τα φύλα, γενικά το αρσενικό, και κάτω από αυτές τις συνθήκες η αντιστροφή φύλου και η παραγωγή αποθεμάτων ενός φύλου ίσως να είναι η προτιμώμενη επιλογή (Bromage, 1988). Στην τιλάπια (*Oreochromis* spp.), για παράδειγμα, προτιμάται η εκτροφή αρσενικών ατόμων, ενώ στα πλατύψαρα (Pleuronectiformes) και τα σαλμονοειδή (*Salmo* και *Oncorhynchus* spp.) η παραγωγή θηλυκών (Donaldson, 1996), δηλαδή του φύλου εκείνου από κάθε είδος που αποκτά το μεγαλύτερο μέγεθος, κι επομένως τη μεγαλύτερη εμπορική αξία, σε μικρότερη ηλικία.

Στις μέρες μας, είναι διαθέσιμες αρκετές μέθοδοι για την αντιστροφή του φύλου, για τις οποίες απαιτείται γνώση του τρόπου με τον οποίο καθορίζεται το φύλο. Οι διάφοροι τρόποι χειρισμού του φύλου για τους σκοπούς της υδατοκαλλιέργειας είναι η χρήση

πλοειδίας κατά τη γονιμοποίηση, ορμονών κατά την εκκόλαψη, θερμοκρασίας κατά το εφηβικό στάδιο και άλλων περιβαλλοντικών και κοινωνικών παραγόντων κατά το ενήλικο στάδιο (Pandian και Koteeswaran, 1999). Για παράδειγμα στην Ιαπωνία, οι τεχνικές χειρισμού του φύλου της γλώσσας *Paralichthys olivaceus*, περιλαμβάνουν τόσο τη χρήση γοναδικών στεροειδών ορμονών όσο και τον έλεγχο της θερμοκρασίας του νερού κατά την ανάπτυξη των ιχθυδίων (Yamamoto, 1999).

Οι κυριότεροι τρόποι ελέγχου του φύλου των ψαριών για τους σκοπούς της υδατοκαλλιέργειας είναι οι ορμονικοί και οι γενετικοί. Στους ορμονικούς μηχανισμούς συγκαταλέγονται τόσο η άμεση χορήγηση στεροειδών ορμονών σε νεαρά ψάρια που οδηγεί στην επιθυμητή κατεύθυνση του φύλου τους, όσο και η έμμεση μέθοδος που αφορά στην αναστροφή φύλου ομογαμετικών ατόμων που εκτρέφονται μέχρι την ωριμότητα. Αν, για παράδειγμα, σε ομογαμετικά (XX) θηλυκά άτομα κάποιου είδους χορηγηθούν ανδρογόνα, τα άτομα αυτά θα έχουν γενότυπο XX, αλλά θα παράγουν σπέρμα. Αν το σπέρμα από αυτά τα ψάρια (X) ενωθεί με ωάρια από θηλυκά ψάρια (X), στα οποία δεν έχουν χορηγηθεί ορμόνες, ο πληθυσμός που θα παραχθεί θα αποτελείται από θηλυκούς ομογαμετικούς απογόνους (Hunter και Donaldson, 1983). Αλλά και η πρόκληση στειρότητας με τη χορήγηση γοναδικών στεροειδών κατά την περίοδο της διαφοροποίησης φύλου σε υψηλότερες δόσεις και μεγαλύτερες διάρκειες από αυτές που χρειάζονται για τον ορμονικό έλεγχο του φύλου αποτελεί τρόπο παραγωγής πληθυσμών με επιθυμητή ανάπτυξη (Hunter και Donaldson, 1983). Η αναστροφή φύλου με τη χρήση ορμονών είναι ήδη δυνατή σε πάνω από 50 είδη ψαριών (Devlin και Nagahama, 2002) με τη χρήση μιας από τις 31 (16 ανδρογόνα και 15 οιστρογόνα) διαθέσιμες στεροειδείς ορμόνες (Pandian και Sheela, 1995).

Όσον αφορά στους γενετικούς τρόπους ελέγχου του φύλου των ψαριών για τους σκοπούς της υδατοκαλλιέργειας οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η επαγόμενη γυνογένεση, η επαγόμενη ανδρογένεση και η επαγόμενη πολυπλοειδία (Thorgaard, 1983). Κατά την επαγόμενη γυνογένεση τα πατρικά χρωμοσώματα στο σπέρμα απενεργοποιούνται πριν τη γονιμοποίηση. Κατά την επαγόμενη ανδρογένεση τα μητρικά χρωμοσώματα στο αβγό απενεργοποιούνται πριν, ή λίγο μετά τη γονιμοποίηση, ενώ στην πολυπλοειδία οι αρχικές διαιρέσεις του γονιμοποιημένου αβγού εμποδίζονται για την παραγωγή τριπλοειδών ή

τετραπλοειδών ατόμων (Thorgaard, 1983• Colombo, 1999). Τα βλαστικά κύτταρα στα τριλοειδή ψάρια δεν μπορούν να διαιρεθούν μιτωτικά και συνήθως τα ψάρια είναι γενετικά στείρα (Carillo et al., 1998).

Οι στεροειδείς ορμόνες των γονάδων αναμφισβήτητα σχετίζονται με τη διαφοροποίηση του φύλου στα ψάρια. Μετά την αναστροφή του φύλου που επιτεύχθηκε στη medaka (*Oryzias latipes*) με τη χορήγηση εξωγενών στεροειδών ορμονών, διατυπώθηκε η άποψη ότι τα στεροειδή είναι οι τελικοί φυσικοί επαγωγείς της γοναδικής διαφοροποίησης (Yamamoto, 1969). Από τότε, πειράματα χορήγησης εξωγενών στεροειδών ορμονών κατά τη διάρκεια της γοναδικής διαφοροποίησης που οδηγούν σε αναστροφή φύλου έχουν αναφερθεί για σειρά ειδών ψαριών (Baker et al., 1988• Van den Hurk, 1989• Andersen et al., 2003). Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί επίσης με σκοπό τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των στεροειδών ορμονών των γονάδων κατά τη διαφοροποίηση φύλου (Rothbard et al., 1987• Feist και Schreck, 1996• Yeoh et al., 1996a, b). Άρθρα ανασκόπησης που αναφέρονται στη χορήγηση εξωγενών στεροειδών ορμονών έχουν δημοσιευτεί από τους Pandian και Sheela (1995), Donaldson (1996) και Pifferer (2001), ενώ στο φυσιολογικό ρόλο των στεροειδών ορμονών στη διαφοροποίηση φύλου από τους Baroiller et al. (1999), Strüssman και Nakamura (2002) και Devlin και Nagahama (2002).

Παρόλο, όμως, που ο συσχετισμός των στεροειδών ορμονών με τη διαφοροποίηση φύλου στα ψάρια αποτελεί αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια, ο ακριβής ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Τα οιστρογόνα αποδείχτηκε ότι σχετίζονται με τη διαφοροποίηση του φύλου, κυρίως μετά τη μελέτη των κυττάρων που παράγουν στεροειδή στις γονάδες και των ενζύμων παραγωγής στεροειδών. Το κυριότερο από τα ένζυμα αυτά είναι η αρωματάση, η οποία μετατρέπει την τεστοστερόνη (T) σε οιστραδιόλη 17β (E2). Συγκεκριμένα στην τιλάπια, βρέθηκε ότι τα κύτταρα που παράγουν στεροειδή στις υποτιθέμενες ωθήκες κατά το αδιαφοροποίητο στάδιο και στις διαφοροποιούμενες ωθήκες εκφράζουν τα ένζυμα για τη βιοσύνθεση της E2 από τη χολεστερόλη (Nakamura et al., 1998). Αργότερα, βρέθηκε στο ίδιο είδος ότι οι διαφοροποιούμενες ωθήκες περιείχαν τα ένζυμα για την παραγωγή όλων των κυριότερων στεροειδών (Nagahama et al., 2000). Επιπλέον, φυλετικός διμορφισμός στην

έκφραση της αρωματάσης κατά τη διαφοροποίηση του φύλου καταδείχτηκε στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) και την τιλάπια (Guiguen et al., 1999• Kwon et al., 2001•D' Cotta et al., 2001b). Αλλά και η χορήγηση του αναστολέα της αρωματάσης Fadrozol σε αναπτυσσόμενες αδιαφοροποίητες λάρβες στην τιλάπια οδήγησε στην παραγωγή 100% αρσενικών ατόμων, αποδεικνύοντας με άλλον έναν τρόπο την εμπλοκή του ενζύμου της αρωματάσης, και επομένως των οιστρογόνων, στη διαφοροποίηση φύλου για το είδος αυτό (Hines et al., 1995• Afonso et al., 2001).

Όσον αφορά στο ρόλο των ανδρογόνων, στην τιλάπια (Rothbard et al., 1987•Rowell et al., 2002) και στον κέφαλο (*Mugil cephalus*) (Chang et al., 1999) η T φάνηκε να είναι η μόνη γοναδική στεροειδής ορμόνη που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση φύλου. Φυλετικός διμορφισμός στα επίπεδα των ανδρογόνων (T, 11-κετοτεστοστερόνη και ανδροστενεδιόνη), αλλά όχι σε αυτά των οιστρογόνων έχει εντοπιστεί και στον ασημένιο σολομό (*Oncorhynchus kisutsch*) (Feist et al., 1990). Επιπλέον, σε αρσενικές γονάδες στην τιλάπια βρέθηκαν ποσότητες 11-κετοτεστοστερόνης (11-KT) σε επίπεδο fentogram πριν από την ορχική διαφοροποίηση και πριν από την εμφάνιση κυττάρων που παράγουν στεροειδή στις γονάδες (D' Cotta et al., 2001a). Ωστόσο, σε μελέτη στο ίδιο είδος, τρία ένζυμα παραγωγής στεροειδών ορμονών εκφράστηκαν σε μικρό βαθμό σε γενοτυπικά αρσενικά άτομα, και μάλιστα μετά τα πρώτα σημάδια διαφοροποίησης της γονάδας (Nagahama et al., 2000).

Το ψάρι το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), η ακριβής κατάταξη του οποίου είναι η παρακάτω:

Τάξη Perciformes

Υπόταξη Percoidei

Οικογένεια Moronidae

Γένος *Dicentrarchus*

Είδος *labrax*

Τα υπόλοιπα 5 είδη της οικογένειας Moronidae είναι τα

Punctatus

Saxatilis

Chrysops

Americana

Mississippiensis

Το λαβράκι εξαπλώνεται στη Μεσόγειο Θάλασσα και τις ακτές του Ατλαντικού στην Ευρώπη και τη Βόρειο Αφρική. Είναι ευρύαλο και ευρύθερμο είδος και ευκαιριακός θηρευτής καθόλη τη διάρκεια της ζωής του (Picket και Pawson, 1994). Αποτελεί είδος με ομαδικό συγχρονισμό ανάπτυξης ωοθήκης (group–synchronous oocyte development), που αναπαράγεται ετήσια για αρκετά χρόνια της ζωής του (Carillo et al., 1995). Επιπλέον, όπως τα περισσότερα είδη τελεόστεων της εύκρατης ζώνης, χρησιμοποιεί τα εποχιακά πρότυπα του μεταβαλλόμενου μήκους της ημέρας για το συγχρονισμό της ωοτοκίας του, ώστε αυτή να πραγματοποιείται την καταλληλότερη εποχή του χρόνου για την επιβίωση των απογόνων του (Carillo et al., 1995).

Η πρώτη προσπάθεια εκτροφής του λαβρακιού έγινε στη Γαλλία στις αρχές του αιώνα (Barnabé, 1995) και σήμερα αποτελεί πολύ σημαντικό είδος στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια και ιδιαίτερα στην Ελλάδα, όπου πραγματοποιείται το 50% της παραγωγής λαβρακιού και τσιπούρας (*Sparus auratus*) στη Μεσόγειο. Κάτω από συνθήκες εκτροφής, τα αρσενικά άτομα του είδους αυτού φτάνουν στην εφηβεία κατά το δεύτερο χρόνο της ζωής τους, ανάλογα περισσότερο με το μήκος που έχουν αποκτήσει παρά με την ηλικία τους (Carillo et al., 1995). Αντίθετα, στα θηλυκά η εφηβεία λαμβάνει χώρα συνήθως ένα χρόνο αργότερα (Bruslé και Roblin, 1984). Κάτω από φυσικές συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας, ανώριμα θηλυκά ηλικίας 2 χρονών στην ιχθυοκαλλιέργεια φτάνουν τα 0.5 ± 0.04 kg βάρος και τα 33.7 ± 0.6 cm μήκος, ενώ τα αρσενικά της ίδιας ηλικίας αποκτούν 0.3 ± 0.02 kg βάρος και 28.5 ± 0.6 cm μήκος (Carillo et al., 1995). Η μεγαλύτερη αύξηση βάρους των θηλυκών ατόμων συνηγορεί

στην ανάπτυξη μεθοδολογιών για τη δημιουργία μονοφυλετικών πληθυσμών λαβρακιού, δηλαδή πληθυσμών που να αποτελούνται μόνο από θηλυκά άτομα.

Αλλά και το υψηλό ποσοστό αρσενικών ατόμων (70-90%) που παρατηρείται κατά την εκτροφή του λαβρακιού και η πρόωγη ωρίμανση μερικών από αυτά τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, σε συνδυασμό με τη μικρότερη ανάπτυξή τους σε σχέση με τα θηλυκά που αναφέρθηκε παραπάνω (40% μικρότερο βάρος σώματος κατά τη συγκομιδή τους) (Carillo et al., 1998) καθιστούν πλέον αναγκαία την ανάπτυξη μεθοδολογιών είτε για τη μείωση του αριθμού των αρσενικών είτε για τη δημιουργία πληθυσμών μόνο με θηλυκά άτομα. Οι προσπάθειες για γενετικό έλεγχο της αναπαραγωγής του λαβρακιού (όπως η τριπλοειδία και η γυνογένεση) δεν ευδοκίμησαν, γεγονός που υπογραμμίζει ότι ο καθορισμός φύλου στο λαβράκι είναι πολύπλοκότερος από ό,τι αναμενόταν. Έτσι, κυριαρχεί η άποψη ότι ο καθορισμός φύλου στο λαβράκι γίνεται με συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Zanuy et al., 2001).

Για το λαβράκι, πειράματα χορήγησης εξωγενών ορμονών έχουν πραγματοποιηθεί από τους Blázquez et al. (1995, 1998a, 1999, 2001) και έχουν δείξει ότι το συνθετικό ανδρογόνο 17α-μεθυλτεστοστερόνη μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μονοφυλετικών αρσενικών πληθυσμών λαβρακιού (Chatain et al., 1999• Blázquez et al., 1995• Blázquez et al., 2001). Επίσης, η χορήγηση 17β-οιστραδιόλης και 17α-εθυνυλοιστραδιόλης οδήγησε στη δημιουργία πληθυσμών θηλυκών ατόμων (Blázquez et al., 1998a).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, η κατανόηση της διαφοροποίησης φύλου στο συγκεκριμένο είδος έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια. Στους παράγοντες που βρίσκονται υπό μελέτη για την κατανόηση της διαφοροποίησης του φύλου στο λαβράκι συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια που καθορίζουν το φύλο (Felip et al., 2002), οι ορμόνες του εγκεφάλου και της υπόφυσης (Rodríguez et al., 2000a), οι παράγοντες ανάπτυξης (Saillant et al., 2001), τα στεροειδικά ένζυμα (Gonzalez et al., 2002), καθώς και τα γοναδικά στεροειδή και οι υποδοχείς τους (Rodríguez et al., 2003).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του συσχετισμού των γοναδικών στεροειδών ορμονών με τη διαφοροποίηση φύλου στο λαβράκι. Αυτή είναι και η πρώτη φορά που επιχειρείται η συσχέτιση αυτή για το συγκεκριμένο είδος. Για το σκοπό αυτό,

επιχειρήθηκε η παραγωγή πληθυσμών λαβρακιού με κυρίαρχο το ένα φύλο. Με βάση το γεγονός ότι τα θηλυκά άτομα λαβρακιού αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος από τα αρσενικά από πολύ μικρή ηλικία, η παραγωγή των πληθυσμών αυτών στηρίχτηκε στην πραγματοποίηση εντατικών διαλογών, μιας μεθόδου που δε στηρίζεται στη χρήση χημικών ουσιών και επιπλέον δεν έχει ξαναχρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μονοφυλετικών πληθυσμών σε άλλα είδη ψαριών. Ένας άλλος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν και η περιγραφή της οντογένεσης της διαφοροποίησης των γονάδων στο λαβράκι και ο εντοπισμός των διαφορών που μπορεί να παρουσιάζει αυτή με παλαιότερη μελέτη για το είδος αυτό (Roblin και Bruslé, 1983), κυρίως όσο αφορά στη χρονική συσχέτιση των γεγονότων της διαφοροποίησης των γονάδων με το μέγεθος των αναπτυσσόμενων ιχθυδίων. Καθώς οι μέθοδοι καλλιέργειας έχουν μεταβληθεί τα τελευταία 20 χρόνια, σημαντικό είναι να εξεταστεί αν και ο χρόνος εμφάνισης των γεγονότων της διαφοροποίησης φύλου έχει μεταβληθεί επίσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ ΠΟΥ ΝΑ ΑΠΟΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΚΥΡΙΩΣ ΑΠΟ ΑΡΣΕΝΙΚΑ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΑ ΑΤΟΜΑ

1.1 Εισαγωγή

Το λαβράκι αποτελεί ένα σημαντικό είδος για την ιχθυοκαλλιέργεια, το οποίο έχει μελετηθεί πολύ και οι μέθοδοι εκτροφής του έχουν αναπτυχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό τα τελευταία χρόνια. Κατά την εκτροφή του, όμως, παρουσιάζονται ορισμένα προβλήματα, τα οποία σχετίζονται κυρίως με τα αρσενικά άτομα του είδους. Εκτός από το υψηλό ποσοστό που αυτά παρουσιάζουν στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας (70-90%), ορισμένα από αυτά ωριμάζουν πρόωρα τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, δηλαδή καταναλώνουν ενέργεια στην ανάπτυξη του ορχικού τους ιστού και της συμπεριφοράς αναπαραγωγής, η οποία διαφορετικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για γρηγορότερη σωματική αύξηση (Strüssman και Nakamura, 2002). Το αποτέλεσμα είναι η παρουσία φυλετικού διμορφισμού όσον αφορά στο μέγεθος κατά την εξαλίευση του λαβρακιού, δηλαδή περίπου όταν αυτό φτάσει τα 300-400 g (Saillant et al., 2002). Έτσι, δημιουργήθηκε η ανάγκη παραγωγής πληθυσμών λαβρακιού που να αποτελούνται κυρίως από θηλυκά άτομα.

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη διαφοροποίηση φύλου στο λαβράκι. Η διαφοροποίηση φύλου στο λαβράκι μπορεί να αντιστραφεί με τη χορήγηση εξωγενών ανδρογόνων (Blázquez et al., 1995) και η θερμοκρασία μπορεί επίσης να μεταβάλλει την πορεία της διαφοροποίησης φύλου (Blázquez et al., 1998b• Pavlidis et al., 2000• Saillant et al., 2002• Koumoundouros et al., 2002• Mylonas et al., 2003). Ωστόσο, ούτε οι γενετικές μέθοδοι αλλά ούτε οι μέθοδοι χορήγησης εξωγενών οιστρογόνων δεν κατάφεραν να αυξήσουν ικανοποιητικά το ποσοστό των θηλυκών ατόμων στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς (Blázquez et al., 1998a). Ο χειρισμός του φύλου με τη χρήση της κατάλληλης θερμοκρασίας αποτελεί πολύ σημαντικό εύρημα επίσης, αλλά ακόμα βρίσκεται σε στάδιο μελέτης. Για το σκοπό αυτό, σημαντική είναι η βελτίωση των γνώσεών μας σχετικά με τη διαφοροποίηση φύλου στο είδος αυτό. Η κατανόηση των

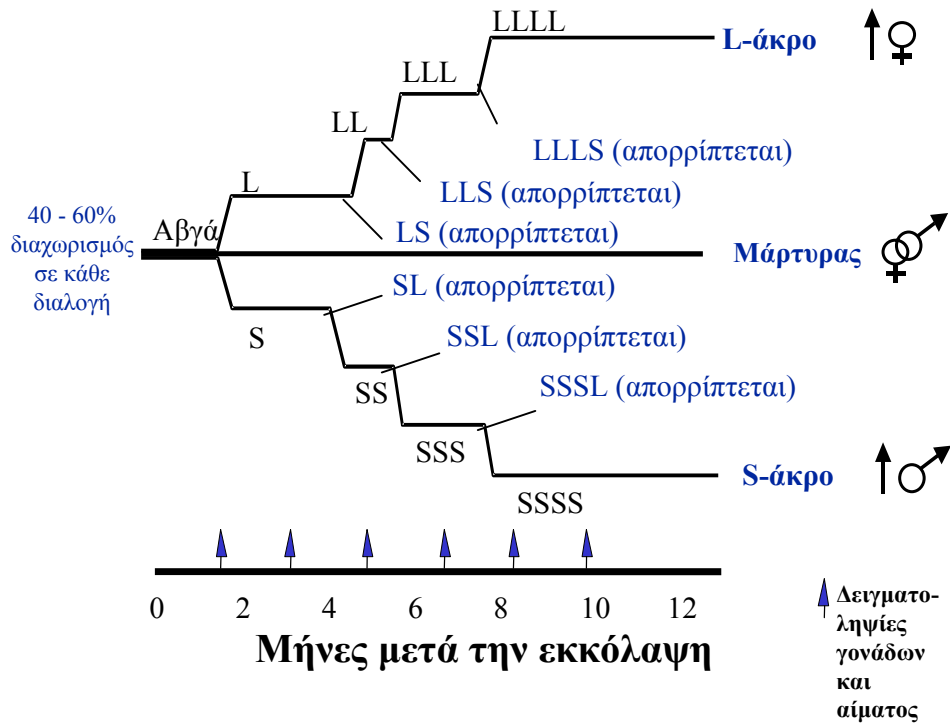
μηχανισμών διαφοροποίησης του φύλου θα βοηθήσει στην ανάπτυξη των κατάλληλων μεθοδολογιών χειρισμού του φύλου για σκοπούς ιχθυοκαλλιέργειας.

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την κατανόηση της επίδρασης του περιβάλλοντος στον καθορισμό του φύλου για το είδος αυτό (Saillant et al. 2002, 2003a, 2003b). Για παράδειγμα, η πυκνότητα και οι διαλογές μεγέθους σε αναπτυσσόμενα ιχθύδια δε φάνηκαν να σχετίζονται με τις αναλογίες φύλου των παραγόμενων πληθυσμών, ενώ τόσο η μητέρα όσο και ο πατέρας επηρεάζουν το φύλο του λαβρακιού κατά την εντατική του καλλιέργεια (Saillant et al., 2003c). Έκτος από τους παραπάνω παράγοντες, έχει μελετηθεί και η επίδραση της ποιότητας του νερού, και συγκεκριμένα των μεταβολών του pH, η οποία βρέθηκε ασήμαντη για τις τελικές αναλογίες φύλου των πληθυσμών (Saillant et al., 2003c). Το συμπέρασμα που προέκυψε από τις παραπάνω μελέτες ήταν ότι στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς λαβρακιού τόσο οι ρυθμοί τροφοδότησης όσο και οι συνθήκες αύξησης μπορεί να σχετίζονται με την παρατηρούμενη ποικιλία στις αναλογίες φύλου (Saillant et al., 2003c). Όσον αφορά στην αλατότητα, τα εφηβικά στάδια του λαβρακιού έχουν προτίμηση σε χαμηλή αλατότητα, ένα εύρημα που αντιστοιχεί στις συνθήκες που στην πραγματικότητα συναντούν στη φύση κατά το εφηβικό τους στάδιο. Ο φυλοκαθορισμός δε μετατρέπεται από το επίπεδο της αλατότητας αλλά φαίνεται ότι εξαρτάται από πολύπλοκες περιβαλλοντικές ρυθμίσεις (Saillant et al., 2003b).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης του επιπέδου των στεροειδών ορμονών των γονάδων και του πλάσματος με τη διαφοροποίηση του φύλου στο λαβράκι. Για το σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητη η δημιουργία δύο πληθυσμών, ο καθένας από τους οποίους να αποτελείται κυρίως από άτομα του ίδιου φύλου.

Για είδη με χρωμοσωμικό καθορισμού φύλου, όπως ο σολομός και η πέστροφα, η χορήγηση φυλετικών στεροειδών ορμονών και η γυνογένεση επιτρέπει τη δημιουργία πληθυσμών ενός φύλου (Piferrer, 2001). Όμως για το λαβράκι, το οποίο δε διαθέτει ετερομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα (Sola et al., 1993), οι προσπάθειες δημιουργίας μονοφυλετικών πληθυσμών με τη χρήση τεχνικών τριπλοειδίας και γυνογένεσης δεν ευδοκίμησαν (Zanuy et al., 2001). Στο παρόν τμήμα της παρούσας μελέτης επιχειρήθηκε η δημιουργία των δύο πληθυσμών, με κυρίαρχα τα αρσενικά άτομα στον ένα και τα

θηλυκά άτομα στον άλλο, με βάση την παρατήρηση ότι τα μεγαλύτερα ψάρια από πολύ νωρίς στην ανάπτυξή τους αναπτύσσονται ως θηλυκά και τα μικρότερα ως αρσενικά (Koumoundouros et al., 2002). Η δημιουργία των δύο αυτών πληθυσμών επιχειρήθηκε με την παραγωγή λαρβών με τη μέθοδο καλλιέργειας του μεσόκοσμου και τη μετέπειτα πραγματοποίηση εντατικών διαλογών. Οι διαλογές είχαν ως σκοπό να διαχωρίζουν τα ψάρια σε ομάδες των μικρότερων (υποτιθέμενων αρσενικών) και των μεγαλύτερων ατόμων (υποτιθέμενων θηλυκών) κατά την περίοδο πριν και κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου (Εικόνα 1). Αυτή η μεθοδολογία δεν έχει πραγματοποιηθεί ξανά και το σημαντικό της πλεονέκτημα είναι ότι δε χρησιμοποιεί φαρμακολογικές ουσίες για το χειρισμό του φύλου. Με αυτό τον τρόπο επιτρέπει τη μελέτη της φυσικής και όχι της επαγόμενης με εξωγενείς στεροειδείς ορμόνες διαφοροποίησης φύλου και ταυτόχρονα αποτελεί πιθανή μέθοδο χειρισμού του φύλου του λαβρακιού χωρίς τη χρήση χημικών ουσιών.



Εικόνα 1. Σχήμα που παρουσιάζει τις διαλογές που χρησιμοποιήθηκαν από τον αρχικό πληθυσμό (Μάρτυρα), προκειμένου να δημιουργηθούν δύο πληθυσμοί λαβρακιού, το L-άκρο και το S-άκρο, που να αποτελούνται κυρίως από άτομα του ίδιου φύλου. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα των διαλογών αυτών ήταν η κυριαρχία των θηλυκών ατόμων στο L-άκρο και των αρσενικών στο S-άκρο.

1.2 Υλικά και μέθοδοι

1.2.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής

Αβγά λαβρακιού από φυσική ωοτοκία που έλαβε χώρα το Φεβρουάριο του 2001 (~846000 αυγά, 78% ποσοστό εκκόλαψης) εκκολάφτηκαν στις εγκαταστάσεις του ιχθυογεννητικού σταθμού του Φάρου στο Ι.Θ.Α.ΒΙ.Κ. και η εκτροφή των νυμφών και μετανυμφών (ημέρα 0–60 από την ημέρα της εκκόλαψης) έγινε με τη μέθοδο καλλιέργειας του μεσόκοσμου (Divanach και Kentouri, 2000), η οποία είναι γνωστό ότι δίνει πιο ισορροπημένες αναλογίες φύλου στον παραγόμενο πληθυσμό σε σχέση με τις εντατικές μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται στη Μεσόγειο. Στο μεσόκοσμο, οι λάρβες και τα νεαρά ιχθύδια διατηρούνται σε μεγάλες δεξαμενές (40 m³) σε μικρή πυκνότητα κι έτσι αποφεύγεται το στρες στους πληθυσμούς. Τα αναπτυσσόμενα ιχθύδια ταΐζονταν διαδοχικά με rotifer (*Brachionus plicatilis*), αμέσως μετά την εκκόλαψή τους και με *Artemia* spp., και τελικά με βιομηχανική τροφή. Μέχρι την ημέρα 60 μετά την εκκόλαψη χρησιμοποιούνταν αυτόματες τάϊστρες. Από την ημέρα 60 μέχρι την ημέρα 100 μετά την εκκόλαψη προστέθηκαν demand feeders και μετά την ημέρα 100 χρησιμοποιήθηκαν μόνο demand feeders.

Οι δεξαμενές περιείχαν αερόπετρες στην περίμετρό τους, παρέχοντας μικρή ανάδευση της στήλης του νερού. Η ημερήσια ανταλλαγή νερού ήταν 10% του όγκου τις πρώτες 5 ημέρες, αυξήθηκε στο 20% για τις επόμενες 5 ημέρες, σταδιακά στο 100% κατά την ημέρα 25 μετά την εκκόλαψη όταν προσφερόταν τεχνητή τροφή, και 200 % κατά την ημέρα 48 μετά την εκκόλαψη. Το διαλυμένο οξυγόνο μειώθηκε μέχρι την ημέρα 61 μετά την εκκόλαψη από 8.6 σε 5.8 mg/l. Η αλατότητα μετριόταν δύο φορές τη βδομάδα και κυμαινόταν από 36 σε 39 g/l. Η μέση θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια της μελέτης από το ελάχιστο των 15.5° C το Φεβρουάριο, αυξήθηκε σταδιακά στο ετήσιο μέγιστο των 25° C τον Ιούλιο. Ανάμεσα στον Ιούνιο και τον Οκτώβριο, μίγμα θαλασσινού νερού και νερού γεώτρησης χρησιμοποιήθηκε στις δεξαμενές, προκειμένου να αποφευχθούν οι ακραίες θερμοκρασίες, οι οποίες οδηγούν σε ασθένειες.

1.2.2 Παραγωγή πληθυσμών με κυρίαρχο το θηλυκό και το αρσενικό φύλο

Οι διαλογές πραγματοποιήθηκαν περίπου τις ημέρες 66, 130, 180 και 220 μετά την εκκόλαψη των λαρβών και ο διαχωρισμός που πραγματοποιούνταν ήταν 40–60% σε κάθε διαλογή. Ξεκινώντας από την ημέρα 66 μετά την εκκόλαψη τα ψάρια διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μέγεθος, παράγοντας έναν πληθυσμό με μεγάλα άτομα στο L-άκρο και έναν πληθυσμό με μικρά άτομα στο S-άκρο (Εικόνα 1). Κάθε πληθυσμός τοποθετήθηκε σε διαφορετική δεξαμενή. Επιπλέον, διατηρήθηκε και ένας πληθυσμός στον οποίο δεν πραγματοποιήθηκε διαλογή, ως πληθυσμός Μάρτυρας. Η δεύτερη διαλογή πραγματοποιήθηκε την ημέρα 123 μετά την εκκόλαψη στο S-άκρο και την ημέρα 143 μετά την εκκόλαψη στο L-άκρο. Η τρίτη διαλογή πραγματοποιήθηκε την ημέρα 166 και 167 μετά την εκκόλαψη, για τους δύο πληθυσμούς αντίστοιχα, και η τέταρτη την ημέρα 223 και 224. Η πυκνότητα της κάθε δεξαμενής κρατήθηκε σε περίπου 3–6 kg/m³ μετά την κάθε διαλογή. Οι πρώτες δύο διαλογές πραγματοποιήθηκαν με bag-graders εμπορικά διαθέσιμους, οι οποίοι διαχωρίζουν τα ψάρια ανάλογα με το φάρδος τους. Οι τελευταίες δύο διαλογές έγιναν με το χέρι, βασισμένες στο μήκος των ψαριών. Οι πληθυσμοί ενδιάμεσου μεγέθους απορρίφθηκαν (Εικόνα 1). Μετά το τέλος κάθε διαλογής, οι πληθυσμοί που παρέμειναν ήταν ο Μάρτυρας, το L-άκρο και το S-άκρο

1.2.3 Δειγματοληψίες

Δείγματα γονάδων και αίματος πάρθηκαν από την ημέρα 50 μέχρι και την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη (συγκεκριμένα τις ημέρες 56, 98, 151, 198, 248 και 298 μετά την εκκόλαψη). Σε κάθε δειγματοληψία οι γονάδες 50 περίπου ψαριών εξετάζονταν με τη χρήση τεχνικών ιστολογίας για τον καθορισμό του φαινοτυπικού φύλου όσο το δυνατόν γρηγορότερα. Από την ημέρα 248 και μετά, το φύλο μπορούσε να καθοριστεί πλέον και με μικροσκοπική εξέταση της γονάδας. Την ίδια περίοδο, δηλαδή κατά τις δειγματοληψίες στις 248 και 298 ημέρες μετά την εκκόλαψη καθορίστηκαν το μήκος, το βάρος, και όπου ήταν δυνατό ο γοναδοσωμικός δείκτης [GSI=(βάρος γονάδας/σωματικό βάρος ατόμου)*100].

Η ανάπτυξη των τριών πληθυσμών (ολικό μήκος και υγρό βάρος) μετρήθηκε κάθε 15–25 ημέρες. Η τελική αναλογία φύλου σε αυτούς καθορίστηκε στη δειγματοληψία των 298 ημερών μετά την εκκόλαψη. Κατά τον καθορισμό της αναλογίας του φύλου των τριών πληθυσμών πραγματοποιήθηκε και κατάταξη των αρσενικών ατόμων σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης της γονάδας τους. Ως ώριμα αρσενικά θεωρήθηκαν τα άτομα των οποίων οι όρχεις περιείχαν σπέρμα. Τα ώριμα αρσενικά χωρίστηκαν επιπλέον σε δύο κατηγορίες: τα σπερμιάζοντα αρσενικά, δηλαδή αυτά που παρήγαγαν σχετικά εύκολα σπέρμα μετά από ελαφριά κοιλιακή πίεση και τα αρσενικά με ενδοορχικό σπέρμα (intratesticular sperm, IT σπέρμα) δηλαδή αυτά που είχαν σπέρμα στους όρχεις τους, αλλά αυτό δεν απελευθερωνόταν με κοιλιακή πίεση. Ως ανώριμα αρσενικά θεωρήθηκαν αυτά που δε βρίσκονταν ακόμα στο στάδιο της σπερματογένεσης.

Κατά τις πρώτες δειγματοληψίες η συλλογή των γονάδων των ψαριών ήταν αδύνατη λόγω του μικρού μεγέθους τους, γι' αυτό και συλλεγόταν είτε ολόκληρο το ιχθύδιο (ημέρα 50 μετά την εκκόλαψη), είτε αφαιρούταν το κεφάλι (ημέρα 150 μετά την εκκόλαψη). Την ημέρα 200 μετά την εκκόλαψη συλλεγόταν ολόκληρο το τμήμα της νηκτικής κύστης των ψαριών, όπου και ήταν προσκολλημένες οι γονάδες και την ημέρα 250 και 300 μετά την εκκόλαψη συλλεγόταν μόνο δείγμα γονάδας. Τα δείγματα των ιχθυδίων και των γονάδων διατηρούνταν σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης:γλουταραλδεΰδης 4:1 (4F:1G) σε πλαστικά δοχεία των 7 ml μέχρι την ιστολογική τους επεξεργασία (Παράρτημα Ι).

Τα δείγματα του αίματος πάρθηκαν από την ουραία φλέβα/αρτηρία των ψαριών με τη χρήση ηπαρινοποιημένων συριγγών του 1 ή των 2.5 ml, από την περιοχή ανάμεσα στον ουρογεννητικό πόρο και την ουρά. Τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 5 ml και φυγοκεντρήθηκαν στους 4° C στις 6000 r.p.m. για 15 λεπτά. Τα δείγματα του πλάσματος τοποθετήθηκαν σε δοχεία eppendorf των 0.5 ml. Στη συνέχεια κρατήθηκαν στους -84° C μέχρι την ανάλυσή τους.

Οι γονάδες συλλέχτηκαν προκειμένου να καθοριστεί το φύλο στους δύο πληθυσμούς. Δείγματα γονάδων συλλέχτηκαν επιπλέον για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των γοναδικών στεροειδών ορμονών τεστοστερόνη (T), 11-κετοτεστοστερόνη (11-KT) και οιστραδιόλη (E2) σε αυτές. Τα δείγματα του πλάσματος χρησιμοποιήθηκαν για να

αναλυθούν τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών και σε αυτό. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του επιπέδου των στεροειδών ορμονών ήταν η ELISA (ενζυμική ανοσοανάλυση) (Παράρτημα II).

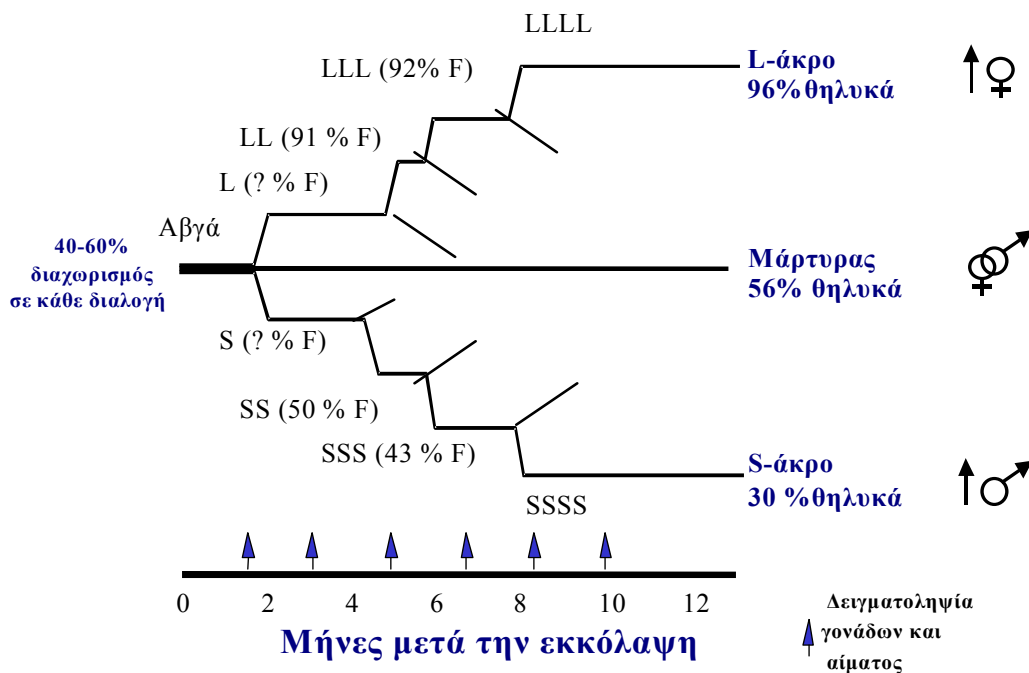
1.2.4 Ανάλυση δεδομένων

Στις γραφικές παραστάσεις της ανάπτυξης των ιχθυδίων (μήκος και υγρό βάρος των τριών πληθυσμών κατά τη διάρκεια του πειράματος, μήκος και υγρό βάρος την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη και GSI, μήκος και βάρος σε σχέση με το στάδιο ωρίμανσης του κάθε φύλου) το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο±τυπικό σφάλμα. Οι συγκρίσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς Μάρτυρα, L-άκρο και S-άκρο για την αύξηση έγιναν με τη χρήση ANOVA και στη συνέχεια με το Fisher's Protected Least Significance Difference test (Fisher's PLSD, $P < 0.05$). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Statview, (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, California).

1.3 Αποτελέσματα

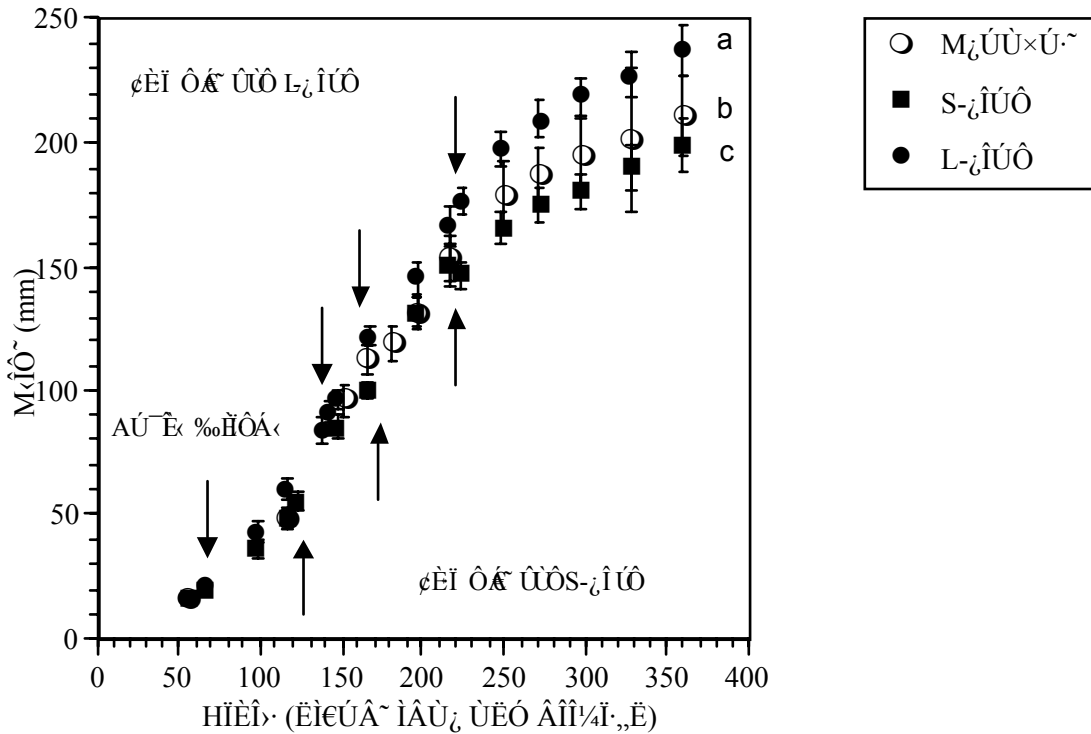
Το ποσοστό των θηλυκών στον πληθυσμό Μάρτυρα ήταν 56%, στον πληθυσμό L-άκρο 96% και στον πληθυσμό S-άκρο 30% (Εικόνα 2). Δηλαδή επιτεύχθηκε η δημιουργία δύο πληθυσμών, μεγάλων και μικρών ατόμων, με κυρίαρχο φύλο το θηλυκό στο L-άκρο και το αρσενικό στο S-άκρο.

Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι από πολύ μικρή ηλικία τα μεγαλύτερα άτομα αναπτύσσονται σε θηλυκά και τα μικρότερα σε αρσενικά, καθώς ήδη από τη δεύτερη διαλογή μεγέθους την ημέρα 120 μετά την εκκόλαψη το ποσοστό των θηλυκών ατόμων στον πληθυσμό των μεγάλων ψαριών αυξήθηκε στο 91%.

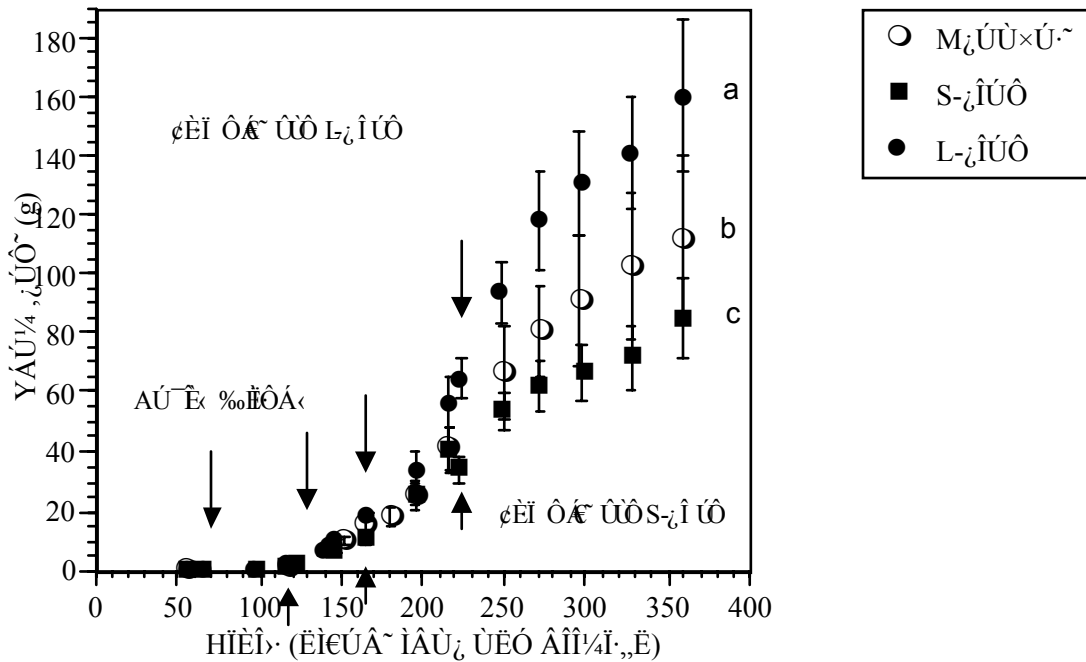


Εικόνα 2. Αναλογίες φύλου στον αρχικό πληθυσμό (Μάρτυρα) και τους δύο πληθυσμούς (L-άκρο, S-άκρο) μετά από τις εκάστοτε διαλογές μεγέθους. Η διαπίστωση του φύλου έγινε μετά από ιστολογική εξέταση των γονάδων ($n = 50$) πριν από την ημέρα 250 μετά την εκκόλαψη, ενώ μετά την ημέρα 250 με μικροσκοπική εξέταση των γονάδων.

Οι τρεις πληθυσμοί (Μάρτυρας, L-άκρο και S-άκρο) διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους κατά τη διάρκεια του πειράματος (2-way ANOVA, Fisher's PLSD, $P < 0.05$), τόσο όσο αφορά στο μήκος (Εικόνα 3), όσο και στο βάρος (Εικόνα 4). Στο τέλος του πειράματος, την ημέρα 360 μετά την εκκόλαψη, το μέσο μήκος των πληθυσμών L-άκρο, Μάρτυρα και S-άκρο ήταν 237 ± 10.3 , 211 ± 16.2 και 199 ± 10.4 mm αντίστοιχα (Εικόνα 3). Παρόμοια, όσο αφορά στο βάρος των τριών πληθυσμών, αυτό ήταν αντίστοιχα 160.3 ± 25.2 , $112.1 \pm 28.$ και 85.6 ± 13.4 g (Εικόνα 4).

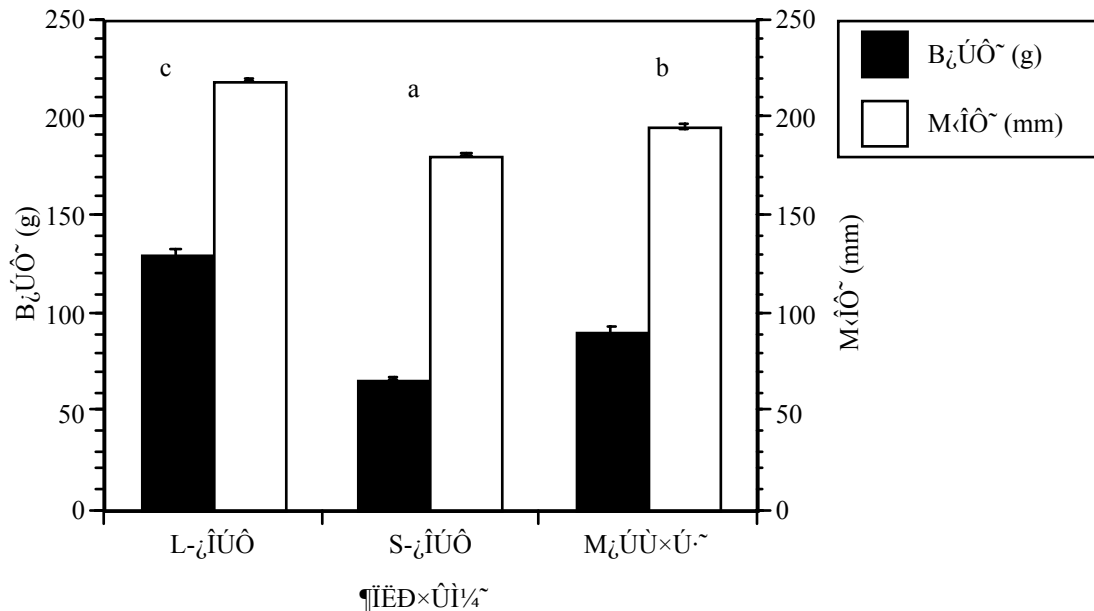


Εικόνα 3. Ανάπτυξη μήκους λαβρακιού στους πληθυσμούς L-άκρο, S-άκρο και Μάρτυρα κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου ζωής τους. Τα τόξα υποδεικνύουν τις διαδοχικές διαλογές που πραγματοποιήθηκαν στους πληθυσμούς L-άκρο και S-άκρο. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα από $n = 20-100$ ψάρια ανά ομάδα για κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας. Με διαφορετικά λατινικά γράμματα αναγράφονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (2-way ANOVA, Fisher's PLSD, $P < 0.05$).



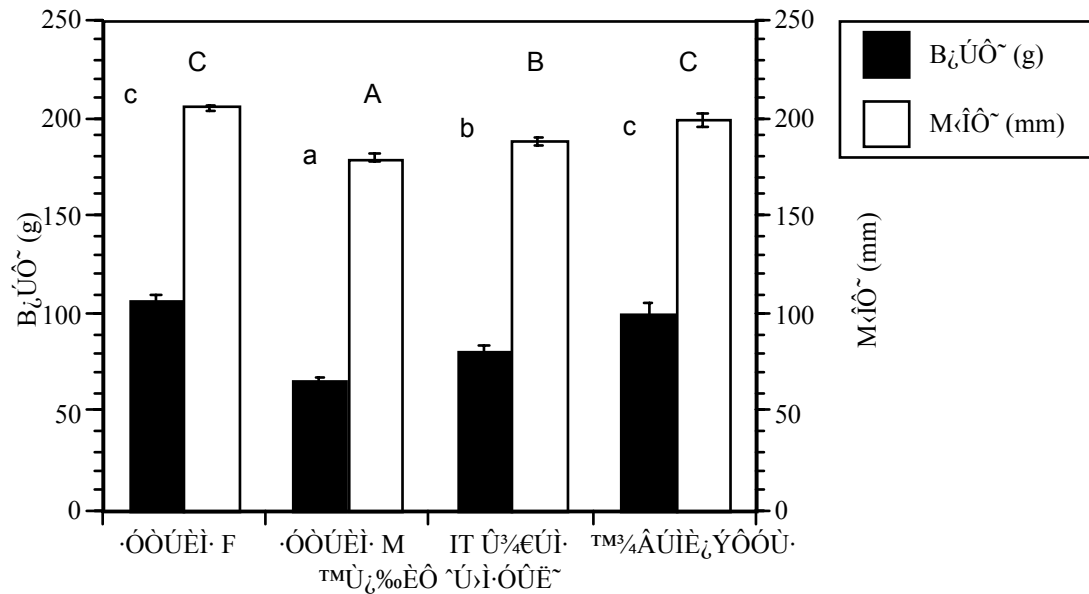
Εικόνα 4. Ανάπτυξη υγρού βάρους λαβρακιού στους πληθυσμούς L-άκρο, S-άκρο και Μάρτυρα κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου ζωής τους. Τα τόξα υποδεικνύουν τις διαδοχικές διαλογές που πραγματοποιήθηκαν στους πληθυσμούς L-άκρο και S-άκρο. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα από n= 20-100 ψάρια ανά ομάδα για κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας. Με διαφορετικά λατινικά γράμματα υποδεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (2-way ANOVA, Fisher's PLSD, P<0.05).

Όσο αφορά στη διαφορά στην ανάπτυξη ανάμεσα στα δύο φύλα, τα άτομα στο L-άκρο απέκτησαν σχεδόν το διπλάσιο βάρος από τα άτομα στο S-άκρο κατά την ημέρα 300 μετά την εκκόλαση (Εικόνα 5). Το ποσοστό της διαφοράς στο υγρό βάρος ανάμεσα στα θηλυκά και τα αρσενικά άτομα ήταν + 37%.

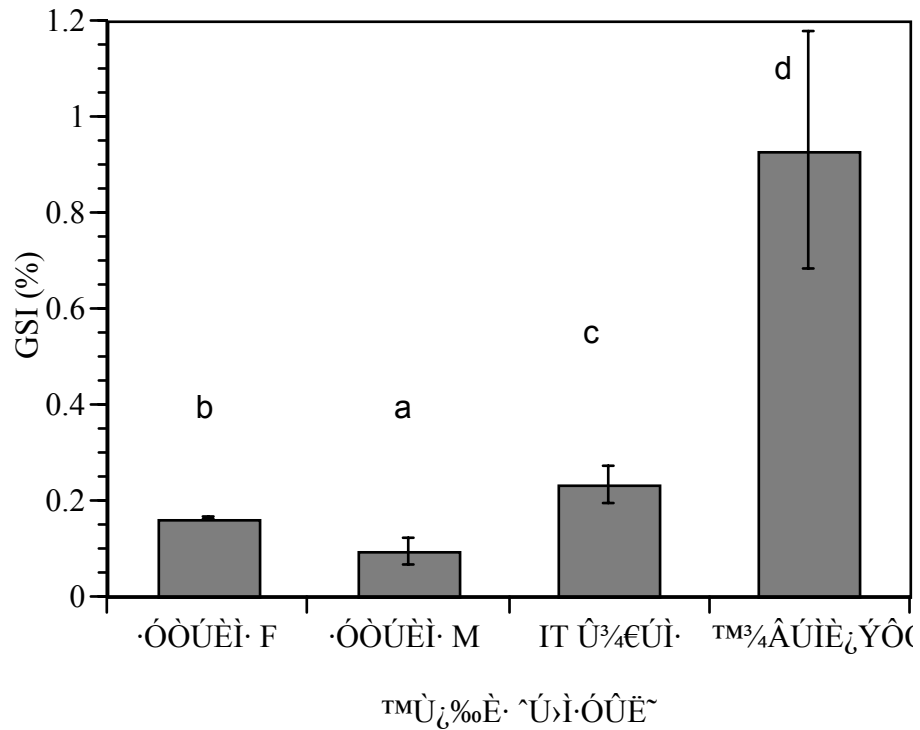


Εικόνα 5. Ολικό μήκος και βάρος των τριών πληθυσμών λαβρακιού (L-άκρο, S-άκρο και Μάρτυρα) την ημέρα 298 μετά την εκκόλαση (n = 89-101). Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεικνύονται με διαφορετικά λατινικά γράμματα (ANOVA, Fisher's PLSD, P<0.05).

Τα δεδομένα του υγρού βάρους σώματος και του ολικού μήκους σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης της γονάδας των ψαριών στους τρεις πληθυσμούς φαίνονται στην Εικόνα 6. Ως κριτήριο για την ωρίμανση των θηλυκών ατόμων χρησιμοποιήθηκε η παρουσία λεκιθικών ωοκυττάρων στις ωοθήκες, ενώ τα αρσενικά άτομα θεωρήθηκαν ώριμα όταν υπήρχαν σπερματοζώαρια στις κύστες τους. Το μεγαλύτερο μήκος και βάρος είχαν τα θηλυκά άτομα, ενώ στα αρσενικά το μέγεθος αυξανόταν σύμφωνα με τη σχέση ανώριμα αρσενικά < αρσενικά με ενδοορχικό σπέρμα (IT σπέρμα) < σπερμιάζοντα αρσενικά. Ο γοναδοσωμικός δείκτης GSI αντίστοιχα έδωσε τη μεγαλύτερη τιμή του για τα σπερμιάζοντα αρσενικά άτομα, 5 φορές περίπου μεγαλύτερη από αυτές που σημειώθηκαν για τα θηλυκά άτομα, τα ανώριμα αρσενικά ή τα αρσενικά που εμφάνιζαν ενδοορχικό σπέρμα (Εικόνα 7).

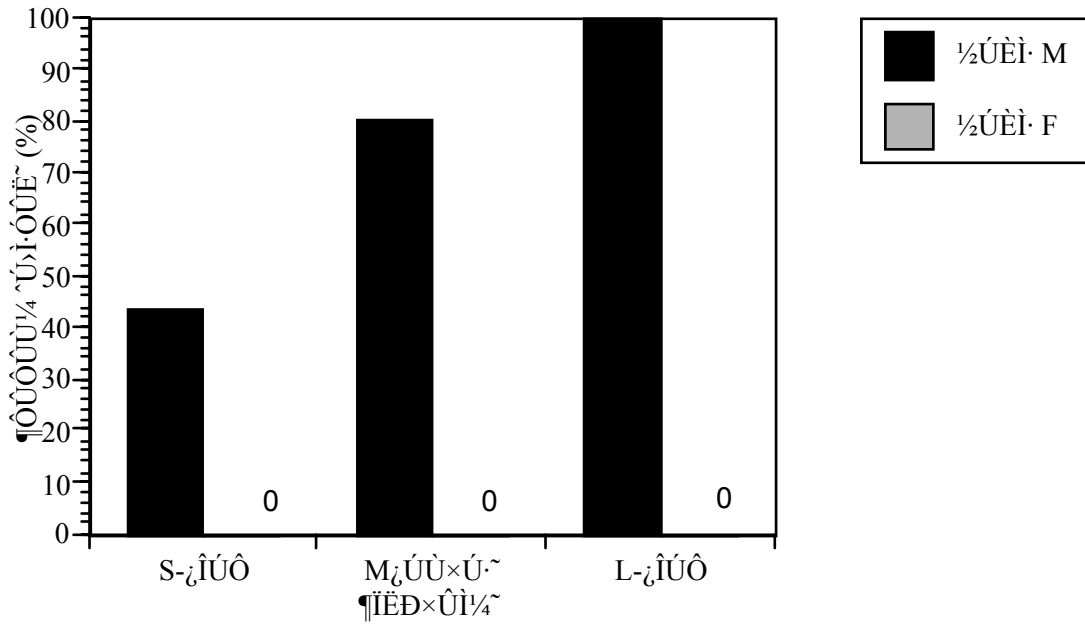


Εικόνα 6. Υγρό βάρος και ολικό μήκος θηλυκών και αρσενικών λαβρακιών ($n = 20-184$) σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης της γονάδας τους από όλους τους πληθυσμούς την ημέρα 298 μετά την εκκόλαψη. Τα ώριμα αρσενικά χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: τα σπερμιάζοντα αρσενικά, δηλαδή αυτά που παρήγαγαν σχετικά εύκολα σπέρμα μετά από ελαφριά κοιλιακή πίεση και τα αρσενικά με ενδοορχικό σπέρμα (intratesticular sperm, IT σπέρμα) δηλαδή αυτά που είχαν σπέρμα στους όρχεις τους, αλλά αυτό δεν απελευθερωνόταν με κοιλιακή πίεση. Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεικνύονται με διαφορετικά μικρά λατινικά γράμματα για το βάρος και διαφορετικά κεφαλαία λατινικά γράμματα για το μήκος (ANOVA, Fisher's PLSD, $P < 0.05$).



Εικόνα 7. Γοναδοσωμικός δείκτης (n =4-131) σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης της γονάδας για τους τρεις πληθυσμούς την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση ANOVA, Fisher's, PLSD, P<0.05. Με διαφορετικά λατινικά γράμματα δεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Ως ώριμα αρσενικά θεωρήθηκαν τα άτομα των οποίων οι όρχεις περιείχαν σπέρμα. Τα ώριμα αρσενικά χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες (δες Εικόνα 6)

Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι ένα μεγάλο μέρος των αρσενικών ατόμων ωριμάζουν τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, ενώ την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη δεν εμφανίζεται κανένα ώριμο θηλυκό στους τρεις πληθυσμούς. Τα ποσοστά ωρίμανσης των αρσενικών ατόμων για τον πληθυσμό Μάρτυρα και το S-άκρο βρέθηκαν να είναι 80.6 και 43.8 % αντίστοιχα, ενώ για το L-άκρο το ποσοστό αυτό έφτασε στο 100%. Το μέγεθος φαίνεται να σχετίζεται θετικά με την πρόωρη ωρίμανση στα αρσενικά άτομα, καθώς στον πληθυσμό με τα μεγαλύτερα ψάρια όλα τα αρσενικά ήταν αναπαραγωγικά ώριμα άτομα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ποσοστό ώριμων ατόμων λαβρακιού στους τρεις πληθυσμούς στο τέλος του πρώτου χρόνου ανάπτυξης. Σε κανένα πληθυσμό δεν παρατηρήθηκαν ώριμα θηλυκά. Ως ώριμα άτομα θεωρήθηκαν για τα θηλυκά εκείνα που έχουν λεκιθικά ωοκύτταρα στις ωοθήκες τους και ως ώριμα αρσενικά εκείνα των οποίων οι κύστεις περιέχουν σπερματοζώαρια.

1.4 Συζήτηση

Παρόλο που ο μηχανισμός φυλοκαθορισμού στο λαβράκι παραμένει άγνωστος, ακόμα και μετά την πρόκληση γυνογένεσης, ο γενετικός μηχανισμός του τύπου ZW/ZZ, σε συνδυασμό με επιδράσεις του περιβάλλοντος, έχει προταθεί ως πιθανός για το λαβράκι (Felip et al, 2002). Επιδράσεις της θερμοκρασίας στη διαφοροποίηση φύλου στο λαβράκι έχουν ήδη καταδειχτεί από τους Blázquez et al. (1998a), Pavlidis et al. (2000), Saillant et al. (2002), Koumoundouros et al. (2002) και Mylonas et al. (2003). Η θερμοκρασία ενδέχεται να επηρεάζει τη διαδικασία της διαφοροποίησης φύλου στο λαβράκι μέσω της επίδρασής της στη δραστηριότητα της αρωματάσης, του ενζύμου που μετατρέπει την T σε E2, και επομένως στη σύνθεση των οιστρογόνων (González και Pifferrer, 2002).

Στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε ότι με τη χρήση εντατικών διαλογών είναι δυνατή η δημιουργία πληθυσμών λαβρακιού με κυρίαρχα τα θηλυκά ή τα αρσενικά άτομα. Μάλιστα, φάνηκε ότι ήδη μετά από τη δεύτερη διαλογή, περίπου κατά τον τρίτο μήνα μετά την εκκόλαψη των ιχθυδίων, το ποσοστό των θηλυκών ατόμων στο L-άκρο ήταν 91%. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι τα θηλυκά άτομα δεν ωρίμασαν κατά τον πρώτο χρόνο ζωής τους και απέκτησαν το διπλάσιο περίπου βάρος από τα αρσενικά την ημέρα 298 μετά την εκκόλαψη θα μπορούσε να υποστηρίξει τη χρήση διαλογών μεγέθους ως την κατάλληλη μεθοδολογία για τη δημιουργία πληθυσμών λαβρακιού με κυρίαρχα τα θηλυκά άτομα. Σίγουρα όμως, υπογραμμίζει το πλεονέκτημα της δημιουργίας μονοφυλετικών πληθυσμών θηλυκών ατόμων, τα οποία αυξάνονται γρηγορότερα και δεν επενδύουν ενέργεια στην ωρίμανση των γονάδων τους, σε αντίθεση με τα αρσενικά.

Οι Saillant et al. (2003a) μελέτησαν την επίδραση της πυκνότητας, των διαλογών μεγέθους και των γονικών παραγόντων στη διαφοροποίηση φύλου του λαβρακιού κατά την εντατική του καλλιέργεια. Η πυκνότητα δε φάνηκε να έχει επίδραση στην αναλογία φύλου που προέκυψε, υποδεικνύοντας ότι οι υψηλές πυκνότητες που χρησιμοποιούνται κατά την καλλιέργεια του λαβρακιού δε σχετίζονται με την υπερβολική παρουσία αρσενικών στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των γονέων, τόσο της μητέρας όσο και του πατέρα, πράγμα που υποστηρίζει

την παρουσία γενετικής ποικιλότητας στην αναλογία φύλου. Οι επαναλαμβανόμενες διαλογές μεγέθους που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη από την ημέρα 84 έως την ημέρα 199 μετά τη γονιμοποίηση δεν είχαν επίδραση στις τελικές αναλογίες φύλου (Saillant et al., 2003c). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι το πρωτόκολλο εντατικών διαλογών που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι διαφορετικό από αυτό της παρούσας μελέτης. Οι διαλογές μεγέθους στην παρούσα μελέτη διήρκεσαν περισσότερο (ξεκινώντας από την ημέρα 66 μετά την εκκόλαψη και καταλήγοντας στην ημέρα 220 μετά την εκκόλαψη) και μετά την πρώτη διαλογή πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια πάνω στους μεγάλους και τους μικρούς πληθυσμούς, απορρίπτοντας τα μικρά ψάρια από το L-άκρο και τα μεγάλα ψάρια από το S-άκρο. Ο στόχος μας ήταν η παραγωγή πληθυσμών με κυρίαρχο το ένα φύλο. Αντίθετα, στη μελέτη των Saillant et al. (2003a), οι διαλογές διαχώριζαν τον αρχικό πληθυσμό σε τρεις ομάδες μεγέθους και οι περαιτέρω διαδοχικές διαλογές πραγματοποιούνταν στην ομάδα των μεσαίων ατόμων. Αυτό έγινε σε μια προσπάθεια να εξεταστεί η επίδραση της χρήσης των εντατικών διαλογών που πραγματοποιούνται στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας κατά την εκτροφή του είδους αυτού, προς αποφυγή του φαινομένου του κανιβαλισμού, στις τελικές αναλογίες φύλου των παραγόμενων πληθυσμών.

Οι Saillant et al. (2002) αναφέρουν ότι η αναλογία φύλου στους πληθυσμούς λαβρακιού μπορεί να μεταβληθεί με την επιλογή γεννητόρων, των οποίων οι απόγονοι θα δώσουν το επιθυμητό ποσοστό θηλυκών ατόμων. Λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο γενότυπο και τη θερμοκρασία για τον καθορισμό του φύλου στο λαβράκι που καταδείχτηκε στη συγκεκριμένη εργασία προτείνεται ότι ο περιβαλλοντικός καθορισμός φύλου θα μπορούσε να εξαλειφθεί με την επιλογή γεννητόρων μη ευαίσθητων στην επίδραση του περιβάλλοντος που προκαλεί αρσενικά. Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει και τη χρήση εντατικών διαλογών μεγέθους για τη δημιουργία πληθυσμών λαβρακιού με κυρίαρχα τα θηλυκά άτομα, με την προϋπόθεση, βέβαια, αυτή η διαφορά μεγέθους ανάμεσα στα θηλυκά και τα αρσενικά άτομα που βρέθηκε την ημέρα 298 μετά την εκκόλαψη να διατηρείται και το δεύτερο χρόνο ζωής των ψαριών, μέχρι εκείνα να φτάσουν το εξαλιεύσιμο μέγεθος.

Στην μελέτη που διερευνήθηκε η επίδραση των εντατικών διαλογών στις τελικές αναλογίες φύλου των πληθυσμών (Saillant et al., 2003c), τα περισσότερα θηλυκά βρέθηκαν στους πληθυσμούς με τα μεγαλύτερα ψάρια ήδη από την ημέρα 84 μετά τη γονιμοποίηση, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα θηλυκά ξεκινούν να αυξάνονται γρηγορότερα από τα αρσενικά από πολύ μικρή ηλικία, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η μορφολογική διαφοροποίηση φύλου. Σε μια άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε τόσο η θεραπεία με θερμοκρασία όσο και η χρήση διαλογών για τη δημιουργία μονοφυλετικών πληθυσμών λαβρακιού (Koumoundouros et al., 2002), βρέθηκε επίσης ότι η αναλογία φύλου στο λαβράκι συσχετίζεται με το ρυθμό ανάπτυξης των ιχθυδίων πολύ πριν τη διαφοροποίηση των γονάδων. Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι μετά τη δεύτερη διαλογή, περίπου την ημέρα 120 μετά την εκκόλαψη, το ποσοστό των θηλυκών ατόμων στον πληθυσμό με τα μεγάλα ψάρια έφτασε στο 91%, υποστηρίζοντας έτσι επίσης τη θέση ότι τα θηλυκά άτομα από πολύ μικρή ηλικία, και πριν ακόμα από τη διαφοροποίηση των γονάδων τους, είναι μεγαλύτερα από τα αρσενικά.

Όσον αφορά στη διαφορά στην ανάπτυξη των δύο πληθυσμών, στην παρούσα μελέτη η διαφορά στην ανάπτυξη ανάμεσα στο L-άκρο και το S-άκρο έφτασε την ημέρα 298 μετά την εκκόλαψη στο 37% για το υγρό βάρος. Σε μελέτη των Saillant et al. (2001), όπου παρατηρήθηκε η ανάπτυξη 100 θηλυκοποιημένων με οιστραδιόλη λαβρακιών και άλλων 200 ατόμων πληθυσμού μάρτυρα, βρέθηκε ότι τα αρσενικά άτομα παρέμειναν σημαντικά μικρότερα τόσο από τα θηλυκά όσο και από τα θηλυκοποιημένα ψάρια από την ηλικία των 10 μηνών. Μάλιστα, η διαφορά ανάμεσα στα θηλυκά και τα αρσενικά άτομα στην ηλικία των 10 μηνών (πριν από το μέσο μήκος των 12.3 cm) έφτασε στο 67%, ενώ στην ηλικία των 12 μηνών ήταν περίπου 40%, σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, όπου η διαφορά αυτή βρέθηκε να είναι 37%.

Όσον αφορά στην πρόωρη ωρίμανση των αρσενικών, φάνηκε στην παρούσα μελέτη ότι αυτή σχετίζεται θετικά με το μήκος των ατόμων, αφού την ημέρα 298 μετά την εκκόλαψη στους τρεις πληθυσμούς μας, δηλαδή στο L-άκρο, το Μάρτυρα και το S-άκρο, το αντίστοιχο ποσοστό των αναπαραγωγικά ώριμων αρσενικών ατόμων ήταν 100, 80.6 και 43.8 % αντίστοιχα. Σε αντίστοιχη μελέτη των Saillant et al. (2003b), αναφέρεται ότι το 28% των ψαριών ήταν αναπαραγωγικά ώριμα αρσενικά και ότι αυτά είχαν

μεγαλύτερο μήκος από τα υπόλοιπα αρσενικά άτομα του μελετούμενου πληθυσμού, παρατήρηση που έγινε και στην παρούσα μελέτη. Με βάση τις παραπάνω διαπιστώσεις, φαίνεται ότι τα πιο μεγάλα από τα αρσενικά άτομα λαβρακιού ωριμάζουν πρόωρα τον πρώτο χρόνο της ζωής τους. Αυτό σημαίνει ότι τα άτομα αυτά θα έρθουν δύο φορές σε φάση αναπαραγωγής (10-13, 22-23 μήνες) πριν την εξαλίευσή τους και έτσι θα επενδύσουν ενέργεια στην ανάπτυξη του ορχικού τους ιστού και της αναπαραγωγικής τους συμπεριφοράς, σε βάρος της σωματικής τους αύξησης. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι τα αρσενικά άτομα γενικά είναι μικρότερα από τα θηλυκά τονίζει τη σημασία παραγωγής πληθυσμών με κυρίαρχο το θηλυκό φύλο στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Επιπλέον, τονίζει τη σημασία της παρούσας μελέτης, η οποία προτείνει τη χρήση διαλογών ως κατάλληλη πειραματική μεθοδολογία για την περαιτέρω μελέτη πληθυσμών λαβρακιού που να αποτελούνται κυρίως από θηλυκά και από αρσενικά άτομα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ

2.1 Εισαγωγή.

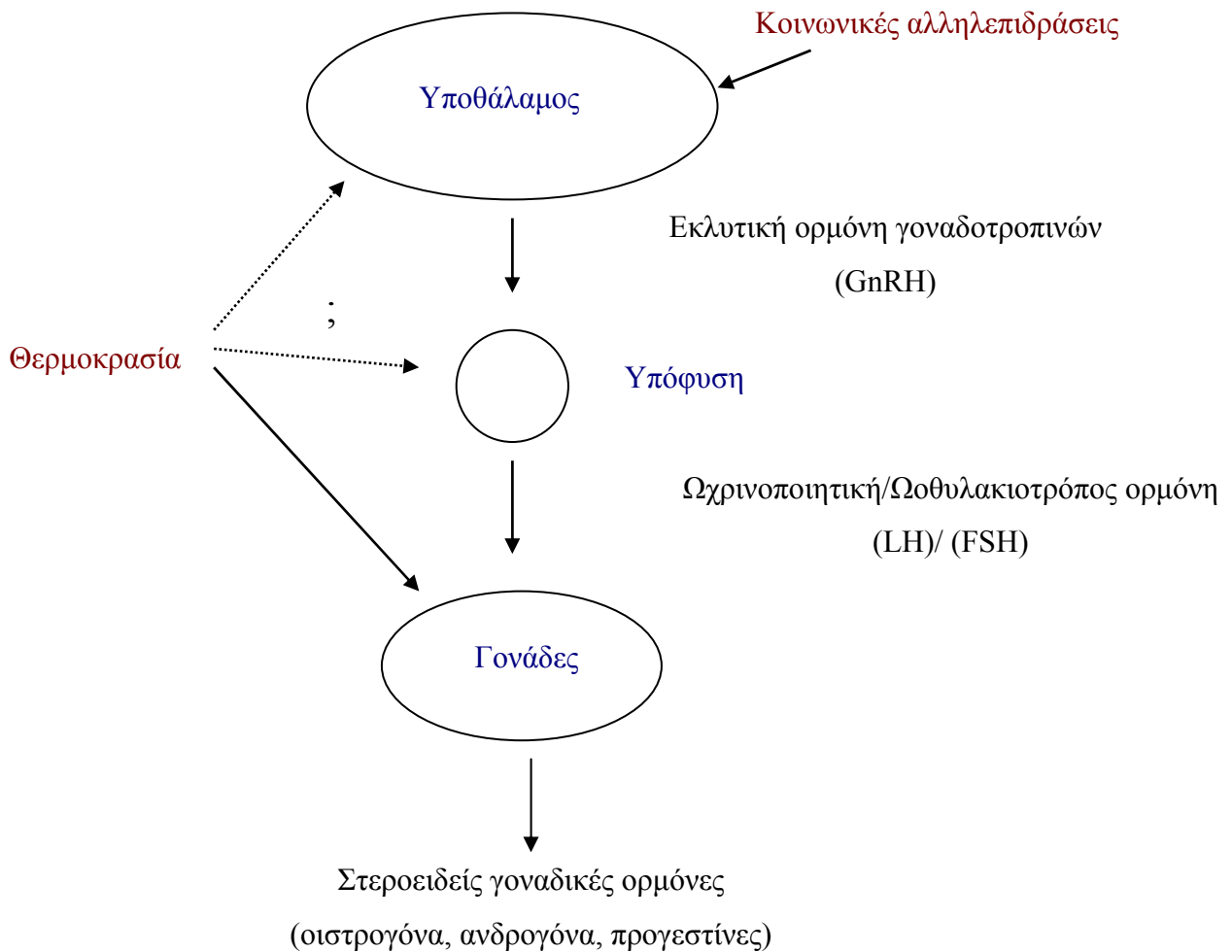
Για την έκφραση του φύλου, δύο διαδικασίες θεωρούνται υπεύθυνες: Ο όρος "καθορισμός φύλου" (sex determination) χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις γενετικές και περιβαλλοντικές διαδικασίες που επηρεάζουν τη διαφοροποίηση φύλου, ενώ ο όρος "διαφοροποίηση φύλου" (sex differentiation) περιγράφει τη φυσιολογική πραγματοποίηση αυτών των γεγονότων από την άποψη της ορχικής ή ωοθηκικής ανάπτυξης (Devlin και Nagahama, 2002),.

Όσον αφορά στον καθορισμό του φύλου, η μεγαλύτερη πλειοψηφία των ψαριών είναι γονοχωριστικά, δηλαδή ο τρόπος καθορισμού του φύλου τους είναι γενετικός. Παρόλο που είναι γενικά αποδεκτό ότι στα ψάρια, όπως και σε άλλα σπονδυλωτά, το φύλο έχει γενετική βάση, οι εξειδικευμένοι μηχανισμοί με τους οποίους καθορίζεται το γενετικό φύλο παραμένουν ασαφείς (Hunter και Donaldson, 1983). Κανένα μοντέλο καθορισμού του φύλου δεν μπορεί να συμφωνήσει απόλυτα με τα σημερινά δεδομένα για τα ψάρια. Παρόλο που τα περισσότερα είδη ψαριών δεν έχουν κυτταρολογικά αναγνωρίσιμα φυλετικά χρωμοσώματα, τόσο θηλυκά (ZZ/ZW) όσο και αρσενικά (XX/XY) διγαμετικά συστήματα έχουν καταδειχτεί. Μη ετεροσωματικά χρωμοσωμικά συστήματα καθορισμού του φύλου έχουν επίσης αναφερθεί για ορισμένα είδη. Αλλά ακόμα και σε είδη με καλά αναπτυγμένα ετεροσωματικά συστήματα, ο καθορισμός φύλου έχει βρεθεί ευμετάβλητος από εξωτερικούς παράγοντες, όπως άλλα γονίδια (πολυγονιδιακά συστήματα) (Hunter και Donaldson, 1983). Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχτεί η παρουσία ενός νέου μηχανισμού καθορισμού του φύλου στα ψάρια, που για πρώτη φορά αναφέρθηκε για τα ερπετά (Pieau et al., 1999). Αυτός ο τρόπος καθορισμού του φύλου ονομάστηκε περιβαλλοντικός καθορισμός φύλου και αναφέρεται στην επίδραση του περιβάλλοντος στο γενότυπο για τον καθορισμό του φύλου (Piferrer, 2001).

Πιο συγκεκριμένα, στα θηλαστικά, από τη στιγμή που καθορίζεται το φύλο η διαφοροποίηση της γονάδας συνήθως ακολουθεί συγκεκριμένο αναπτυξιακό μονοπάτι

για να παράγει πλήρως διαφοροποιημένους όρχεις ή ωοθήκες (Baroiller και D'Cotta, 2001). Στα ψάρια, όμως, υπάρχουν πολλές εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα όπου η ανάπτυξη της γονάδας μπορεί να επηρεάζεται από διακυμάνσεις τόσο σε εσωτερικούς παράγοντες, όπως η αύξηση και η συμπεριφορά, όσο και από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η ρύπανση (Devlin και Nagahama, 2002). Εδώ συνίσταται και η επίδραση του περιβάλλοντος στον καθορισμό του φύλου των ψαριών. Ο κυριότερος παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη του φύλου στα ψάρια και σε άλλους ποικιλόθερμους οργανισμούς είναι η θερμοκρασία (Strüssman και Patino, 1999). Αλλά και άλλοι παράγοντες, όπως η αλατότητα, το pH, το κοινωνικό περιβάλλον, το φως, η ποιότητα του νερού και η επάρκεια τροφής έχουν αναφερθεί για ορισμένα είδη (Strüssman και Nakamura, 2002).

Ο φυσιολογικός μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο καθορίζεται το φύλο στα ψάρια είναι κατά κοινή ομολογία ο άξονας υποθαλάμου–υπόφυσης–γονάδων (Εικόνα 9). Ο άξονας αυτός αποτελείται κυρίως από νευρώνες του υποθαλάμου που παράγουν την εκλυτική ορμόνη για τις γοναδοτροπίνες (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), από τις γοναδοτροπίνες (ωχρινοποιητική ορμόνη, luteinizing hormone, LH και ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη, follicle stimulating hormone, FSH) που παράγονται και απελευθερώνονται από την υπόφυση και από τη γονάδα ως την κυριότερη περιοχή βιοσύνθεσης στεροειδών ορμονών (με τα ένζυμα μεταβολισμού στεροειδών, τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και ποικιλία άλλων πρωτεϊνών που μεσολαβούν για τη δράση των στεροειδών (Godwin et al., 2003).



Εικόνα 9. Ο άξονας υποθαλάμου–υπόφυσης–γονάδας με τα πιθανά σημεία επίδρασης περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (από τους Godwin et al, 2003). Ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη γοναδοτροπινών, η οποία διεγείρει την έκκριση της ωχρινοποιητικής (LH) και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από την υπόφυση. Αυτές δρουν στη γονάδα, διεγείροντας την έκκριση στεροειδών γοναδικών ορμονών.

Όσον αφορά στη διαφοροποίηση φύλου, τα ψάρια μπορούν να διαχωριστούν σε "διαφοροποιημένα" και σε "αδιαφοροποίητα". Στην πρώτη περίπτωση, η γονάδα διαφοροποιείται απευθείας σε ωοθήκη ή όρχι. Στη δεύτερη περίπτωση πραγματοποιείται σε όλα τα άτομα διαφοροποίηση σε γονάδα που μοιάζει με ωοθήκη. Αργότερα, ένα μέρος των ψαριών σταματούν αυτή τη διαδικασία που εμφανίζεται ως θηλυκή διαφοροποίηση και λαμβάνει χώρα η ορχική διαφοροποίηση (Piferrer, 2001).

Η υποτιθέμενη περιοχή ανάπτυξης της γονάδας ονομάζεται βλαστική ράχη και σχηματίζει μια διαμήκη διόγκωση του μεσοδέρματος που προεκβάλλει στην κοιλιακή κοιλότητα κάθετα στο αναπτυσσόμενο νεφρό και παράλληλα στο ραχιαίο μεσεντέριο (Devlin και Nagahama, 2002). Τα πρωτογενή βλαστικά κύτταρα, που στη συνέχεια θα σχηματίσουν τους γαμέτες, παραμένουν συνδεδεμένα με ενδοδερμικούς ιστούς, και μεταναστεύουν μέσω του ραχιαίου μεσεντερίου στην περιοχή της υποτιθέμενης γονάδας (Devlin και Nagahama, 2002). Όταν η νηκτική κύστη γίνει λειτουργική στο αναπτυσσόμενο ιχθύδιο, οι δύο γονάδες εμφανίζονται προσκολλημένες με μεσεντέρια στις δύο πλευρές αυτής (Foyle, 1993). Η δομή των γονάδων των ψαριών είναι παρόμοια με αυτή άλλων σπονδυλωτών, με βλαστικά και σωματικά κύτταρα, όπου τα δεύτερα υποστηρίζουν τα πρώτα. Τα πρωτογενή βλαστικά κύτταρα είναι παρόμοια στα δύο φύλα και παραμένουν αδιαφοροποίητα μέχρι να εκτεθούν σε ορμονικές ή άλλες επιδράσεις από την αναπτυσσόμενη γονάδα, που τα μετατρέπουν σε σπερματογόνια ή ωογόνια (Devlin και Nagahama, 2002).

Οι όρχεις των τελεόστεων, τυπικά γονοχωριστικοί αλλά μερικές φορές ερμαφρόδιτοι, είναι συνήθως σε ζευγάρια και έχουν οργάνωση σε φύλλα ή σε σωλήνες μέσα στην οποία τα βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται μερικώς μέσα στα κύτταρα Sertoli (Billard, 1986). Το ώριμο σπέρμα απελευθερώνεται σε ένα κεντρικό αγωγό που τελικά οδηγεί σε άλλους αγωγούς. Αυτοί καταλήγουν στο ουρογεννητικό άνοιγμα, που μπορεί να έχει μετατραπεί σε όργανο σε μερικά είδη. Η παραγωγή σπέρματος σε μερικούς τελεόστεους είναι ένα μοναδικό σύγχρονο γεγονός, ενώ σε άλλους είναι κυκλικό ή ακόμα και συνεχές (Redding και Pati•o, 1993).

Οι ωοθήκες των ενήλικων ψαριών είναι γενικά δομημένες σε ζευγάρια προσκολλημένες στη σωματική κοιλότητα και στις δύο μεριές του ραχιαίου μεσεντερίου. Υπάρχουν και εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα, όπου οι δύο ωοθήκες ενώνονται σε μία δομή κατά την ανάπτυξη σε μερικούς τελεόστεους, καθώς και σε μερικά ελασματοβράγχια, όπου μόνο μία ωοθήκη αναπτύσσεται σε κάθε άτομο. Ωαγωγοί υπάρχουν στους περισσότερους τελεόστεους. Όμως, απουσιάζουν στους πετρομύζοντες και στα πετρόχελα και χάνονται δευτερογενώς κατά την ανάπτυξη σε ορισμένα ελασματοβράγχια και τελεόστεους (π.χ. σαλμονοειδή) (Redding και Pati•o, 1993).

Η διαφοροποίηση των γονάδων πραγματοποιείται νωρίτερα στα θηλυκά από ότι στα αρσενικά ψάρια (Feist et al., 1990• Baroiller et al., 1999) και ο βασικός τρόπος αναγνώρισης του θηλυκού φύλου κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης είναι η αύξηση του αριθμού των βλαστικών κυττάρων (Nagahama, 1999) και η διαίρεση των σωματικών κυττάρων για το σχηματισμό της ωοθηκικής κοιλότητας (Nakamura, 1998• Patino et al., 1996• Hendry et al., 2000• Piferrer, 2001). Η θετική αναγνώριση της μορφολογικής ορχικής διαφοροποίησης από τα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων είναι δύσκολη, καθώς τα βλαστικά κύτταρα σε γονάδες που προορίζονται να γίνουν όρχεις συνήθως παραμένουν αδιαφοροποίητα για μεγάλη χρονική περίοδο. Ο σχηματισμός των απαγωγών σωλήνων, οι οποίοι σχηματίζονται με ένα μόνο τρόπο σε αντίθεση προς την ωοθηκική κοιλότητα (στενά κενά σχηματίζονται στο στρωματικό ιστό) είναι ένα από τα κριτήρια αναγνώρισης της ορχικής διαφοροποίησης (Nakamura et al., 1988). Επιπλέον, για τα αρσενικά άτομα η γονάδα θεωρείται διαφοροποιημένη όταν εμφανιστούν σπερματογόνια, γίνει καταμερισμός των βλαστικών κυττάρων και αναπτυχθεί ο αγγειώδης ιστός, η ορχική φλέβα και αρτηρία και οι σπερματικοί αγωγοί (Piferrer, 2001).

Σκοπός του παρόντος τμήματος της μελέτης ήταν καταρχάς η ταυτοποίηση του φύλου στους διαλεγμένους πληθυσμούς (Κεφάλαιο 1), πριν από το στάδιο όπου το φύλο γίνεται ορατό με μικροσκοπική εξέταση της γονάδας, δηλαδή πριν την ημέρα 250 μετά την εκκόλαψη. Κατά δεύτερον, σκοπός ήταν η περιγραφή της οντογένεσης της διαφοροποίησης του φύλου σε καλλιεργούμενους πληθυσμούς λαβρακιού και η διερεύνηση των διαφορών με προηγούμενη μελέτη (Roblin και Bruslé, 1983), η οποία πραγματοποιήθηκε πριν από τη ραγδαία ανάπτυξη νέων μεθόδων παραγωγής λαβρακιού. Οι νέες αυτές μέθοδοι είχαν σαν αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση στη σωματική ανάπτυξη των παραγόμενων πληθυσμών. Πιθανότατα η γρηγορότερη αυτή αύξηση των ατόμων να επιδρά και στη διαφοροποίηση των γονάδων τους, επιταχύνοντάς την.

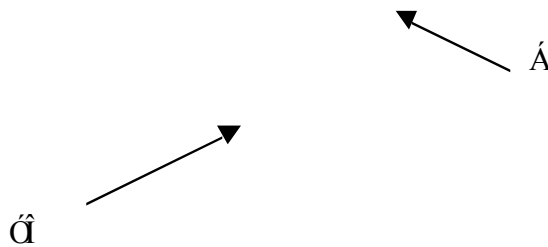
2.2 Υλικά και μέθοδοι.

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από την ημέρα 50 μέχρι την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη, καθόλη τη διάρκεια της περιόδου διαφοροποίησης φύλου του λαβρακιού, όπως καθορίστηκε από τους Roblin και Bruslé (1983). Ο τρόπος συλλογής των δειγμάτων περιγράφεται στο Κεφάλαιο 1. Μετά τη συλλογή των δειγμάτων των ιχθυδίων ηλικίας 50-100 ημερών μετά την εκκόλαψη, πραγματοποιούνταν αφαίρεση της περιοχής του κεφαλιού και αποκοπή του ραχιαίου τμήματος του σώματος του ψαριού πάνω από τη σπονδυλική στήλη (συμπεριλαμβανομένης και της σπονδυλικής στήλης), καθώς και του τμήματος της ουράς από το τελικό σημείο της σπλαγγχνικής κοιλότητας προς τα πίσω. Στις επόμενες δειγματοληψίες (200-300 ημέρες μετά την εκκόλαψη) συλλέγονταν μόνο οι γονάδες των ψαριών.

Τα δείγματα φυλάσσονταν σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΰδης-γλουταραλδεΰδης 4:1 (McDowell και Trump, 1976) και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν έγκλεισή τους σε μεθακρυλική ρητίνη Tecnovit 7100 (Kulzer Hereaus, Γερμανία). Η πλήρης περιγραφή του πρωτοκόλλου της ιστολογίας που χρησιμοποιήθηκε βρίσκεται στο Παράρτημα I. Το κόψιμο των τομών (πάχους 3-5 μm) έγινε σε μικροτόμο Biocut 2035 (Reichert Jung, Γερμανία). Η χρώση των αντικειμενοφόρων πραγματοποιήθηκε με τις χρωστικές Polychrome I/Polychrome II (Bennett et al., 1976) και η παρατήρησή τους έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus CH-2, (Αμβούργο, Γερμανία).

2.3 Αποτελέσματα.

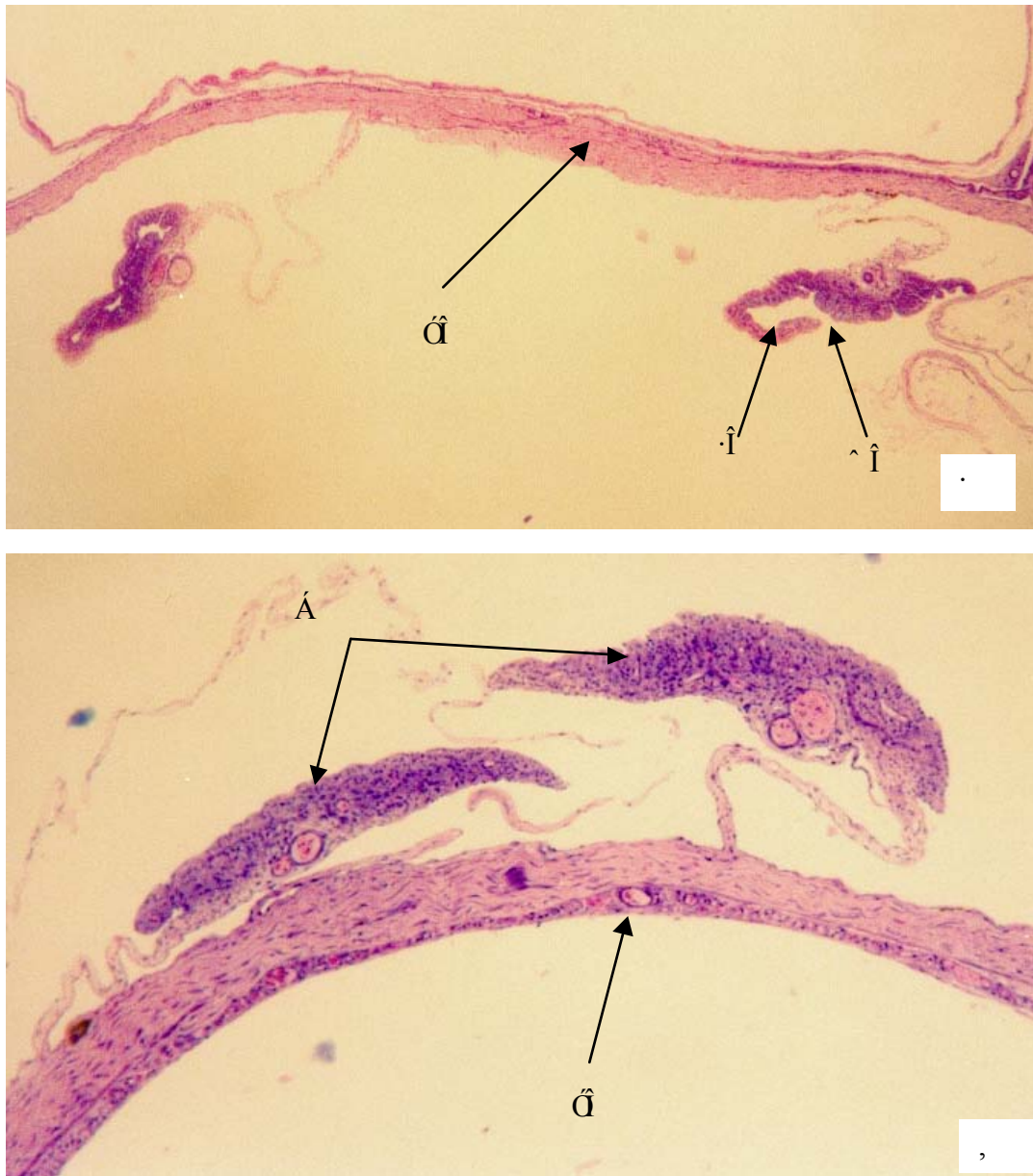
Στις ηλικίες 50 και 100 ημερών οι γονάδες παρέμεναν αδιαφοροποίητες (Εικόνα 10). Αποτελούνταν από σωματικά στοιχεία όπως επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, ίνες κολλαγόνου και αιμοφόρα αγγεία, με απομονωμένα βλαστικά κύτταρα ακανόνιστα διασκορπισμένα, κυρίως στην περιφέρεια του ιστού.



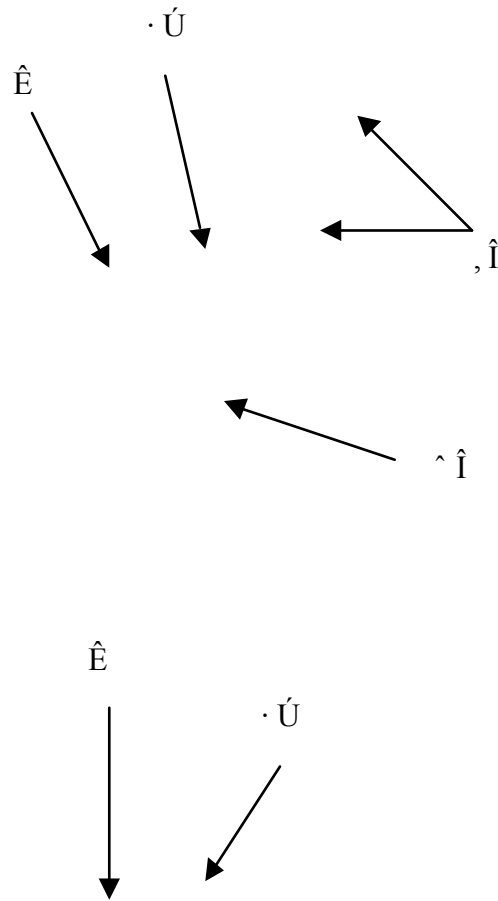
Εικόνα 10. Αδιαφοροποίητη γονάδα λαβρακιού 100 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Η γονάδα (γ) είναι προσκολλημένη στο τοίχωμα της νηκτικής κύστης ($\nu\kappa$) του ατόμου.

Ο πρώτος εντοπισμός αρσενικών και θηλυκών γονάδων πραγματοποιήθηκε την ημέρα 150 μετά την εκκόλαψη. Ο κυριότερος τρόπος διαχωρισμού των δύο φύλων σε αυτή την ηλικία είναι η εμφάνιση του σχηματισμού της ωοθηκικής κοιλότητας στα θηλυκά ψάρια (Εικόνες 11, 12). Τα θηλυκά άτομα διαφοροποιούνταν νωρίτερα από τα αρσενικά, τα οποία παρέμεναν αδιαφοροποίητα την ημέρα 150 μετά την εκκόλαψη. Όλες οι διαδικασίες που οδήγησαν στο σχηματισμό της ωοθηκικής κοιλότητας, δηλαδή η συγκέντρωση των σωματικών κυττάρων στην άκρη των γονάδων, η προεξοχή τους και

στη συνέχεια η συγχώνευσή τους ξεκίνησε στην κεφαλική περιοχή της γονάδας, όπως έχει ήδη αναφερθεί από τους Roblin και Bruslé, (1983).

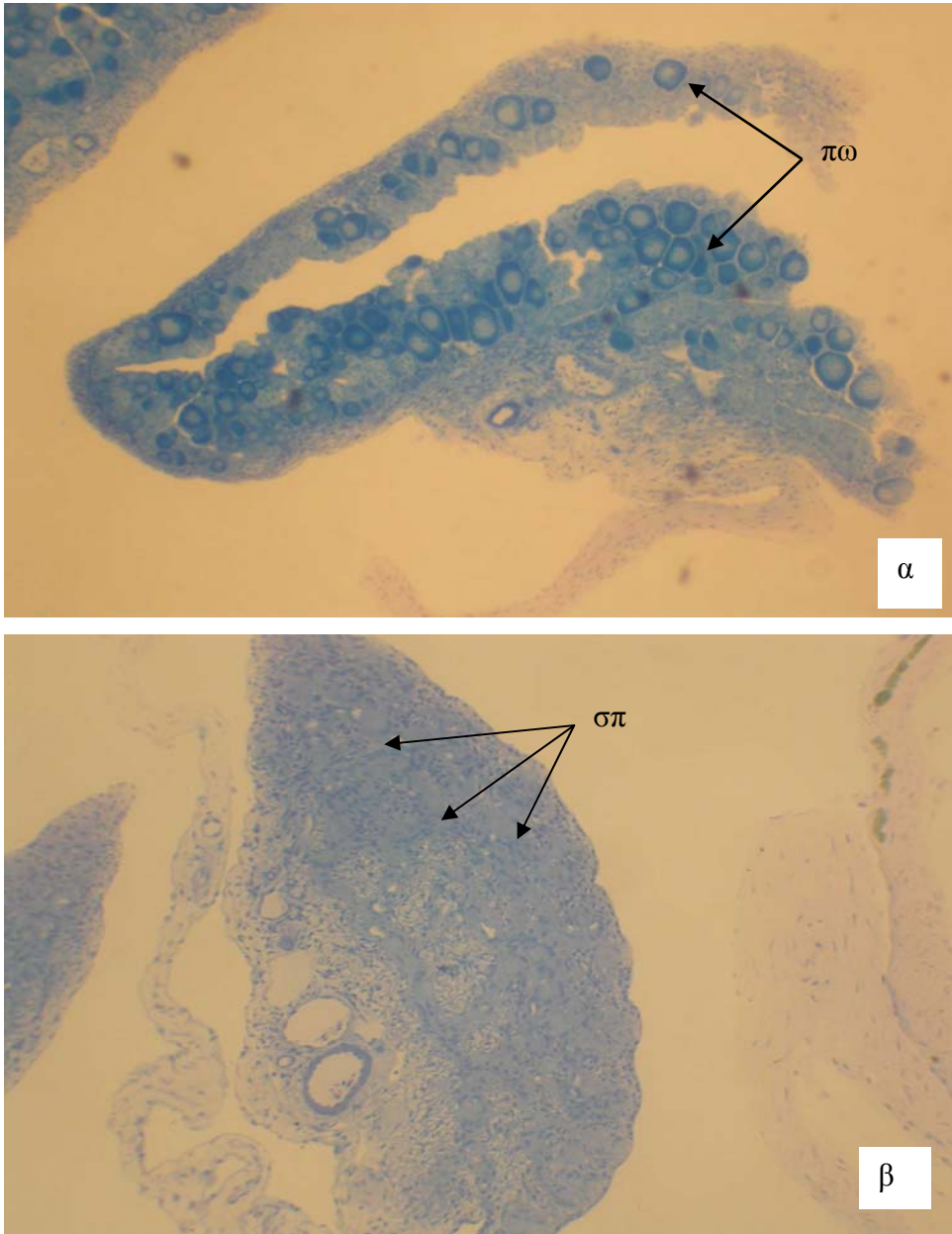


Εικόνα 11. 11α. Γονάδα θηλυκού ατόμου λαβρακιού 150 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Τα δύο άκρα (ακ) της γονάδας (γ) ενώνονται για να σχηματίσουν την ωοθηκική κοιλότητα (ωκ). 11β. Γονάδες (γ) αρσενικού ατόμου λαβρακιού προσκολλημένες στη νηκτική κύστη (νκ).



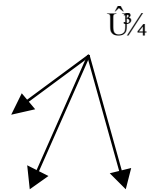
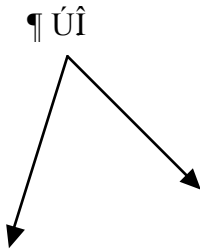
Εικόνα 12. 12α. Γονάδα θηλυκού ατόμου λαβρακιού 150 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Μπορούν να αναγνωριστούν τα βλαστικά κύτταρα (βκ), η φλέβα (φ), η αρτηρία (αρ) και η ωοθηκική κοιλότητα (ωκ) του ατόμου. **12β.** Αδιαφοροποίητη γονάδα αρσενικού ατόμου 150 ημέρες μετά την εκκόλαψη.

Κατά την ημέρα 200 μετά την εκκόλαψη φάνηκαν τα πρώτα προλεκιθικά ωοκύτταρα στις γονάδες του πληθυσμού L-άκρο (Εικόνα 13), ενώ στις αντίστοιχες γονάδες του S-άκρου οι γονάδες παρέμεναν ιστολογικά αδιαφοροποίητες (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. 13α. Εικόνα θηλυκής γονάδας λαβρακιού 200 ημέρες μετά την εκκόλαψη, με εμφανή τα προλεκιθικά ωοκύτταρα (πω). 13β. Εικόνα αρσενικής αδιαφοροποίητης γονάδας την ημέρα 200 μετά την εκκόλαψη με διάσπαρτα σπερματογόνια (σπ).

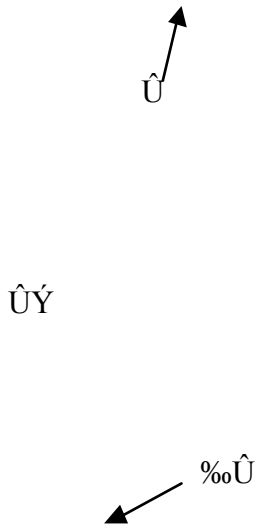
Κατά την ημέρα 250 μετά την εκκόλαψη οι γονάδες έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως αλλά παραμένουν ανώριμες (Εικόνα 14). Οι ωθήκες αποτελούνται από ελάσματα με πρωτογενή ωοκύτταρα, ενώ στους όρχεις παρατηρείται καθαρή δομή σωληναρίων και οι κύστεις τους περιέχουν σπερματογόνια.



Εικόνα 14. 14α. Γονάδα θηλυκού ατόμου 250 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Η γονάδα είναι πλήρως διαφοροποιημένη, ανώριμη και περιέχει πρωτογενή ωοκύτταρα (πρ.κ). **14β.** Γονάδα αρσενικού ατόμου 250 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Τα σπερματικά σωληνάκια περιέχουν σπερματογόνια (σπ).

Παρατηρήθηκαν και αρκετά πρώιμα αρσενικά άτομα την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη, όπου παρατηρούνται όλοι οι τύποι των βλαστικών κυττάρων στους όρχεις, όπως δευτερογενή σπερματοκύτταρα, σπερματίδες και μερικά σπερματοζώαρια, υποδεικνύοντας την έναρξη της σπερματογένεσης (Εικόνα 15).

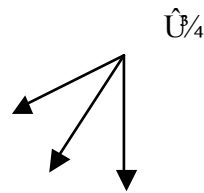
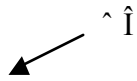
ŪŸ



Εικόνα 15. Πρώιμο αρσενικό άτομο 300 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Τα σπερματικά σωληνάκια περιέχουν όλους τους τύπους των βλαστικών κυττάρων, δευτερογενή σπερματοκύτταρα (δσ), σπερματίδες (σ) και μερικά σπερματοζώαρια (σζ), υποδεικνύοντας την έναρξη της σπερματογένεσης.

Ένα αξιοσημείωτο θέμα που αφορά στην αναπαραγωγή του λαβρακιού είναι η παρουσία ατόμων με μεμονωμένα προλεκιθικά ωοκύτταρα σε γονάδες με τυπική δομή όρχεων, φαινόμενο που ονομάζεται στην αγγλική ορολογία intersexuality (Blázquez et al., 2001, Saillant et al., 2003a) και το άτομο στο οποίο παρατηρείται μεσόφυλο (intersex) (Εικόνα 16). Σύμφωνα με τους Piveau et al. (1999), αυτό το φαινόμενο είναι παροδικό και

οφείλεται σε μικρή αύξηση στη σύνθεση οιστρογόνων. Τα επίπεδα οιστρογόνων είναι επαρκή για να προκαλέσουν τη δημιουργία ωθητικού φλοιού αλλά όχι αρκετά επαρκή για να αναστείλουν την ανάπτυξη του ορχικού ιστού. Οι Roblin και Bruslé (1983) αναφέρουν την παρουσία μεσόφυλων σε καλλιεργούμενους πληθυσμούς λαβρακιού, αποδίδοντας το φαινόμενο ως μια απλή τάση των νεαρών ατόμων του είδους. Στην πραγματικότητα το λαβράκι ανήκε παραδοσιακά στην οικογένεια Serranidae, αλλά ήταν το μοναδικό γονοχωριστικό είδος σε μια οικογένεια που κατά τα άλλα αποτελούνταν κυρίως από ερμαφρόδιτα είδη. Στη συνέχεια το λαβράκι μεταφέρθηκε στην οικογένεια Moronidae, για να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα. Οι Saillant et al. (2002) αναφέρουν ότι τα μεσόφυλα αρσενικά ψάρια είναι ευαίσθητα ψάρια που έχουν γίνει αρσενικά μετά από επίδραση θερμοκρασίας. Τα μεσόφυλα ψάρια στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν ως αρσενικά κι αυτό γιατί υπολογίστηκαν σύμφωνα με το γοναδικό φαινότυπο παρά σύμφωνα με το γενότυπο των ατόμων. Οι γονάδες των μεσόφυλων ήταν ουσιαστικά φαινοτυπικά όρχεις με παρουσία μερικών ωοκυττάρων.



Εικόνα 16. Γονάδα αρσενικού λαβρακιού με παρουσία ωοκυττάρου (ωκ). Η γονάδα του αρσενικού είναι πλήρως διαφοροποιημένη και περιέχει σπερματογόνια (σπ).

Γενικά οι όρχεις χαρακτηρίζονταν από την παρουσία ενός καλά αναπτυγμένου αγγειώδους συστήματος που εμφανίζεται παράλληλα στον απαγωγό σωλήνα κατά μήκος της κοιλιακής περιοχής. Οι ωοθήκες ήταν οργανωμένες σε ελάσματα που κινούνται προς την κεντρική κοιλότητα. Τα ωοθηκικά ελάσματα περιέχουν ωοκύτταρα, ενώ τα ωογόνια βρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια. Στις ωοθήκες παρατηρείται επίσης καλά οργανωμένο αγγειώδες σύστημα.

2.4 Συζήτηση

Η διαφοροποίηση των γονάδων σε διάφορα είδη ζώων, όπως τη θαλάσσια χελώνα (*Lepidochelys olivacea*) (Merchant-Larios et al., 1997), το χέλι (*Anguilla anguilla*) (Beullens et al., 1997), αλλά και διάφορα είδη τελεόστεων (Hendry et al., 2002• Pati•o et al., 1996• Foyle et al., 1993• Strüssman et al., 1996• Omoto et al., 2001• Luckenbach et al., 2003) έχει μελετηθεί εκτεταμένα με κυριότερο σκοπό, εκτός από τη διεύρυνση των γνώσεών μας σε σχέση με τη διαδικασία αυτή, την κατανόηση των επιδράσεων των ορμονικών θεραπειών που πραγματοποιούνται. Στο λαβράκι, οι κυριότερες μελέτες για τη διαφοροποίηση του φύλου του από ιστολογικής πλευράς έγιναν τη δεκαετία του 1980 από τους Roblin και Bruslé (1983) και τους Bruslé και Roblin (1984). Πιο πρόσφατα, η ιστολογική διαφοροποίηση φύλου στο είδος αυτό περιγράφηκε από τους Saillant et al. (2003b), ενώ αναφορές σε αυτήν έχουν γίνει και από τους Blázquez et al. (1998c). Σύμφωνα με τους Roblin και Bruslé (1983), η ωοθηκική και η ορχική διαφοροποίηση ολοκληρώνεται σε ψάρια ηλικίας 11-23 μηνών και από 90-187 mm σε μήκος. Στην παρούσα μελέτη τα πρώτα σημάδια της διαφοροποίησης φύλου ανιχνεύτηκαν την ημέρα 150 μετά την εκκόλαψη, όπου έγινε εμφανής ο σχηματισμός της ωοθηκικής κοιλότητας στα θηλυκά ψάρια. Τα αρσενικά ψάρια σε αυτή την ηλικία παρέμεναν αδιαφοροποίητα. Αυτό αποτελεί ένα πολύ κοινό φαινόμενο στα ψάρια και έχει περιγραφεί για πολλά είδη, όπως στο ιππόγλωσο (*Hippoglossus hippoglossus*) (Hendry et al., 2002), το γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) (Pati•o et al., 1996) και τον κέφαλο (*Mugil cephalus*) (Chang et al., 1995).

Μάλιστα, η περίοδος διαφοροποίησης της γονάδας των δύο φύλων που εντοπίστηκε στην παρούσα μελέτη (πρώτη διαφοροποίηση: ημέρα 150 μετά την εκκόλαψη) συμπίπτει με αυτήν της «ευμετάβλητης περιόδου» (labile period), δηλαδή της περιόδου που παρατηρείται η μέγιστη ευαισθησία των γονάδων των ψαριών στη χορήγηση εξωγενών γοναδικών ορμονών (ανδρογόνα και οιστρογόνα). Συγκεκριμένα στο λαβράκι, από τα πειράματα χορήγησης εξωγενών στεροειδών ορμονών οι Blázquez et al (2001) έχουν εντοπίσει την "ευμετάβλητη" περίοδο ανάμεσα στις 126 και 226 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Η κρίσιμη περίοδος για την αρσενικοποίηση μέσω της χρήσης

ανδρογόνων εντοπίζεται ανάμεσα στις 96 και 126 μέρες μετά τη γονιμοποίηση και συμπίπτει με έναν δραστικό πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων στην αδιαφοροποίητη γονάδα (Blázquez et al., 2001). Αντίθετα, οι θεραπείες που καλύπτουν την περίοδο από 46-76 μετά τη γονιμοποίηση δεν έχουν επίδραση στη διαφοροποίηση φύλου, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι γονάδες σε αυτή τη φάση δεν είναι ακόμα ευαίσθητες στη δράση εξωγενών ορμονών (Blázquez et al., 2001). Επιπλέον, η θεραπεία με θερμοκρασία 15° C τις ημέρες 57-137 μετά τη γονιμοποίηση οδηγεί σε πλήρη αρσενικοποίηση των πληθυσμών λαβρακιού, ενώ η φάση γρήγορης διαίρεσης με αύξηση στις μιτωτικές διαιρέσεις τόσο των πρωτογενών βλαστικών κυττάρων όσο και των στεροειδογενικών κυττάρων έχει εντοπιστεί την περίοδο ανάμεσα στις ημέρες 78-137 μετά τη γονιμοποίηση (Roblin και Bruslé, 1983).

Σύμφωνα με άλλες μελέτες, υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις ότι τα θηλυκά άτομα στο λαβράκι διαφοροποιούνται νωρίτερα από τα αρσενικά και ότι αποτελούν τα μεγαλύτερα ψάρια, ενώ τα αδιαφοροποίητα ψάρια είναι μικρότερα σε μέγεθος (Blázquez et al., 1999• Zanuy et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, είχε διατυπωθεί η άποψη ότι υπάρχει μια ηλικία (9 μήνες) και ένα ελάχιστο μήκος (11,5 cm) κατά τα οποία το φύλο μπορεί να αναγνωριστεί ιστολογικά. Τα μόνα διαφοροποιημένα ψάρια σε αυτή την ηλικία είναι θηλυκά, ενώ η αρσενική διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα μετά τους 11,6 μήνες ζωής και τα 12,8 cm ελάχιστο μήκος (Blázquez et al., 1998a) ή, όπως διευκρινίστηκε λίγο αργότερα, όλα τα ψάρια σε μέγεθος μικρότερο από 12 εκατοστά είναι αδιαφοροποίητα (Blázquez et al., 1999• Saillant et al., 2003a). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε αυτό το είδος η διαφοροποίηση φύλου εξαρτάται περισσότερο από το μέγεθος παρά από την ηλικία (Zanuy et al., 2001). Η αναλογία φύλου στο λαβράκι συσχετίζεται με το ρυθμό ανάπτυξης των ψαριών πολύ πριν τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των γονάδων, με τα αρσενικά άτομα να ευνοούνται στις μικρότερες και τα θηλυκά στις μεγαλύτερες τάξεις μεγέθους ενός μοναδικού πληθυσμού (Blázquez et al., 1999• Koumoundouros et al., 2002). Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώνει και η παρούσα μελέτη.

Η διαφοροποίηση της θηλυκής γονάδας σε δείγματα που συλλέχτηκαν ανά 10 ημέρες φάνηκε να περιλαμβάνει το διάστημα από την ημέρα 130 μέχρι την ημέρα 180 μετά την εκκόλαψη (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχει ποικιλότητα

ως προς το χρόνο διαφοροποίησης, όπως υπάρχει και στον ατομικό ρυθμό αύξησης (Roblin και Bruslé, 1983• Saillant et al., 2003a). Πάντως, την ημέρα 250 μετά την εκκόλαψη, δηλαδή περίπου τον όγδοο μήνα, οι γονάδες ήταν πλέον διαφοροποιημένες, νωρίτερα από την ηλικία που προτείνεται από τους Roblin και Bruslé (1983), αλλά σε συμφωνία με τους Saillant et al. (2003b). Αυτό οφείλεται πιθανότατα στη γρηγορότερη ανάπτυξη του λαβρακιού που παρατηρείται πλέον στις μονάδες εκτροφής του, καθώς από τη δεκαετία του '80 έχουν αναπτυχθεί πλέον πιο σύγχρονοι μέθοδοι εκτροφής με σκοπό την επίτευξη καταλληλότερων πρωτόκολλων εκτροφής (Saillant et al., 2003a).

Η σημασία του παρόντος τμήματος της μελέτης είναι μεγάλη, καθώς διαπιστώθηκε το φύλο στους τρεις πληθυσμούς πριν από την πλήρη διαφοροποίηση των γονάδων, η οποία γίνεται εμφανής την ημέρα 250 μετά την εκκόλαψη με μικροσκοπική εξέταση των γονάδων. Έτσι, διαπιστώθηκε ο τρόπος διαμόρφωσης της αναλογίας φύλου στους πληθυσμούς από τη δεύτερη διαλογή και μετά. Επιπλέον, η περιγραφή της οντογένεσης της διαφοροποίησης του φύλου, όταν συνδυαστεί με τις μεταβολές των επιπέδων των γοναδικών στεροειδών ορμονών κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου (Κεφάλαιο 3) θα δώσει μια εικόνα του φυσιολογικού μηχανισμού της διαφοροποίησης του φύλου στο λαβράκι. Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι για την πλήρη εικόνα του μηχανισμού αυτού σημασία πρέπει επίσης να δοθεί στο ρόλο των γονιδίων, των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, όπως και της έκφρασης των απαραίτητων ενζύμων για την παραγωγή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΙΚΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

3.1 Εισαγωγή

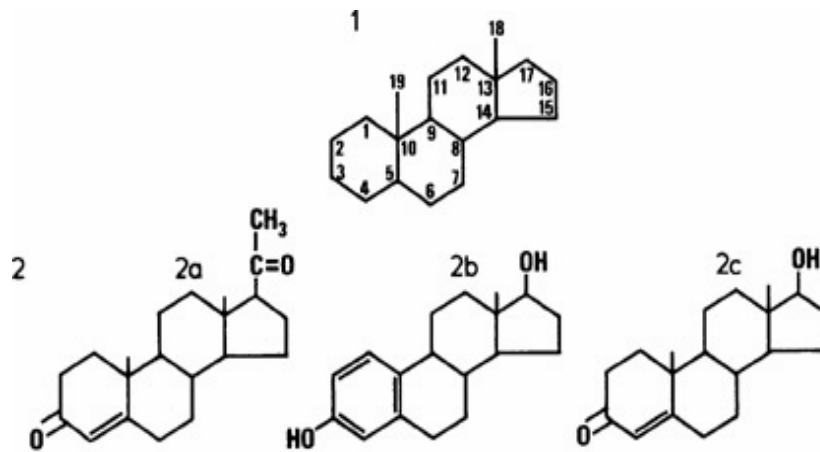
Ο καθορισμός του φύλου στα ψάρια αποτελεί αντικείμενο μελέτης των τελευταίων ετών. Στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά, το φύλο καθορίζεται κατά τη γονιμοποίηση από το φυλετικό χρωμόσωμα του σπέρματος. Το σπέρμα που περιέχει το χρωμόσωμα Y θα δώσει XY αρσενικά, ενώ το σπέρμα που περιέχει το X χρωμόσωμα θα δώσει XX θηλυκά. Το χρωμόσωμα Y περιέχει το "γονίδιο καθορισμού του όρχι" Sry (testis determining gene), το οποίο όταν εκφράζεται μετατρέπει την αρχικά αδιαφοροποίητη γονάδα σε όρχι (Mittwoch, 2000). Μέχρι πρόσφατα, στα ψάρια δεν υπήρχε υποψήφιο γονίδιο πρωτογενούς καθορισμού του φύλου αντίστοιχο του Sry (Volff et al., 2003). Προτάθηκε, όμως, ένα γονίδιο, το Dmy, το οποίο συνδέεται με το Y χρωμόσωμα, για το medaka (*Oryzias latipes*) (Matsuda et al., 2002). Η πρωτεΐνη που προκύπτει από το γονίδιο αυτό περιέχει μια περιοχή σύνδεσης στο DNA, την περιοχή DM, που έχει βρεθεί σε άλλα γονίδια που συνδέονται με την ανάπτυξη του φύλου τόσο σε σπονδυλωτά όσο και σε ασπόνδυλα (Swain, 2003). Ωστόσο, φαίνεται πως το γονίδιο αυτό είναι εξελικτικά νέο, και πως δεν υπάρχει αντίστοιχα σε όλα τα είδη ψαριών (Volff et al., 2003• Kondo et al., 2003). Ένα άλλο γονίδιο που φαίνεται να συσχετίζεται με τον καθορισμό του φύλου στα σπονδυλωτά είναι το Sox9 (Koopman et al., 2001). Αλλά και το γονίδιο vasa, που είναι γνωστό ως μόριο δείκτης, καθώς εκφράζεται μόνο στα βλαστικά κύτταρα πολλών ειδών ζώων, έχει αρχίσει να ερευνάται για τα ψάρια (Yoshizaki et al., 2003) και έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση της γονάδας (Kobayashi et al., 2002). Ο μοριακός μηχανισμός δράσης, όμως, των Sry και Sox9 δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα και συνεχώς ανακαλύπτονται νέα γονίδια που συνδέονται με τον καθορισμό του φύλου και το σχηματισμό των γονάδων (Harley et al., 2003), όπως για παράδειγμα το Dax1, το οποίο δρα ανταγωνιστικά στο μονοπάτι καθορισμού του αρσενικού φύλου (Koopman et al., 2001) και το Sf-1 (steroidogenic factor-1), το οποίο ρυθμίζει την έκφραση των

στεροειδικών ενζύμων, εκφράζεται πολύ νωρίς κατά τη διαφοροποίηση των γονάδων και θεωρείται απαραίτητο για το σχηματισμό της βλαστικής ράχης (Elf, 2003).

Όσον αφορά στο φυσιολογικό μηχανισμό της αναπαραγωγικής λειτουργίας στα ψάρια, γενικά ισχύουν τα εξής: σε απόκριση στις μεταβαλλόμενες συνθήκες τόσο στα εσωτερικά όσο και στα εξωτερικά περιβάλλοντα, ο υποθάλαμος εκκρίνει μικρές πεπτιδικές ορμόνες, γνωστές ως εκλυτικές ορμόνες γοναδοτροπινών (GnRH). Αυτά τα πεπτίδια διανύουν μια μικρή απόσταση στο κοιλιακό μέρος του εγκεφάλου, ακριβώς πάνω από την οροφή του στόματος του ψαριού, από όπου ελέγχουν τη δραστηριότητα ειδικών γοναδοτροπικών κυττάρων στην υπόφυση. Με τη σειρά τους, αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν γοναδοτροπικές ορμόνες (FSH και LH) που περνούν μέσω του αίματος στη γονάδα του ψαριού, όπου ελέγχουν όλες τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές στους όρχεις και την ωοθήκη (Nagahama, 1994). Μια σημαντική γοναδοτροπική επιρροή είναι η έναρξη της παραγωγής στεροειδών ορμονών από τις γονάδες. Οι στεροειδείς ορμόνες των γονάδων δρώντας είτε ανεξάρτητα είτε σε συνδυασμό με τις γοναδοτροπικές ορμόνες ελέγχουν άμεσα την αύξηση και ωρίμανση των γονάδων (Bromage, 1988).

Οι στεροειδείς ορμόνες των γονάδων προέρχονται από τη χοληστερόλη, η βασική δομή της οποίας είναι τρεις εξαμελείς και ένας πενταμελής δακτύλιος άνθρακα (Εικόνα 17) (Μπέης, 1992). Ο ρόλος των στεροειδών ορμονών έχει μελετηθεί εκτεταμένα στα ψάρια. Οι όρχεις και οι ωοθήκες των ψαριών είναι ικανά να συνθέτουν μια ποικιλία στεροειδών μορίων που ρυθμίζουν πολλές λειτουργίες, περιλαμβανομένης της γαμετογένεσης στις γονάδες, της εκκριτικής δραστηριότητας του υποθαλάμου και της υπόφυσης, της έκφρασης ποικίλων δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου και συμπεριφορών και του γενικού μεταβολισμού (Fostier et al., 1983). Η στεροειδική δραστηριότητα στις γονάδες ρυθμίζεται αρχικά από τη γοναδοτροπίνη, αν και ορμόνες και άλλοι παράγοντες τόσο από τις γονάδες όσο και από άλλους ιστούς σίγουρα συνεισφέρουν σε αυτή τη ρύθμιση (Nagahama, 1994). Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει τις διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των στεροειδών στο αίμα και στις γονάδες με τους κύκλους υποτροπής και αναζωογόνησης των γονάδων. Στα θηλυκά ψάρια έχει βρεθεί ότι κατά την τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών οιστραδιόλη (E2) και τεστοστερόνη (T) αυξάνονται και στη συνέχεια μειώνονται (Mylonas και Zohar, 2001).

Αντίστοιχα, για τα αρσενικά άτομα, η σπερματογένεση ξεκινάει όταν τα επίπεδα της T και της 11-κετοτεστοστερόνης (11-KT) στο πλάσμα αυξάνονται. Οι ορμόνες αυτές αποκτούν τις μέγιστες τιμές τους κατά την αναπαραγωγική περίοδο και στη συνέχεια μειώνονται δραματικά (Mylonas και Zohar, 2001). Ο περιβαλλοντικός χειρισμός του στεροειδούς περιβάλλοντος, που επιτυγχάνεται με τη θεραπεία με εξωγενή στεροειδή ή με το χειρισμό του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδας επιβεβαιώνει τον κεντρικό ρόλο των στεροειδών στην αναπαραγωγική διαδικασία (Redding και Pati•o, 1993).



Εικόνα 17. Στεροειδείς ορμόνες. 1. Βασική δομή στεροειδούς. 2. Φυλετικές ορμόνες. 2α προγεστερόνη. 2β 17-β οιστραδιόλη. 2γ Τεστοστερόνη.

Οι ώριμοι όρχεις των τελεόστεων περιέχουν πολυάριθμους μεγάλους σωλήνες γεμάτους σπερματοζώαρια. Ο χώρος ανάμεσα στους σωλήνες αποτελείται από κύτταρα Leydig, ινοβλάστες και κύτταρα αίματος. Οι ορχικοί σωλήνες περικλείονται συνεχώς από μια στιβάδα κυττάρων Sertoli (Nagahama et al., 1982). Τα κύτταρα Leydig φαίνονται να είναι σημαντικές περιοχές σύνθεσης ανδρογόνων στους όρχεις, αλλά τα Sertoli και άλλοι τύποι κυττάρων μπορεί να ενισχύουν ή ακόμη και να αντικαθιστούν τη λειτουργία αυτή των κυττάρων Leydig. Τα κύρια ανδρογόνα που παράγονται στους όρχεις ποικίλουν ανάμεσα στα είδη και τα αναπτυξιακά στάδια αλλά μπορούν να περιλαμβάνουν την T,

την 11-KT και την ανδροστενεδιόνη (An). Οι όρχεις ορισμένων ψαριών μπορούν επίσης να παράγουν προγεστερόνη, 17α-υδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνη, 17α,20β-διυδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνη, 11-δεοξυκορτικοστερόνη και ίσως μικρά ποσά οιστρογόνων (Redding και Pati•o 1993). Από τα στεροειδή που παράγονται στον όρχι, τα ποσοτικά κυριαρχούντα είναι τα 11-οξυγονομένα ανδρογόνα, όπως η 11-KT (Borg, 1994).

Στην ωοθήκη, τα κύρια σημεία για τη σύνθεση στεροειδών είναι τα κύτταρα θήκης και τα κύτταρα στιβάδας του ωοθυλακίου. Ο ρόλος των κυττάρων θήκης κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου μέρους της λεκιθογένεσης θεωρείται ότι είναι η παραγωγή προδρόμων των οιστρογόνων και προγεστερονών, οι οποίοι στη συνέχεια μετατρέπονται σε E2 στη στιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων (Nagahama et al., 1982). Σε συνεργασία, οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων μπορούν να παράγουν E2, οιστρόνη, 17α,20β,διυδροξυ-4-πρεγνεν-3-όνη και όλα τα στεροειδή που ήδη σημειώθηκαν για τους όρχεις, πάντα ανάλογα με το είδος και το αναπτυξιακό στάδιο. Τα στεροειδή τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα συχνά δημιουργούν σύμπλοκα με άλλα μόρια, συνήθως γλυκουρονίδια. Τα σύμπλοκα των στεροειδών μπορεί να είναι ανενεργοί μεταβολίτες, έτοιμοι για απόρριψη ή για επανενεργοποίηση, αλλά μερικά μπορούν και να δράσουν ως φερομόνες πριν και κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας (Redding και Pati•o, 1993).

Κύρια πηγή της σύγχρονης γνώσης για το ρόλο των στεροειδών ορμονών στη διαφοροποίηση φύλου αποτελούν κυρίως έμμεσες τεχνικές, όπως η χρήση θεραπειών με στεροειδείς ορμόνες, αναστολείς στεροειδών ενζύμων και ανταγωνιστές υποδοχέων στεροειδών (Baroiller et al., 1999). Γενικά θεωρείται ότι η E2 προκαλεί την ωοθηκική ανάπτυξη και η T και 11-KT (και κυρίως η δεύτερη) ευθύνονται για την ορχική ανάπτυξη (Nagahama, 1999). Τα αναπαραγωγικά στεροειδή έχουν τοπική, άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων, αλλά και, ως ενδοκρινικές ορμόνες, επηρεάζουν άλλους κυτταρικούς τύπους και όργανα που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση φύλου και τη γαμετογένεση (Fostier et al., 1983• Devlin και Nagahama, 2002). Φυλετικοί διμορφισμοί στο επίπεδο των στεροειδών ορμονών έχουν αποδεικτεί πριν και κατά τη διάρκεια της ιστολογικά αναγνωρίσιμης διαφοροποίησης της γονάδας (Feist et al., 1990• Feist και Schreck, 1996• Chang et al., 1999). Όμως ο ακριβής ρόλος των στεροειδών στη διαφοροποίηση φύλου παραμένει αδιευκρίνιστος (Chang et al., 1999• Hines et al., 1999•

Devlin και Nagahama, 2002). Πάντως, τα στεροειδή αναμφισβήτητα σχετίζονται με τη διαφοροποίηση φύλου και μπορούν να αποτελέσουν σημαντικότατο εργαλείο για την περαιτέρω μελέτη της διαδικασίας αυτής, καθώς και για το χειρισμό του φύλου της γονάδας για τους σκοπούς της ιχθυοκαλλιέργειας (Hunter και Donaldson, 1983).

Στο λαβράκι μελετήθηκαν οι τρεις μορφές της GnRH στην υπόφυση αρσενικών ατόμων λαβρακιού κατά την περίοδο της διαφοροποίησης φύλου και της πρώτης αναπαραγωγικής ωρίμανσης (Rodríguez et al., 2000a). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι και οι τρεις μορφές της GnRH (sbGnRH, cGnRH II και sGnRH) εντοπίζονται στην υπόφυση κατά τη διαφοροποίηση φύλου και μάλιστα παρουσίασαν την υψηλότερη τιμή τους κατά τον 9^ο μήνα ζωής των ψαριών, δηλαδή ενώ ακόμα αυτά διαφοροποιούνταν φυλετικά. Επιπλέον, τα επίπεδα των τριών μορφών GnRH κατά τη διαφοροποίηση φύλου βρέθηκαν υψηλότερα από ότι κατά την πρώτη αναπαραγωγική ωρίμανση, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο άξονας υποθάλαμου-υπόφυσης μπορεί να είναι απαραίτητος για την ολοκλήρωση παρά για την ενεργοποίηση της διαφοροποίησης φύλου, καθώς αυτός είναι ενεργός περίπου όταν λαμβάνει χώρα η διαφοροποίηση φύλου. Επιπλέον, η T έχει αναγνωριστεί να έχει θετική ανάδραση σε επίπεδο εγκεφάλου-υπόφυσης, πιθανότατα μετέχοντας σε μια επιτάχυνση της διαφοροποίησης των γονάδων και την πρόκληση της σπερματογένεσης στο λαβράκι μέσω της επίδρασής της στη σύνθεση και απελευθέρωση της GnRH (Zanuy et al., 1999).

Σκοπός του παρόντος τμήματος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης ανάμεσα στη διαφοροποίηση του φύλου στο λαβράκι και στα επίπεδα των γοναδικών στεροειδών ορμονών του πλάσματος και των γονάδων κατά τη διάρκεια της περιόδου της διαφοροποίησης. Η μελέτη αυτή έγινε στους πληθυσμούς S-άκρο και L-άκρο που δημιουργήθηκαν με αναλογίες φύλου 70% αρσενικά και 96% θηλυκά αντίστοιχα (Κεφάλαιο 1). Αυτή είναι και η πρώτη απόπειρα του συσχετισμού αυτού για το συγκεκριμένο είδος και έχει ως κύριο στόχο τη διεύρυνση των γνώσεών μας σχετικά με τη διαφοροποίηση φύλου ενός τόσο σημαντικού εμπορικά είδους, όπως είναι το λαβράκι.

3.2 Υλικά και μέθοδοι.

Το πρωτόκολλο ELISA είχε αναπτυχθεί προηγουμένως για τη μέτρηση της T (Rodríguez et al., 2000a), της E2 και της 11-KT (Cuisset et al., 1994) στο πλάσμα ψαριών και προσαρμόστηκε για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης. Λεπτομερής περιγραφή του πρωτοκόλλου βρίσκεται στο Παράρτημα II.

3.2.1 Στοιχεία ενζυμικής ανοσοανάλυσης

I. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της ανάλυσης

Οι διακυμάνσεις ανάμεσα στις αναλύσεις καθορίστηκαν με τη χρήση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ενός δείγματος στο ίδιο plate. Οι διακυμάνσεις μέσα στην ίδια ανάλυση υπολογίστηκαν με τη χρήση της επανάληψης του ίδιου δείγματος πλάσματος σε διαφορετικά plates. Η ακρίβεια της μεθόδου έχει αποδειχτεί από τους Rodríguez et al (2000a) για τα δείγματα του πλάσματος λαβρακιού, πραγματοποιήθηκε, όμως, ο έλεγχός της στην παρούσα μελέτη για τα δείγματα των γονάδων. Η διαδικασία έγινε ως εξής: Έγινε ομογενοποίηση, εκχύλιση και ανασύσταση σε άγνωστο δείγμα γονάδας και στη συνέχεια το δείγμα μετρήθηκε με την κανονική διαδικασία τόσο χωρίς αραιώση (1:1), όσο και σε διαδοχικές αραιώσεις (1:2, 1:4, κ.τ.λ.). Ο έλεγχος του παραλληλισμού ανάμεσα στην πρότυπη καμπύλη και τις μετρήσεις από τις διαδοχικές αυτές αραιώσεις πραγματοποιήθηκε και για τις τρεις μετρούμενες ορμόνες. Η στατιστική ανάλυση του ελέγχου του παραλληλισμού έγινε με ANOVA, αφού πρώτα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως τετραγωνική ρίζα.

II. Αποτελεσματικότητα εκχύλισης.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης στα δείγματα των γονάδων πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση 10 δειγμάτων γονάδων. Μετά το sonication, σε 5 από αυτά προστέθηκαν 50 μl T σημασμένης με τρίτιο, ενώ στα υπόλοιπα 5 προστέθηκαν 50 μl E2 σημασμένης με τρίτιο. Η ραδιενεργή δραστηριότητα που προστέθηκε σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσε σε 1075 dpm για το διάλυμα της T και 978 dpm για το διάλυμα της

E2. Μετά την προσθήκη των ραδιενεργά σημασμένων ορμονών, τα δείγματα αφέθηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης των ορμονών των γονάδων που περιγράφηκε παραπάνω. Η ανασύσταση των δειγμάτων έγινε σε 500 µl Reaction buffer. Από κάθε δείγμα 200 µl μετρήθηκαν σε duplicates και υπολογίστηκε το ποσοστό της ραδιενέργειας που αυτά εκπήμπαν.

3.2.2 Στατιστική ανάλυση και έκφραση των δεδομένων

Η πρότυπη καμπύλη των στεροειδών ορμονών μετασχηματίστηκε σε γραμμική με τη χρήση του logit/log, όπου $\text{logit} (B_i/B_0) = \ln(B_i - \text{NSB}/B_0 - \text{NSB})$, όπου το B_i αντιπροσωπεύει το binding του κάθε σημείου (εκφρασμένο ως ποσοστό του μέγιστου binding, B_0), το B_0 αντιπροσωπεύει το μέγιστο binding και το NSB το μη ειδικό binding. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Στις γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων των ορμονών στο πλάσμα το κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα 12 ατομικών δειγμάτων, ενώ στις γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων των στεροειδών ορμονών στις γονάδες το κάθε σημείο αποτελεί το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα 10 ατομικών δειγμάτων. Αναλύθηκαν με τη μέθοδο ANOVA και στη συνέχεια με το Fisher's PLSD test. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές στατιστικά όταν το $P < 0.05$.

3.3 Αποτελέσματα

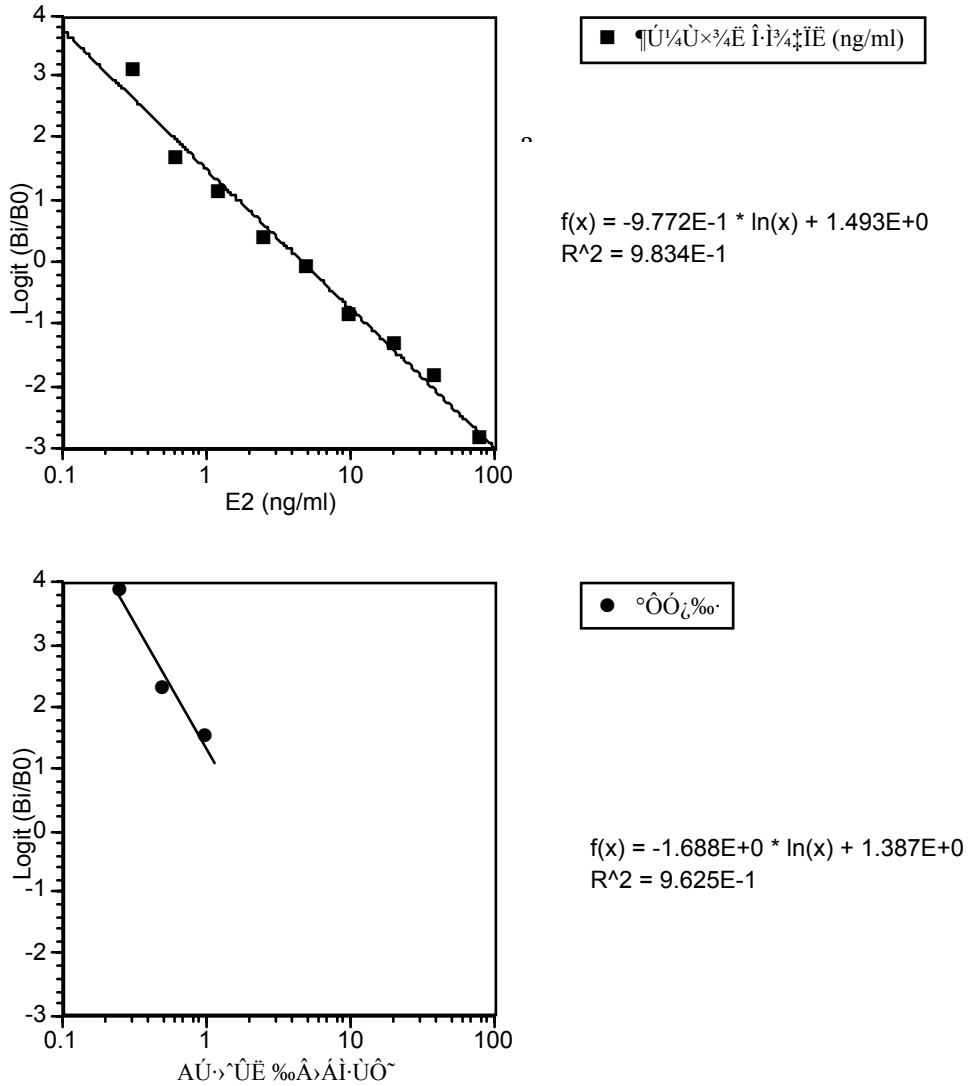
3.3.1 Στοιχεία ενζυμικής ανοσοανάλυσης.

I. Επαναληψιμότητα της ανάλυσης

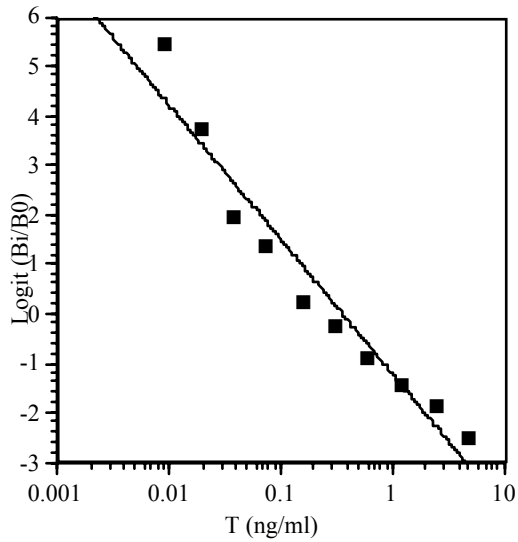
Οι εικόνες 21, 22 και 23 δείχνουν τις καμπύλες που πάρθηκαν για τις τρεις ορμόνες με τις διαδοχικές αραιώσεις του πλάσματος λαβρακιού, όταν αυτές έγιναν γραμμικές με τη χρήση μετασχηματισμού logit/log. Ο παραλληλισμός ανάμεσα στην καμπύλη των διαδοχικών αραιώσεων του πλάσματος και την πρότυπη καμπύλη για την κάθε ορμόνη δείχνει ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει την ορμόνη που βρίσκεται στο πλάσμα με τον ίδιο τρόπο που αναγνωρίζει και την ορμόνη της πρότυπης καμπύλης.

II. Αποτελεσματικότητα εκχύλισης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διαδικασίας για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης στα δείγματα των γονάδων, το ποσοστό αποτελεσματικότητας της εκχύλισης για την T ήταν 35.45 % (± 11.99), ενώ για την E2 82.96 % ($\pm 38,35$). Όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης για τα δείγματα του πλάσματος, αυτή έχει ελεγχθεί από τους Rodriguez et al (2000) και το αντίστοιχο ποσοστό που βρέθηκε ήταν 92.9 % ± 1.43 .

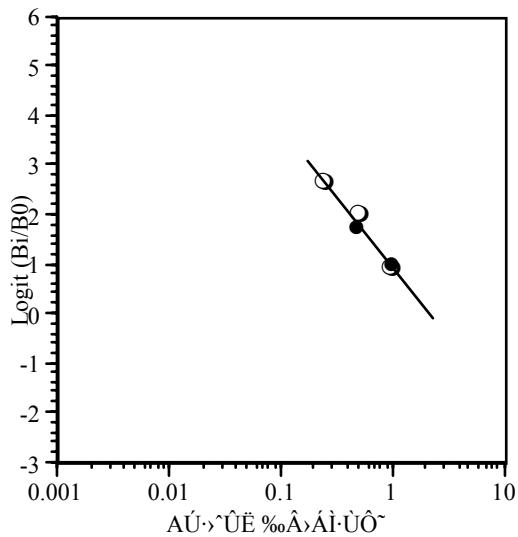


Εικόνα 21. Παραλληλισμός των καμπυλών της πρότυπης καμπύλης (επάνω) και του δείγματος της γονάδας λαβρακιού (κάτω) για την E2. Οι καμπύλες έχουν μετασχηματιστεί σε γραμμικές με τη χρήση του logit. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κλίση της καμπύλης (ANOVA, P=0.5).



$$f(x) = -1.176E+0 * \ln(x) + -1.232E+0$$

$$R^2 = 9.412E-1$$



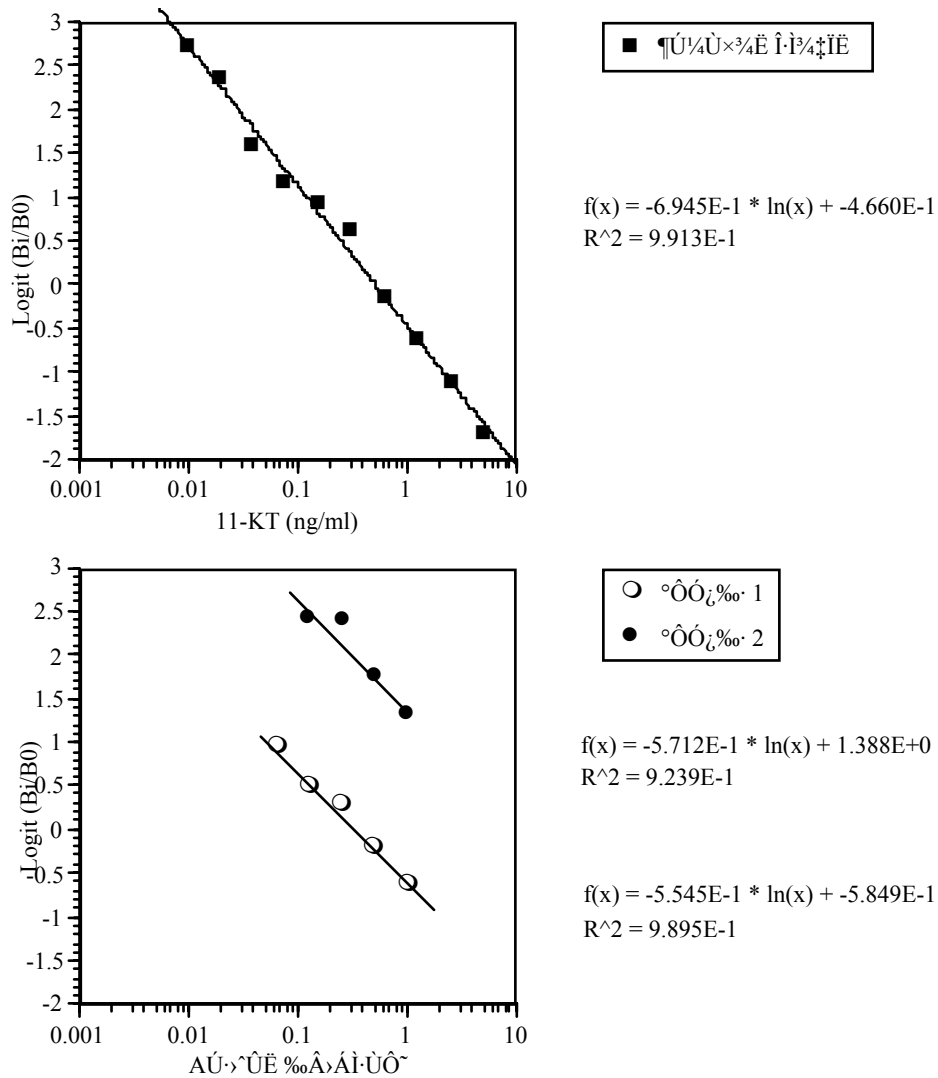
$$f(x) = -1.247E+0 * \ln(x) + 9.809E-1$$

$$R^2 = 9.773E-1$$

$$f(x) = -1.122E+0 * \ln(x) + 9.599E-1$$

$$R^2 = 10.000E-1$$

Εικόνα 22. Παραλληλισμός των καμπυλών της πρότυπης καμπύλης (επάνω) και δύο δειγμάτων γονάδας λαβρακιού (κάτω) για την T. Οι καμπύλες έχουν μετασχηματιστεί σε γραμμικές με τη χρήση του logit. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κλίση της καμπύλης (ANOVA, P=0.9).

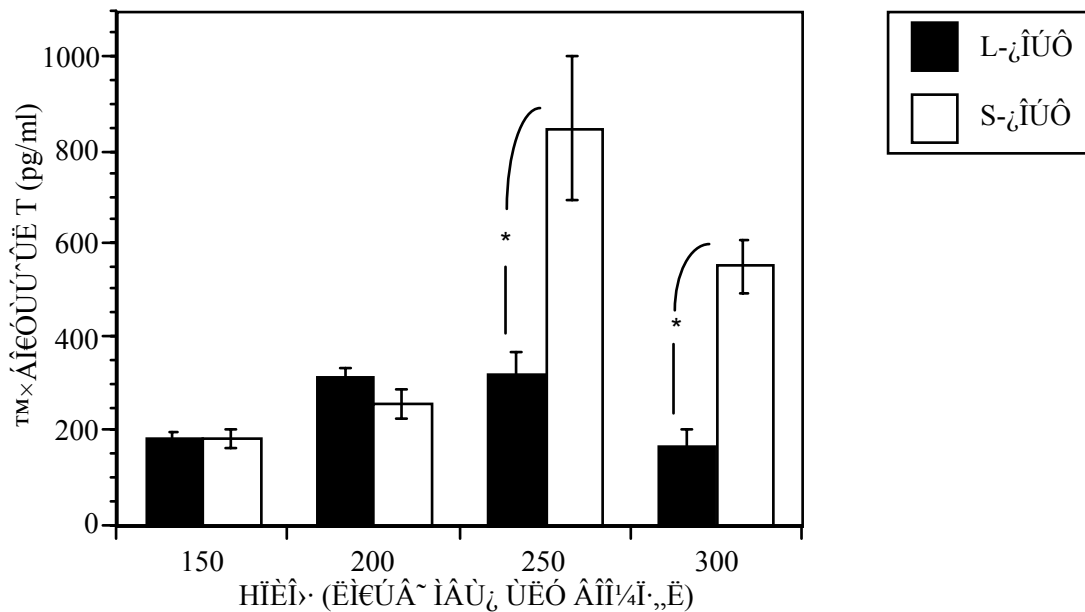


Εικόνα 23. Παραλληλισμός των καμπυλών της πρότυπης καμπύλης (επάνω) και δύο δειγμάτων γονάδας λαβρακιού (κάτω) για την 11 - κετοτεστοστερόνη. Οι καμπύλες έχουν μετασχηματιστεί σε γραμμικές με τη χρήση του logit. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κλίση της καμπύλης (ANOVA, P=0.99).

3.3.2 Επίπεδα στεροειδών ορμονών

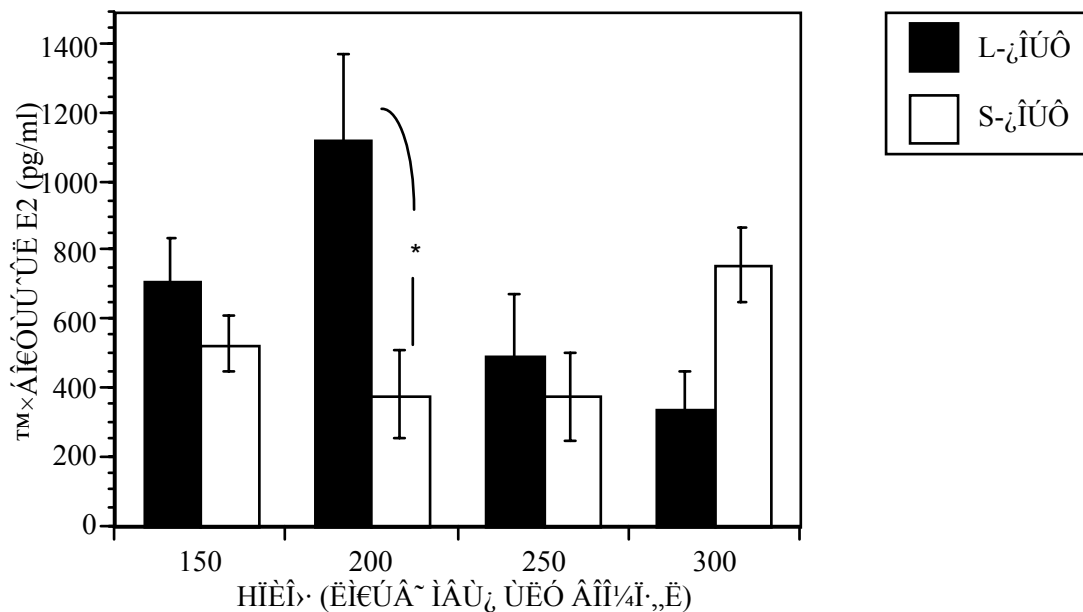
3.3.2.1 *Επίπεδα τεστοστερόνης, οιστραδιόλης και 11-κετοτεστοστερόνης στο πλάσμα*

Η συγκέντρωση της T στο πλάσμα παρουσίασε διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος (2way-ANOVA, $P < 0.01$) και αυξήθηκε με την ηλικία των ψαριών, φτάνοντας σε μέγιστο την ημέρα 250 μετά την εκκόλαση στον πληθυσμό S-άκρο, όπου και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς (means comparison test, $P = 0.001$). Στη συνέχεια μειώθηκε την ημέρα 300, όπου επίσης παρουσιάστηκε διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς (means comparison test, $P = 0.0001$). Στο L-άκρο παρέμεινε σχεδόν σταθερή κατά τη διαφοροποίηση φύλου (Εικόνα 24).



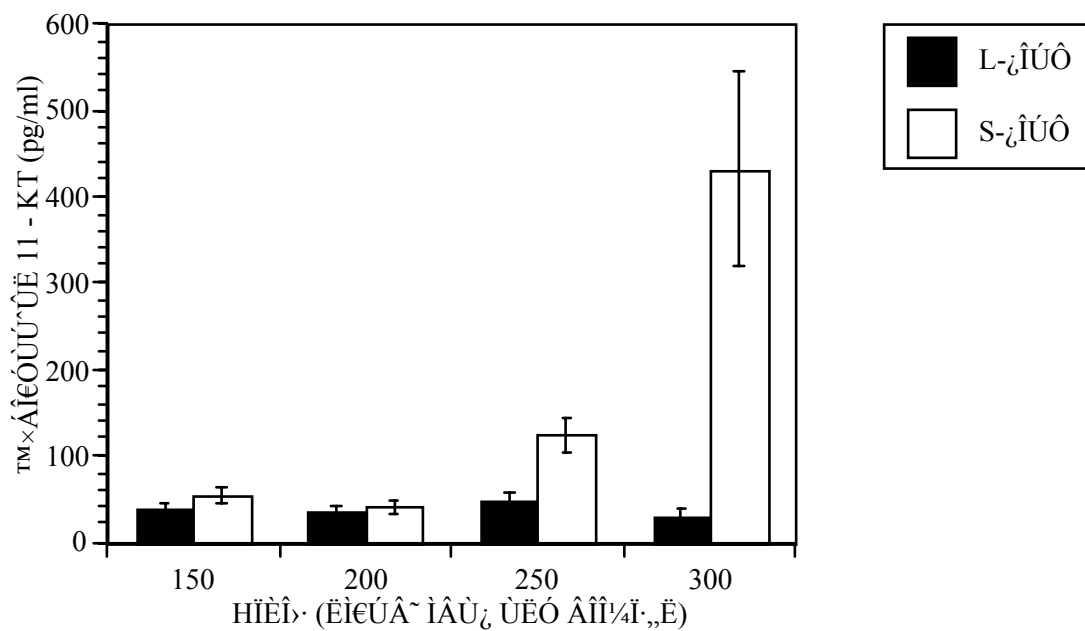
Εικόνα 24. Συγκέντρωση T (pg/ml) στο πλάσμα των πληθυσμών λαβρακιού L- άκρο και S-άκρο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) 12 ατομικών δειγμάτων. Με αστερίσκο δεικνύονται οι διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς για την κάθε ηλικία των ιχθυδίων (Means comparison, $P \leq 0.001$).

Οι πληθυσμοί L-άκρο και S-άκρο διέφεραν σημαντικά ως προς τη συγκέντρωση E2 στο πλάσμα τους κατά τη διάρκεια του πειράματος (2way-ANOVA, $P=0.007$) (Εικόνα 25). Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς σε συγκεκριμένη ηλικία εντοπίστηκε μόνο την ημέρα 200, όπου η E2 απέκτησε τριπλάσια τιμή στον πληθυσμό L-άκρο (means comparison test, $P=0.0014$), συμπίπτοντας με την παρουσία των πρώτων προλεκιθικών ωοκυττάρων. Για το S-άκρο οι μεγαλύτερες τιμές της E2 εντοπίστηκαν την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη.



Εικόνα 25. Συγκεντρώσεις E2 στο πλάσμα των πληθυσμών λαβρακιού L-άκρο και S-άκρο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο±τυπικό σφάλμα 12 ατομικών δειγμάτων. Με αστερίσκο δεικνύονται οι διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς για την κάθε ηλικία των ιχθυδίων (Means comparison test, $P=0.0014$)

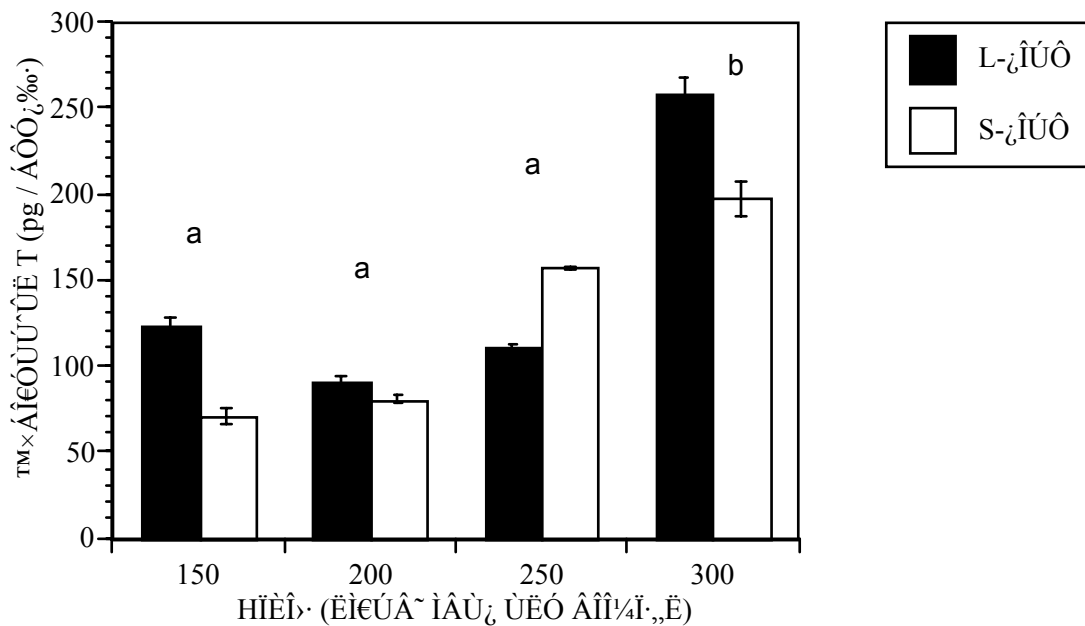
Η 11-KT παρουσίασε διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος (2way-ANOVA, $P < 0.01$). Στο L-άκρο παρέμεινε περίπου σταθερή, ενώ στο S-άκρο αυξήθηκε κι έδωσε τη μέγιστη τιμή της την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Συγκεντρώσεις 11-KT (pg/ml) στο πλάσμα των πληθυσμών λαβρακιού L-άκρο και S-άκρο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) 12 ατομικών δειγμάτων.

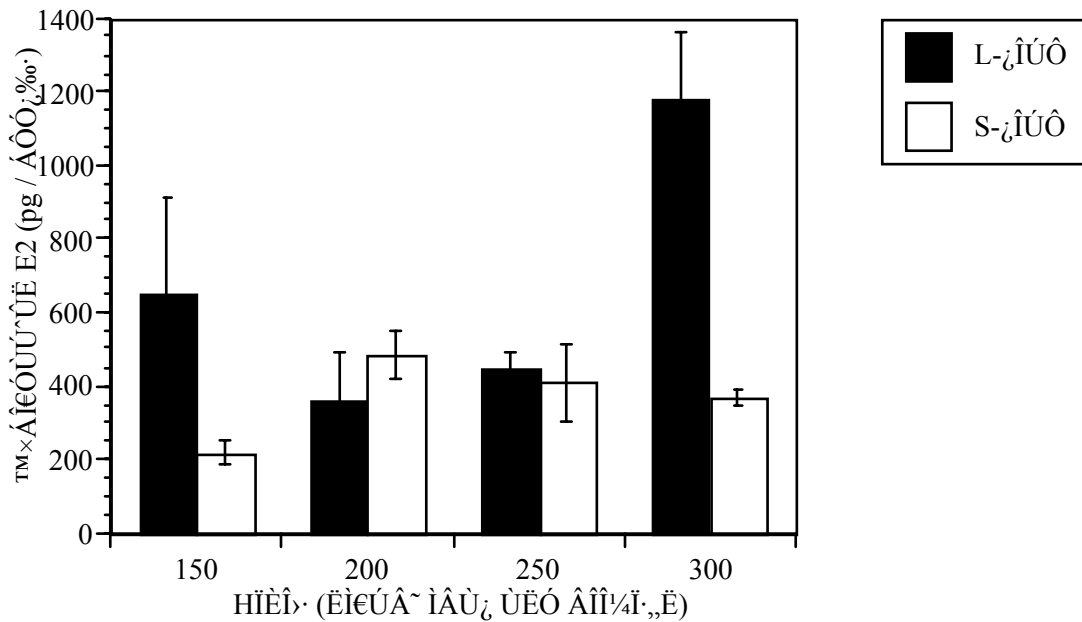
3.3.2.2 Επίπεδα τεστοστερόνης, οιστραδιόλης και 11-κετοτεστοστερόνης στις γονάδες

Όσο αφορά στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών στα δείγματα γονάδων των δύο πληθυσμών, φαίνεται πως δεν ακολουθήθηκαν παρόμοια πρότυπα μεταβολής τους με αυτά του πλάσματος, εκτός από την 11-KT. Οι τιμές που παρουσιάζονται στις παρακάτω γραφικές παραστάσεις αναφέρονται σε pg/γονάδα. Η T αυξήθηκε σταδιακά με την ηλικία των ψαριών, αλλά η τιμή της δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα στους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος (2way-ANOVA). Παρατηρήθηκε, όμως διαφορά άσχετα από τους πληθυσμούς στο χρόνο (Fisher's PLSD, $P < 0.05$) (Εικόνα 27).



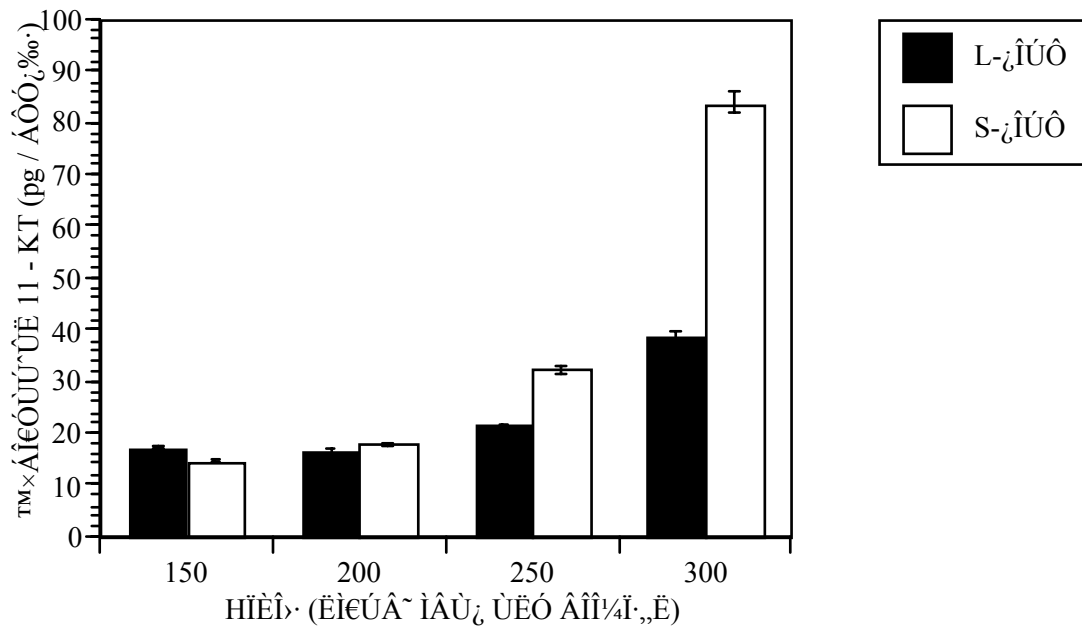
Εικόνα 27. Συγκεντρώσεις T (pg/gonad) σε ομογενοποιημένες γονάδες από τους πληθυσμούς λαβρακιού L-άκρο και S-άκρο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) 10 ατομικών δειγμάτων. Με διαφορετικά λατινικά γράμματα δεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές άσχετα από τους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος (Fisher's PLSD, $P < 0.05$).

Οι τιμές της E2 δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος (2way-ANOVA) (Εικόνα 28). Στο L-άκρο παρατηρήθηκε ένα μέγιστο την ημέρα 150 μετά την εκκόλαψη με τιμές περίπου 3 φορές μεγαλύτερες από αυτές στο S-άκρο και ένα δεύτερο μέγιστο την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη, με επίσης τριπλάσια τιμή από αυτή του S-άκρου. Για το S-άκρο οι τιμές της E2 απέκτησαν μέγιστο την ημέρα 200 μετά την εκκόλαψη.



Εικόνα 28. Συγκεντρώσεις E2 (pg/gonad) σε ομογενοποιημένες γονάδες των πληθυσμών λαβρακιού L άκρο και S-άκρο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) 10 ατομικών δειγμάτων.

Η 11-KT παρουσίασε παρόμοιο πρότυπο με αυτό των συγκεντρώσεών της στο πλάσμα, δίνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος (2-way ANOVA, $P < 0.01$) και αποκτώντας τη μεγαλύτερη τιμή της την ημέρα 300 μετά την εκκόλαση και για τους δύο πληθυσμούς (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Συγκεντρώσεις 11-KT (pg/gonad) σε ομογενοποιημένες γονάδες των πληθυσμών λαβρακιού L-άκρο και S-άκρο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) 10 ατομικών δειγμάτων.

3.4 Συζήτηση

Οι μελέτες πάνω στο συσχετισμό των επιπέδων των ενδογενών στεροειδών ορμονών των γονάδων με τη διαφοροποίηση φύλου δεν έχουν ακόμη διευκρινίσει τη σημασία των T, E2 και 11-KT για τη διαδικασία αυτή. Οι μεταβολές στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών (T, KT, An και E2) που βρέθηκαν σε αναπτυσσόμενα ιχθύδια της ιριδιίζουσας πέστροφας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι στεροειδείς ορμόνες ενδέχεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση φύλου στα ψάρια (Feist και Schreck, 1996). Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν και οι Yeoh et al. (1996a, b) και οι Hines et al. (1999), οι οποίοι εντόπισαν ενεργό το μεταβολισμό των στεροειδών κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου στην ιριδιίζουσα πέστροφα και την τιλάπια αντίστοιχα.

Γενικά, από τις υπάρχουσες μελέτες για τις στεροειδείς ορμόνες, φαίνεται ότι οι γοναδικές ορμόνες δεν έχουν την ίδια σημασία για τη διαφοροποίηση φύλου σε όλα τα είδη ψαριών που μελετήθηκαν. Στην τιλάπια η T εντοπίστηκε ως η μόνη από τις στεροειδείς ορμόνες των γονάδων που μπορεί να συσχετιστεί με τη διαφοροποίηση φύλου του είδους (Rothbard et al., 1987). Φυλετικός διμορφισμός στα επίπεδα των ανδρογόνων (T, 11-KT και A), αλλά όχι και στα επίπεδα των οιστρογόνων συσχετίστηκε με τη διαφοροποίηση φύλου του ασημένιου σολομού (Feist et al., 1990). Επιπλέον, η T βρέθηκε να σχετίζεται με τα αναπτυξιακά μονοπάτια που οδηγούν στην αρσενική διαφοροποίηση στην τιλάπια, ενώ η E2, η οιστρόνη και η οιστριόλη δε φάνηκαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη θηλυκή διαφοροποίηση (Rowell et al., 2002). Σε μελέτη των Chang et al. (1999) πάνω στην ελεγχόμενη διαφοροποίηση φύλου του κέφαλου η T αναγνωρίστηκε ως σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση φύλου, παρόλο που στην 11-KT και στην E2 δεν αποδόθηκε κανένας σημαντικός ρόλος. Επιπλέον, σε αρσενικές γονάδες στην τιλάπια βρέθηκαν ποσότητες 11-KT σε επίπεδο femtoogram πριν από την ορχική διαφοροποίηση και πριν από την εμφάνιση κυττάρων που παράγουν στεροειδή στις γονάδες (D' Cotta et al., 2001a). Σε πρόσφατη μελέτη για τα ερπετά με περιβαλλοντικό καθορισμό φύλου, έχει προταθεί ότι η E2 της λεκίθου των αυγών μπορεί να αποτελεί σύνδεσμο ανάμεσα στη θερμοκρασία και την έκφραση των απαραίτητων γονιδίων για τη διαφοροποίηση φύλου (Elf, 2003).

Στην παρούσα μελέτη, εκτός από την 11-KT, τα επίπεδα των δύο άλλων ορμονών (T και E2) δε μεταβάλλονται με το ίδιο πρότυπο στο πλάσμα και στις γονάδες. Η προέλευση των στεροειδών ορμονών που εντοπίζονται στο πλάσμα των ψαριών αποτελεί προβληματικό θέμα (Chang et al., 1995). Η συγκέντρωση ενός στεροειδούς στο πλάσμα σε μια δεδομένη στιγμή εξαρτάται από τρεις παράγοντες: 1) το ρυθμό με τον οποίο το στεροειδές βιοσυντίθεται και εισέρχεται στα υγρά του σώματος, 2) το ρυθμό με τον οποίο το στεροειδές απενεργοποιείται βιολογικά με τον καταβολισμό και απομακρύνεται από τα υγρά του σώματος και 3) το πόσο ισχυρό δεσμό έχει σχηματίσει το στεροειδές με την πρωτεΐνη που το μεταφέρει στο πλάσμα (Norman και Litwack, 1982). Δηλαδή οι συγκεντρώσεις των στεροειδών που μετριοούνται στο πλάσμα αντιπροσωπεύουν το σύνολο έκκρισης και απέκκρισης και δε λαμβάνεται υπόψη ο μεταβολισμός τους στις γονάδες, το αίμα και το συκώτι (Hobby και Pankhurst, 1997), όπου σχηματίζονται σύμπλοκα των στεροειδών με γλυκουρονίδια και θειικά (Idler et al., 1971, Scott et al., 1990). Στο πλάσμα μπορεί επίσης να εντοπιστούν στεροειδή και μη γοναδικής προέλευσης, τόσο από τη σύνθεση στον ενδονεφρικό ιστό όσο και από περιφερειακό μεταβολισμό των γοναδικών στεροειδών και των στεροειδών του ενδονεφρικού ιστού (Scott και Vermeirssen, 1994). Γι' αυτό και στην παρούσα μελέτη τα πρότυπα μεταβολής των επιπέδων των γοναδικών στεροειδών E2 και T στο πλάσμα και τις γονάδες των ιχθυδίων δεν είναι πανομοιότυπα.

Στις μετρήσεις της συγκέντρωσης της T στο πλάσμα των δύο πληθυσμών της παρούσας μελέτης παρουσιάστηκε διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος, με τον πληθυσμό S-άκρο να εμφανίζει μεγαλύτερες ποσότητες, στατιστικά σημαντικές την ημέρα 250 μετά την εκκόλαψη, όπου εμφανίστηκε και το μέγιστο της ορμόνης αυτής, και την ημέρα 300 μετά την εκκόλαψη, δηλαδή κατά την εμφάνιση του μέγιστου της 11-KT. Αντίθετα, η συγκέντρωση της T στις γονάδες δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς L-άκρο και S-άκρο στο χρόνο. Στο λαβράκι, σε μελέτη των RodrTMguez et al. (2000b), όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα των ορμονών T και 11-KT κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου και της πρώτης αναπαραγωγικής ωρίμανσης σε αρσενικά ψάρια ηλικίας μεγαλύτερης των 9 μηνών (~ 270 ημερών), τα μεγαλύτερα επίπεδα T παρατηρήθηκαν κατά τον 9^ο μήνα, ενώ

τα επίπεδα της 11-KT παρέμειναν σε βασικά επίπεδα καθόλη την περίοδο αυτή. Το συμπέρασμα που προτάθηκε ήταν ότι η T πιθανότατα παίζει ρόλο στις αρχικές φάσεις της διαφοροποίησης. Τα μεγαλύτερα επίπεδα της T της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκαν επίσης την ημέρα 250 μετά την εκκόλαψη, σε συμφωνία με την παραπάνω μελέτη. Στα αρσενικά ψάρια της παρούσας μελέτης, όμως, συμπεριλήφθηκαν και αρσενικά άτομα με πρόωρη ωρίμανση, σε αντίθεση με τη μελέτη των RodrTMguez et al (2000b), πράγμα που δικαιολογεί και την αύξηση στα επίπεδα της 11-KT στο πλάσμα. Στην παρούσα μελέτη, η T παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή της πριν να παρατηρηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό αρσενικών ατόμων που παράγουν σπέρμα, σε συμφωνία με μελέτη των RodrTMguez et al. (2000b) σε ψάρια που διήνυαν την πρώτη αναπαραγωγική τους περίοδο. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι το στεροειδές αυτό πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της σπερματογένεσης. Σε μελέτη που έγινε στις στεροειδείς ορμόνες T και 11-KT αρσενικών ατόμων λαβρακιού κατά τη διάρκεια της πρώτης αναπαραγωγικής τους περιόδου (RodrTMguez et al., 2001) βρέθηκε ότι η πρώτη σημαντική αύξηση στα επίπεδα των ορμονών αυτών εμφανίστηκε κατά τις πρώτες φάσεις της περιόδου σπερμίας και ότι τα επίπεδά τους μειώνονταν στη συνέχεια της. Η 11-KT παρουσίασε παρόμοιο τρόπο μεταβολής όπως και η T, παρόλο που τα επίπεδά της ήταν υψηλότερα. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι και τα δύο ανδρογόνα είναι απαραίτητα για την έναρξη της σπερμίας. Επιπλέον, η αναλογία 11-KT και T έδωσε τα μεγαλύτερα επίπεδά της κατά τη μέγιστη σπερμίαση, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η 11-KT αποτελεί το κυριότερο ανδρογόνο για τη διέγερση της σπερματογένεσης και/ή της σπερμιόγένεσης στο αρσενικό λαβράκι. Αλλά και στη μελέτη για τις τρεις μορφές της GnRH κατά τη διαφοροποίηση φύλου φαίνεται ότι αυτές αποκτούν το μέγιστό τους τον 9^ο μήνα, δηλαδή προς το τέλος της διαφοροποίησης φύλου (RodrTMguez et al., 2000b). Επιπλέον, η T έχει βρεθεί να έχει θετική ανάδραση στον άξονα εγκεφάλου-υπόφυσης-γονάδων, προκαλώντας επιτάχυνση της διαφοροποίησης των γονάδων και την πρόκληση της σπερματογένεσης στο λαβράκι μέσω της επίδρασής της στη σύνθεση και απελευθέρωση της GnRH (Zanuy et al., 1999).

Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η T δεν έδειξε φυλετικό διμορφισμό στα επίπεδά της στις γονάδες των πληθυσμών L-άκρο και S-άκρο μπορούν

να οδηγήσουν στην υπόθεση ότι η T δεν μπορεί να συσχετιστεί με τη διαφοροποίηση φύλου. Όπως είναι γνωστό, η T αποτελεί την πρόδρομο ένωση τόσο για την E2 όσο και για την 11-KT. Ενδέχεται τα επίπεδα της T στο πλάσμα του S-άκρου να αυξάνονται για την παραγωγή της 11-KT στα αρσενικά άτομα καθώς και για την ενεργοποίηση του άξονα εγκεφάλου-υπόφυσης-γονάδων, ενώ στις γονάδες να μην παρουσιάζουν φυλετικό διμορφισμό, καθώς είναι απαραίτητη τόσο για τα θηλυκά (παραγωγή E2) όσο και για τα αρσενικά (παραγωγή 11-KT) άτομα λαβρακιού. Άλλωστε, παραγωγή T σε ώριμα άτομα λαβρακιού τόσο θηλυκά όσο και αρσενικά έχει εντοπιστεί καθόλη τη διάρκεια του χρόνου και όχι μόνο κατά την αναπαραγωγική περίοδο (Prat et al., 1999), δεικνύοντας κάποιο ρόλο της T στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης της γονάδας.

Η E2 παρουσίασε διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς στα δείγματα των γονάδων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Από την άλλη, στα δείγματα του πλάσματος η E2 δε διέφερε ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από την ημέρα 200 μετά την εκκόλαψη, όπου ήταν μεγαλύτερη στα θηλυκά άτομα. Η ηλικία αυτή των ψαριών είναι και αυτή όπου παρατηρείται η πρώτη παρουσία πρωτογενών ωοκυττάρων. Διαφορές στα επίπεδα της έκφρασης του υποδοχέα της οιστραδιόλης ERα ανάμεσα στο L-άκρο και το S-άκρο έχουν βρεθεί, όπου η έκφραση ήταν υψηλότερη στο L-άκρο τις ημέρες 250 και 300 μετά την εκκόλαψη στην υπόφυση και τις ημέρες 200 και 300 στις γονάδες, ιστοί στους οποίους κυρίως εκφράστηκε ο υποδοχέας ERα (Rodríguez et al., 2003). Σε αδημοσίευτη μελέτη (González και Pifferer), εντοπίστηκαν διαφορές και στην έκφραση της αρωματάσης στις γονάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων λαβρακιού, προσδίδοντάς στο ένζυμο αυτό, και επομένως στην E2 κάποιο ρόλο στη διαδικασία της γοναδικής διαφοροποίησης. Μάλιστα, στην παρούσα μελέτη, η E2 ήταν η μόνη από τις τρεις μελετούμενες ορμόνες, η οποία παρουσίασε διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς την ημέρα 200 μετά την εκκόλαψη, δηλαδή πριν από την ολοκλήρωση της διαφοροποίησης φύλου. Στην τιλάπια, σε μελέτη πάνω στα ένζυμα παραγωγής στεροειδών βρέθηκε πρόσφατα ότι οι θηλυκές διαφοροποιούμενες γονάδες περιέχουν ανοσοθετικά κύτταρα για όλα τα αντισώματα των ενζύμων των κυριότερων στεροειδών, ενώ οι αρσενικές γονάδες δεν έδειξαν έκφραση των ενζύμων αυτών, παρά μόνο μετά τη διαφοροποίηση του όρχι (Nagahama et al., 2003). Πιθανότατα αυτό το πρότυπο να ισχύει

και για το λαβράκι, δηλαδή τα οιστρογόνα να ευθύνονται για τη διαφοροποίηση των θηλυκών, ενώ τα ανδρογόνα να εμφανίζονται μετά τη διαφοροποίηση του όρχι. Εδώ θα έπρεπε να σημειωθεί ότι τα οιστρογόνα ενδέχεται να παίζουν σημαντικότερο ρόλο από αυτόν που τους έχει αποδοθεί μέσω των κλασικών ανοσολογικών ή ραδιενεργών τεχνικών, είτε επειδή τα επίπεδά τους είναι χαμηλά ή εντοπισμένα σε συγκεκριμένους ιστούς είτε επειδή ενεργούν μέσω άγνωστων συμπλόκων (Rowell et al., 2002). Για να μπορεί, λοιπόν, να διατυπωθεί τελικό συμπέρασμα για το ρόλο των οιστρογόνων στο λαβράκι, απαιτούνται ανοσοιστοχημικές αναλύσεις γονάδων για τον εντοπισμό των ενζύμων παραγωγής τους.

Η 11-KT παρουσίασε διαφορά στους δύο πληθυσμούς κατά τη διάρκεια του πειράματος τόσο στα δείγματα του πλάσματος όσο και σε αυτά των γονάδων. Το γεγονός ότι η 11-KT και όχι η T φάνηκε να συσχετίζεται με τη διαφοροποίηση φύλου στο λαβράκι συμφωνεί με το γεγονός ότι η 11-KT θεωρείται το κυριότερο ανδρογόνο στα ψάρια (Borg, 1994). Επιπλέον, είναι πιο ικανή στην πρόκληση της αρσενικοποίησης από ότι η T, όπως έχει δειχτεί από πειράματα χορήγησης εξωγενών ορμονών (Donaldson, 1996). Μάλιστα, το πρότυπο μεταβολής της 11-KT στην παρούσα μελέτη ήταν παρόμοιο, τόσο στα δείγματα του πλάσματος όσο και στα δείγματα των γονάδων, πράγμα που δίνει μεγαλύτερη ισχύ στη διατύπωση ότι η ορμόνη αυτή συσχετίζεται με τη διαφοροποίηση φύλου. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η 11-KT ευθύνεται και για τη σπερματογένεση και/ή τη σπερμιάση στο αρσενικό λαβράκι (Rodríguez et al., 2000b) κι επομένως τα υψηλά επίπεδα που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη την ημέρα 300 μετά την εκκόλαση στον πληθυσμό S-άκρο μπορούν να εξηγηθούν κατά ένα μέρος και από την παρουσία πρώιμων αρσενικών ατόμων στον πληθυσμό αυτό.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές T στον πληθυσμό των θηλυκών ατόμων, που σε μερικές περιπτώσεις ξεπερνούσαν και αυτές των αρσενικών, ενώ μη αμελητέες ποσότητες E2 ανιχνεύτηκαν στον αρσενικό πληθυσμό. Σε μελέτη για τις εποχικές διακυμάνσεις των στεροειδών ορμονών των γονάδων, βρέθηκε ότι η T στα θηλυκά άτομα του λαβρακιού ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή των αρσενικών κατά τη διάρκεια ολόκληρου του αναπαραγωγικού κύκλου, εκτός από το μήνα Ιούλιο (Prat et al., 1990). Το εύρημα αυτό είναι λογικό αφού η σύνθεση της E2 στα θηλυκά άτομα

εξαρτάται από την παρουσία T. Τα επίπεδα της T σε θηλυκά άτομα λαβρακιού φτάνουν τα 4 ng/ml σε μια επιπλέον μελέτη (Cerda et al., 1995). Επίσης, στοιχειώδη επίπεδα E2 έχουν εντοπιστεί σε αρσενικά άτομα (Zanuy et al., 1999), ενώ έχει διαπιστωθεί ότι στον οξύρυγχο (*Acipenser baeri*) τόσο η ωοθήκη, όσο και τα κύτταρα του αίματος και ο ενδονεφρικός ιστός είναι ικανά να συνθέτουν 11-KT από την 17-υδροξυπρογεστερόνη, την κορτιζόλη και την ανδροστενεδιόνη αντίστοιχα. (Cuisset et al., 1995). Από τους ιστούς αυτών, μόνο η ωοθήκη φαίνεται ικανή να κατέχει όλα τα απαραίτητα ένζυμα για αυτόνομη σύνθεση 11-KT. Η 11-KT εντοπίστηκε επίσης σε γονάδες από θηλυκά άτομα στην τιλάπια (D' Cotta et al., 2001a), πριν και κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης φύλου, ανακλώντας μια διπλή δυνητικότητα των θηλυκών διαφοροποιούμενων γονάδων. Αλλά και τα επίπεδα της λεκιθογενίνης στο πλάσμα αρσενικών ατόμων του ιαπωνικού είδους *Sillago japonica* φαίνονται να αυξάνονται κατά την περίοδο των σπερματογενετικών σταδίων (Hotta et al., 2003), ενώ έχει διατυπωθεί και η άποψη ότι η E2 έχει κάποιου είδους βιολογική δράση στα αρσενικά άτομα διαφόρων σπονδυλωτών, μέσω της πρόκλησης της σπερματογονικής ανανέωσης των stem cells (Schulz και Miura, 2002).

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από το παρόν τμήμα της μελέτης είναι ότι το οιστρογόνο E2 και το ανδρογόνο 11-KT μπορούν να συσχετιστούν με τη διαφοροποίηση του φύλου στο λαβράκι. Επειδή όμως οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς εντοπίζονται κυρίως κατά τη διάρκεια και μετά από την ιστολογικά αναγνωρίσιμη γοναδική διαφοροποίηση, περαιτέρω μελέτες σε σχέση με τους υποδοχείς και τα ένζυμα που συνδέονται με τη διαφοροποίηση φύλου στο είδος αυτό είναι απαραίτητες. Πάντως, η σημασία της παρούσας μελέτης είναι μεγάλη, καθώς αποτελεί την πρώτη απόπειρα για το συσχετισμό αυτό στο συγκεκριμένο ψάρι, και μάλιστα σε πληθυσμούς στους οποίους λαμβάνει χώρα φυσική διαφοροποίηση φύλου και όχι επαγόμενη από εξωγενείς ορμόνες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναστροφή του φύλου των ψαριών με τη χορήγηση εξωγενών στεροειδών ορμονών έγινε εφικτή από τη δεκαετία του 1970 (Yamamoto, 1969), γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι στεροειδείς ορμόνες είναι οι φυσικοί τελικοί προαγωγείς της διαφοροποίησης φύλου. Με βάση το παραπάνω γεγονός, αρκετές μελέτες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την ιστολογική διαφοροποίηση της γονάδας με τα επίπεδα των γοναδικών στεροειδών ορμονών κατά την περίοδο της διαφοροποίησης φύλου σε διάφορα είδη ψαριών, αλλά το τελικό συμπέρασμα στις περισσότερες από αυτές ήταν ότι δεν είναι δυνατή η διατύπωση μιας σταθερής άποψης για το αν οι αλλαγές στα φυλετικά στεροειδή αποτελούν την αιτία ή το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής (Chang et al., 1995• Hines et al., 1999• Devlin και Nagahama, 2002). Στο μεταξύ, μελέτες για διαφορετικούς παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγή στεροειδών ορμονών, όπως τα κύτταρα που παράγουν στεροειδή και τη δράση της αρωματάσης, του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή της T σε E2, έχουν πραγματοποιηθεί για μεγάλο αριθμό ψαριών (Nakamura et al., 1998• Afonso et al., 2001• Guiguen et al., 1999• Kwon et al., 2001• Govoroun et al., 2001• Liu et al., 2000) και υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα φυλετικά στεροειδή προκαλούν όντως τη διαφοροποίηση των γονάδων, παρόλο που τα επίπεδά τους πιθανότατα δεν εντοπίζονται με τις διαθέσιμες τεχνικές ή αυτά δρουν με τη μορφή άγνωστων συμπλόκων.

Στην τιλάπια, τα κύτταρα που παράγουν στεροειδή εντοπίζονται για πρώτη φορά κατά την αρχική ωοθηκική και ορχική ανάπτυξη στις 23-26 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι οι γονάδες είναι ικανές να συνθέτουν στεροειδή κοντά στην περίοδο της διαφοροποίησης φύλου (Nakamura et al., 1998). Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα κύτταρα που παράγουν στεροειδή στις υποτιθέμενες ωοθήκες κατά το αδιαφοροποίητο στάδιο και στις διαφοροποιούμενες ωοθήκες εκφράζουν τα ένζυμα για τη βιοσύνθεση της E2 από τη χολεστερόλη. Επομένως, τα ενδογενή οιστρογόνα δρουν ως φυσικοί προαγωγείς της θηλυκής διαφοροποίησης στην τιλάπια, ενώ η ικανότητα των

κυττάρων που παράγουν στεροειδή στους όρχεις εμφανίζεται κατά την ορχική διαφοροποίηση (Nakamura et al., 1998). Η μακρά θεραπεία με τον αναστολέα της αρωματάσης fadrozol προκάλεσε ορχική διαφοροποίηση στην ωοθήκη πολύ μετά τη διαφοροποίηση φύλου, ακόμα και στην ώριμη ωοθήκη, ενώ η θεραπεία με ανδρογόνα δεν επέφερε ορχική διαφοροποίηση σε αυτό το είδος (Nakamura, 2003).

Σε μελέτη σχετικά με το ρόλο της αρωματάσης και την έκφραση των γονιδίων των υποδοχέων των οιστρογόνων στην ιριδίζουσα πέστροφα και στην τιλάπια (Guiguen et al., 1999• Kwon et al., 2001), προτείνεται ότι η αρωματάση καταστέλλεται κατά την αρσενική διαφοροποίηση φύλου, πιθανότατα από κάποιο γονίδιο κατά την έκφραση του Y χρωμοσώματος. Μέρος σε αυτή τη διαδικασία καταστολής της αρωματάσης προτείνονται να παίζουν τα 11-οξυγονωμένα ανδρογόνα (Guiguen et al., 1999• Gonoroun et al., 2001). Σε μια άλλη μελέτη στην τιλάπια, η υψηλή έκφραση της αρωματάσης, σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων χαρακτηρίζει τη θηλυκή διαφοροποίηση, ενώ η θερμοκρασία φαίνεται να παίζει ρόλο στην αρσενικοποίηση, προκαλώντας μείωση στην έκφραση της αρωματάσης (D' Cotta et al., 2001b). Αλλά και σε μελέτη στην ιριδίζουσα πέστροφα για το φυλετικό διμορφισμό στο γονίδιο της 11β-υδροξυλάσης, ένζυμο το οποίο μετατρέπει την T σε 11-KT, ανιχνεύτηκε έκφραση του γονιδίου αυτού πριν την ορχική διαφοροποίηση, ενώ στα θηλυκά άτομα δεν ανιχνεύτηκε καθόλου η έκφρασή του (Liu et al., 2000). Στην τιλάπια (Hines et al., 1995• Afonso et al., 2001), η χορήγηση του αναστολέα της αρωματάσης Fadrozole σε αναπτυσσόμενες αδιαφοροποίητες λάρβες οδήγησε στην παραγωγή 100% αρσενικών ατόμων, αποδεικνύοντας την εμπλοκή του ενζύμου της αρωματάσης στη διαφοροποίηση φύλου για το είδος αυτό. Αλλά και στη γλώσσα (*Paralichthys olivaceus*) έχει αποδεικτεί ο ρόλος της αρωματάσης στην αναστροφή φύλου με τη χρήση του ίδιου αναστολέα της δράσης της (Kitano et al., 2000).

Στο λαβράκι, η έκφραση της αρωματάσης έχει μελετηθεί από τους Gonz'lez και Pifferer (2000, 2002, 2003), αλλά ο ρόλος της δεν έχει καθοριστεί πλήρως. Γενικά, έχει παρατηρηθεί συσχέτιση ανάμεσα στη δραστηριότητα της αρωματάσης και το φύλο, όπως και την ηλικία του λαβρακιού (Gonz'lez και Pifferer, 2003). Σε αδημοσίευτη μελέτη των

González και Pifferer, η έκφραση της αρωματάσης στον εγκέφαλο κατά την περίοδο της διαφοροποίησης των γονάδων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα, αλλά διαφορές εντοπίστηκαν στην έκφρασή της στις γονάδες, προσδίδοντάς της έτσι κάποιο ρόλο στη διαδικασία της γοναδικής διαφοροποίησης.

Στην παρούσα μελέτη, ενώ οι πρώτες διαφορές στην οντογένεση της διαφοροποίησης του φύλου παρατηρήθηκαν περίπου την ημέρα 150 μετά την εκκόλαψη των ιχθυδίων, οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των στεροειδών ορμονών διαπιστώθηκαν αργότερα. Με βάση το γεγονός ότι το φύλο του λαβρακιού μπορεί να μεταβληθεί με τη χορήγηση εξωγενών στεροειδών ορμονών (Blázquez et al. 1995, 1998a, 1999, 2001) και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που δείχνουν φυλετικό διμορφισμό στα επίπεδα της E2 την ημέρα 200 μετά την εκκόλαψη, δηλαδή πριν από την ολοκλήρωση της διαφοροποίησης φύλου, μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι τα στεροειδή όντως αποτελούν τους φυσικούς προαγωγείς της διαφοροποίησης φύλου στο λαβράκι, αλλά οι ποσότητές τους που ανιχνεύονται με τη χρήση ενζυμο- και ραδιο- ανοσολογικών τεχνικών στο πλάσμα ή τις γονάδες των αναπτυσσόμενων ατόμων δεν είναι επαρκείς για να αποδείξουν την εμπλοκή τους στη διαφοροποίηση της γονάδας πριν αυτή γίνει ορατή ιστολογικά.

Τα επιτεύγματα της παρούσας μελέτης μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

1. Δημιουργήθηκαν για πρώτη φορά πληθυσμοί με κυρίαρχο το θηλυκό και το αρσενικό φύλο χωρίς τη χρήση φαρμακολογικών μεθόδων. Αυτό καταρχάς αποτελεί μεθοδολογία φιλική προς το περιβάλλον και προς τις ανάγκες των καταναλωτών των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας και κατά δεύτερον επιτρέπει τη μελέτη της φυσικής διαφοροποίησης του φύλου στα αναπτυσσόμενα ιχθύδια, κι όχι της επαγόμενης με εξωγενή στεροειδή.
2. Περιγράφηκε η ιστολογική διαφοροποίηση των γονάδων σε καλλιεργούμενους πληθυσμούς λαβρακιού, βρίσκοντας σημαντικές διαφορές, κυρίως χρονικές, με παλαιότερη μελέτη (Roblin και Bruslé, 1984), οι οποίες οφείλονται κυρίως στις νέες μεθόδους καλλιέργειας.
3. Έγινε συσχέτιση των επιπέδων των στεροειδών ορμονών με τη διαδικασία διαφοροποίησης φύλου για πρώτη φορά στο συγκεκριμένο είδος, σε μια προσπάθεια

απόκτησης περισσότερων πληροφοριών για την εμπλοκή των τελικών αυτών επαγωγέων της διαφοροποίησης του φύλου. Οι στεροειδείς ορμόνες E2 και 11-KT που μετρήθηκαν στους πληθυσμούς L-άκρο και S-άκρο φάνηκαν να σχετίζονται με τη διαφοροποίηση του φύλου κατά τη διάρκεια και μετά την ιστολογική διαφοροποίηση των γονάδων. Η E2 σχετίζεται με την διαφοροποίηση του θηλυκού φαινότυπου, και η 1-KT με την διαφοροποίηση του αρσενικού. Περαιτέρω μελέτες είναι, όμως, απαραίτητες για την πλήρη κατανόηση της φυσιολογικής διαδικασίας διαφοροποίησης φύλου για το είδος αυτό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afonso, L.O.B., Wassermann, G.J., De Oliveira, R.T., 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of Experimental Zoology* 290, 177-181.
- Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, A., Norrgren, L., and Petersen, G. I., 2003. Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 134, 365-374.
- Baker, I.J., Solar, I.I., and Donaldson, E.D., 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17 α -methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture* 72, 359-367.
- Barnabé, G., 1995. The sea bass. In: Nash, C.E. and Novotny, A.J. (Eds), *World Animal Science, Production of Aquatic Animals*, Elsevier, Amsterdam, pp. 269–287.
- Baroiller J.F. and D' Cotta H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130, 399-409.
- Baroiller J.F., Guiguen Y. and Fostier A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 910-931.
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., and Mc Neil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain technology* 51, 71-94.
- Beullens, K., Eding, E. H., Gilson, P., Ollevier, F., Komen, J., and Richter, C. J.J., 1997. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153, 135-150.
- Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Development* 26, 877-920.
- Blázquez, M., Carillo, M., Zanuy, S., and Piferrer, F., 1999. Sex ratios in offspring of sex – reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation. *Journal of Fish Biology* 55, 916–930.

- Blázquez, M., Felip, A., Zanuy, S., Carillo, M., and Piferrer, F., 2001. Critical period of androgen - inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *Journal of Fish Biology* 58, 342-358.
- Blázquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carillo, M., and Donaldson, E.M., 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture* 135, 329-342.
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carillo, M. and Piferrer, F., 1998a. Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 β and 17 α -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 37-47.
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carillo, M., and Piferrer, F., 1998b. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Zoology* 281, 207-216.
- Bond, C.E., 1979. *Biology of fishes*. Saunders college publishing, Philadelphia, 514pp.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109C, 219-245.
- Bromage, N., 1988. Propagation and stock improvement. In: Shepherd, C.J. and Bromage, N.R. (Eds), *Intensive Fish Farming*, BSB Professional Books, Oxford, pp. 103-153.
- Bruslé, J., and Roblin, C., 1984. Sexualite du loup *Dicentrarchus labrax* en condition d'elevege controle. In: Barnabe, G. (Ed.), *L' Aquaculture du Bar et des Sparides*, INRA Publ, Paris, pp. 33-43.
- Carillo M., Zanuy S., Piferrer F., Blazquez M., Felip A., Martinez - Rodriquez G. and Ramos J., 1998. Sex control in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Present state and future prospects. In: Xu, H.S. and Colwell, R. (Eds), *Proceedings of International Symposium on progress and prospect of marine biotechnology*, China Ocean Press, Qingdao, China, pp. 22-32.
- Carillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerda, J., Ramos, J., Mañáns, E., and Bromage, N., 1995. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Bromage, N.R. and Roberts, R.J. (Eds),

- Broodstock management and egg and larval quality, Blackwell Science, Oxford, pp.138-168.
- Cerda, J., Zanuy, S., Carillo, M., Ramos, J., and Serrano, R., 1995. Short-and long-term dietary effects on female sea bass (*Dicentrarchus labrax*): seasonal changes in plasma profiles of lipids and sex steroids in relation to reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology* Vol. 111C, No. 1, 83–91.
- Chan, S.T.H., and Yeong, W.S.B., 1983. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (Eds), *Fish Physiology*, Academic Press Inc, Orlando, Florida, pp. 171-213.
- Chang, C.F., Hung C.Y., Chiang M.C. and Lan S. C., 1999. The concentrations of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture* 177, 37-45.
- Chang, C., Lan, C., and Chou, H., 1995. Gonadal histology and plasma sex steroids during sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *The Journal of Experimental Zoology* 272, 395–406.
- Chatain, B., Saillant, E., and Peruzzi, S., 1999. Production of monosex male populations of European seabass, *Dicentrarchus labrax* L. by use of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture* 178, 225-234.
- Colombo, L., Barbaro, A., Francescon, A., Libertini, A., Bortolucci, M., Argenton, F., Dalla Valle, L., Vianello, S., and Belvedere, P., 1999. Towards an integration between chromosome set manipulation, intergeneric hybridization and gene transfer in marine fish culture. In: C.I.H.E.A.M. (Ed), *Cahiers options mediterraneennes, Genetics and breeding of aquaculture species*, pp. 77–122.
- Cuisset, B., Fostier, A., Williot, P., Bennetau-Pelissero, C., and Le Menn, F., 1995. Occurrence and in vitro biosynthesis of 11 – ketotestosterone in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt maturing females. *Fish Physiology and Biochemistry* 14, 313–322.
- Cuisset, B., Pradelles, P., Kime, D.E., Kuhn, E.R., Babin, P., Davail, S., and LeMenn, F., 1994. Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as

- label: application to the measurement of 11-ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon.
- D' Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., and Baroiller, J., 2001a. Search for genes involved in the temperature – induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology* 290, 574–585.
- D' Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., and Baroiller, J., 2001b. Aromatase plays a key role during normal and temperature - induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development* 59, 265-276.
- Devlin, R. H., and Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Divanach, P., and Kentouri, M., 2000. The mesocosm technology in Mediterranean finfish hatcheries. In: Basurco, B. (Ed.), *Cahier Options Mediterraneennes*, vol: 47, *Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification*, pp. 75-87.
- Donaldson, E.M., 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science* 42, 381-392.
- Elf, P.K., 2003. Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *General and Comparative Endocrinology* 132, 349-355.
- Feist, G., and Schreck, C.B., 1996. Brain-pituitary-gonadal axis during early development and sexual differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 102, 394-409.
- Feist, G., Schreck, C.B., Fitzpatrick, M.S., and Redding, J.M., 1990. Sex steroid profiles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. *General and Comparative Endocrinology* 80, 299-313.
- Felip, A., Piferrer, F., Carillo, M. and Zanuy, S., 2002. Growth, gonadal development and sex ratios of meiogynogenetic diploid sea bass. *Journal of Fish Biology* 61, 347-359.

- Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B., and Zohar, Y., 1983. The gonadal steroids. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (Eds.), *Fish Physiology*, Academic Press Inc, Orlando, Florida, pp. 277-372.
- Foyle, T.P., 1993. A histological description of gonadal development and sex differentiation in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and oestradiol immersed fry. *Journal of Fish Biology* 42, 699-712.
- Fowler, J., Cohen, L., and Jarvis, P., 1998. *Practical Statistics for Field Biology*. John Wiley & Sons Ltd, west Sussex, England, 259 pp.
- Godwin, J., Luckenbach, A., and Borski, J., 2003. Ecology meets endocrinology: environmental sex determination in fishes. *Evolution and Development* 5: 1, 40-49.
- González, A., and Piferrer, F., 2000. Cytochrome P450 aromatase enzyme activity and reproduction in teleost fish: studies in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). In: Norberg B., Kjesbu O.S., Taranger G.L., Andersson E. and Stefansson S.O. (Eds), *Proceedings of the 6th International Symposium on the reproductive Physiology of Fish*, Bergen, Norway, pp. 39-42.
- González, A., and Piferrer, F., 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *Journal of Experimental Zoology* 293, 500–510.
- González, A., and Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 132, 223-230.
- Govoroun, M., Mc Meel, O. M., D' Cotta, H., Ricordel, M., Smith, T., Fostier, A., and Guiguen, Y., 2001. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen - induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Zoology* 290, 558-566.
- Guiguen, Y., Baroiller, J., Ricordel, M., Iseki, K., Mc Meel, O. M., Martin, S.A.M., and Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular reproduction and development* 54, 154-162.

- Harley, V.R., Clarkson, M.J., and Argentaro, A., 2003. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (Sex-Determining Region of the Y Chromosome) and SOX9 [SRY-related High Mobility Group (HMG) Box9]. *Endocrine Reviews* 24, 466-487.
- Hendry, C.I., Martin-Robichaud, D.J., and Benfey, T. J., 1999. Histological determination of sexual differentiation in Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*). In: Norberg B., Kjesbu O.S., Taranger G.L., Andersson E. and Stefansson S.O. (Eds.), *Proceedings of the 6th international Symposium on the Reproductive Physiology of fish*, Bergen, Norway, pp.266.
- Hendry, C.I., Martin-Robichaud, D.J., and Benfey, T.J.I, 2002. Gonadal sex differentiation in Atlantic halibut. *Journal of Fish Biology*, 60: 1431-1442.
- Hines, G.A., and Watts, S.A., 1995. Non - steroidal chemical sex manipulation of tilapia. *Journal of the World Aquaculture Society*, vol 26, no1, 98-102.
- Hines, G.A., Boots, L.R., Wibbels, T., and Watts, S.A., 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cyprinoidei). *General and Comparative Endocrinology* 114, 235-248.
- Hobby, A.C., and Pankhurst, N.W., 1997. The relationship between plasma and ovarian levels of gonadal steroids in the repeat spawning marine fishes *Pagrus auratus* (Sparidae) and *Chromis dispilus* (Pomacentridae). *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 16, no 1, 65-75.
- Hotta, K., Watanabe, T., Kishida, C., Nakamura, Y., Ohkubo, N., Matsubara, T., Adachi, S., and Yamauchi, K., 2003. Seasonality of serum levels of vitellogenin in male Japanese whiting, *Sillago japonica*, reared unter natural temperature and photoperiod. *Fisheries Science* 69, 555-562.
- Hunter, G.A., and Donaldson, E.M., 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (Eds.), *Fish Physiology*, Academic Press Inc, Orlando, Florida, pp. 277-372.
- Idler, D., R., Horne, D.A., and Sangalang, G.B. (1971). Identification and qualification of the major androgens in testicular and peripheral plasma of Atlantic salmon (*Salmo*

- salar*) during sexual maturation. *General and Comparative endocrinology* 16, 257-267.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., and Abe, S., 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methylT cause sex reversal from genetical females to genotypic males and supression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development* 56, 1-5.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., and Nagahama, Y., 2002. Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mechanisms of Development* 111, 167-171.
- Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Schmid, M., Shima, A., and Schartl, M., 2003. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of medaka from other fish species. *Current Biology* 13, 416-420.
- Koopman, P., Bullejos, M., and Bowles, J., 2001. Regulation of male sexual development by *Sry* and *Sox9*. *Jouranl of Experimental Zoology* 290, 463-474.
- Koumoundouros, G., Pavlidis, M., Anezaki, L., Kokkari, K., Sterioti, A., Divanach, P., and Kentouri, M., 2002. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive Ontogenetic Phase. *Journal of Experimental Zoology* 292, 573–579.
- Kwon, J.Y., Mc Andrew, B.J., and Penman, D.J., 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular reproduction and Development* 59, 359-370.
- Liu, S., Govoroun, M., D' Cotta, H., Ricordel, M., Lareye, J., McMeel, O.M., Smith, T., Nagahama, Y., and Guiguen, Y., 2000. Expression of cytochrome P450_{11 β} gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 75, 291-298.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., and Borski, R.J., 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 216: 315-327.

- Manis, E., Zanuy, S., and Carillo, M., 1997. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17β - estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiology and Biochemistry* 16, 211-222.
- Martin, E.A., 2000. *A Dictionary of Biology*, Oxford University Press (Ed.), Oxford, U.K., 656 pp.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M., 2002. DMY is a specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559-563.
- Matty, A.J., 1983. *Fish Endocrinology*. Croom Helm Timber Press, Portland, Oregon, 267pp.
- McDowell, E.M., and Trump, B.F., 1976. histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 100, 405-414.
- Merchant-Larios H., Ruiz Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N., and Marmolejo-Valencia, A., 1997. Corellation among thermosensitive period, estradiol response and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* 107, 373-385.
- Mittwoch, U., 2000. Genetics of sex determination: Exceptions that prove the rule. *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 405-410.
- Mylonas, C.C., and Zohar, Y., 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 202, 205-220.
- Mylonas, C.C., Anezaki, L., Divanach, P., Zanuy, S., Piferrer, F., Ron, B., Peduel, A., Ben Atia, I., Gorshkov, S., and Tandler, A., 2003. Influence of temperature and genetics on sex differentiation and growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, May 18-23, Japan.

- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*. 38, 217-229.
- Nagahama, Y., 1999. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: Norberg B., Kjesbu O.S., Taranger G.L., Andersson E. and Stefansson S.O. (Eds.), *Proceedings of the 6th international Symposium on the Reproductive Physiology of fish*, Bergen, Norway, pp. 211-222.
- Nagahama, Y., Kagawa, H., and Young, G., 1982. Cellular sources of sex steroids in teleost gonads. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 56-63.
- Nakamura, M., 2003. Role of estrogens in sex differentiation and sex change in fish. In: *Proceedings of the 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. May 18-23, Mie, Japan.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T., Nagahama, Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology* 281, 362-372.
- Nash, J. P., Davail-Cuisset, B., Bhattacharyya, S., Suter, H. C., Le Menn, F., and Kime, D. E., 2000. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for testosterone, estradiol, and 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3 one using acetylcholinesterase as tracer: application to measurement of diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
- Norman, A.W., and Litwack, G., 1982. *Hormones*. Academic Press, San Diego, California, 806 pp.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Mitsuhashi, E., Yoshitomi, K., Adachi, S., and Yamauchi, K., 2001. Histological observations of gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fisheries Science* 67, 1104-1110.
- Pandian, T. J., and Koteeswaran, R., 1999. Lability of sex differentiation in fish. *Current Science* 76, 580-583.
- Pandian, T. J., and Sheela, S. G., 1995. Hormonal induction of sex inversal in fish. *Aquaculture* 138, 1-22.
- Pati•o, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, S., Strüssmann, C.A., Parker, N.C., Simko, B.A., and Goudie, C.A., 1996. Sex differentiation of channel catfish gonads. *The Journal of Experimental Zoology*, 276-288.

- Pavlidis, M., Koumoundouros, G., Sterioli, A., Somarakis, S., Divanach, P., and Kentouri, M., 2000. Evidence of temperature dependant sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Zoology* 287, 225-232.
- Picket, G.D., and Pawson, M.G., 1994. Sea bass. Biology, exploitation and conservation, In: Chapman and Hall (Eds), Fish and Fisheries Series, London, 263 pp.
- Pieau, C., Dorizzi, M., and Richard - Mercier, N., 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 887-900.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197, 229-281.
- Prat, F., Zanuy, S., Bromage, N., and Carillo, M., 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. *Journal of Fish Biology* 54, 125-137.
- Prat, F., Zanuy, S., Carillo, M., De Mones, A., and Fostier, A., 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General and Comparative Endocrinology* 78, 361-373.
- Redding, J.M., and Patiño, R., 1993. Reproductive physiology. In: Evans, D.H. (Ed.), *The Physiology of Fishes*, CRC Press Inc., Boca raton, Florida, pp.503-534.
- Roblin, C., and Bruslé, J., 1983. Ontogenese gonadique et differentiation sexuelle du loup (*Dicentrarchus labrax*), en condition d' élevage. *Reproduction Nutrition and Development* 23 (1), 115–127.
- Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., and Carillo, M., 2000a. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 141-150.
- Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Shaw, M., and Carillo, M., 2001. Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European

- male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture* 202, 235-248.
- Rodríguez, L., Carillo, M., Sorbera, L.A., Soubrier, M. A., Manóvilas, E., Holland, M.C.H., Zohar, Y., and Zanuy, S., 2000b. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *General and Comparative Endocrinology* 120, 67–74.
- Rodríguez, L., Halm, S., Mylonas, C., and Zanuy, S., 2003. Gene expression of estrogen receptors α and β during early sex differentiation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: *Proceedings of the 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. May 18-23, Mie, Japan.
- Rothbard, S., Moav, B., and Yaron, Z., 1987. Changes in steroid concentrations during sexual ontogenesis in tilapia. *Aquaculture* 83, 153-166.
- Rowell, C.B., Watts, S.A., Wibbels, T., Hines, G.A. and Mair, G., 2002. Androgen and estrogen metabolism during sex differentiation in mono - sex populations of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *General and Comparative Endocrinology* 125, 151-162.
- Saillant, E., Chatain, B., Menu, B., Fauvel, C., Vidal, M. O., and Fostier, A., 2003a. Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Zoology* 260, 53-63.
- Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B., Laureau, S., Thimonier, J. and Chatain, B., 2002. Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Journal of Experimental Zoology* 292, 494-505.
- Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B., and Chatain, B., 2003b. Saline preferendum for the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae and juveniles: effect of salinity on early development and sex determination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 287, 103-117.
- Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B., Laureau, S., Thimonier, J. and Chatain, B., 2003c. Effects of rearing density, size grading and parental factors on sex ratios of

- the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in intensive aquaculture. *Aquaculture* 221, 183–206.
- Saillant, E., Fostier, A., Menu, B., and Chatain, B., 2001. Sexual growth dimorphism in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 202, 371-387.
- Schulz, R., and Miura, T., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 43-56.
- Scott, A.P., and Vermeirssen, E.L.M., (1994). Production of conjugated steroids by teleost gonads and their role as pheromones. In *Perspectives in Comparative Endocrinology* p. 645-654.
- Scott, A. P., Canario, A.V.M., and Prat, F., 1990. Radioimmunoassay of ovarian steroids in plasmas of ovulating female sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* 78, 299-302.
- Sola, L., Bresanello, S., Rossi, A.R., Iaselli, V., Crosetti, D., and Cataudella, S., 1993. A karyotype analysis of the genus *Dicentrarchus* by different staining techniques. *Journal of Fish Biology* 43, 329-337.
- Strüssman, C.A., and Nakamura, M., 2002. Morphology, endocrinology and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 13-29.
- Strüssman, C.A. ,Patino, R., 1999. Sex determination, environmental. In: Knobil, E. Neill, J.D., (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, New York, pp. 402-409.
- Strüssmann, C.A., Moriyama, S., Hanke, E.F., Calsina Cota, J.C., and Takashima, F., 1996. Evidence of thermolabile sex determination in the pejerrey. *Journal of Fish Biology* 48: 643-651.
- Swain, A., 2002. Vertebrate sex determination: A new player in the field. *Current Biology* 12, 602-603.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (Eds), *Fish Physiology*, Academic Press Inc, Orlando, Florida, pp. 405-434.

- Zanuy, S., Carillo, 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.
- Zanuy, S., Carillo, M., Mateos, J., Trudeau, V. and Kah, O., 1999. Effects of sustained administration of testosterone to pre – pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 177, 21–35.
- Van den Hurk, R., Richter, C.J.J., and Janssen - Dommerholt, J., 1989. Effects of 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione on gonad differentiation in the African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 83, 179-191.
- Volff, J., Kondo, M., and Scharl, M., 2003. Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends in Genetics* 19, 196-199.
- Voller, A., Bidwell, D.E., and Bartlett, A., 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech, Europe.
- Yamamoto, T.O., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, vol.III. Academic Press, New York.
- Yamamoto, E., 1999. Studies on sex manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schegel). *Aquaculture* 173, 235-246.
- Yeoh, C.G., Schreck, C.B., Feist, G.W. and Fitzpatrick, M.S., 1996a. Endogenous steroid metabolism is indicated by fluctuations of endogenous steroid and steroid glucuronide levels in early development of the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 103, 107–114.
- Yeoh, C.G., Schreck, C.B., Fitzpatrick, M.S. and Feist, G.W., 1996b. In vivo steroid metabolism in embryonic and newly hatched steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 102, 197–209.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T, Ihara, S., and Takeuchi, T., 2003. Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 3-12.

Μπέης, Ι. Δ., 1992. Μαθήματα Φυσιολογίας Ζώων Ι. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ

I. Παρασκευή μονιμοποιητικού διαλύματος

Η παρασκευή του μονιμοποιητικού διαλύματος φορμαλδεΰδης: γλουταραλδεΰδης (4:1) στο οποίο διατηρούνταν τα δείγματα των ιχθυδίων και των γονάδων (διάλυμα 2 l) γινόταν ως εξής:

23.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

5.4 g NaOH

220 ml φορμαλδεΰδη 36.5%

80 ml γλουταραλδεΰδη 50%

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι ο όγκος να γίνει 2 λίτρα.

Το pH του διαλύματος είναι 7.2.

II. Αφυδάτωση δειγμάτων

Στη συνέχεια τα δείγματα αφυδατώνονταν, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Απεσταγμένο νερό (45 min).
2. 70 % αιθανόλη (1 h 15 min).
3. 80 % αιθανόλη (1 h 15 min).
4. 96 % αιθανόλη (1 h 15 min).

5. 96 % αιθανόλη–ρητίνη (1: 1) (1h).
6. Ρητίνη overnight.

Χρησιμοποιήθηκε υδροξυεθυλμεθακρυλική πολυμεριζόμενη ρητίνη Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Γερμανία).

III. Πολυμερισμός ρητίνης

Τα δείγματα των σωμάτων των ιχθυδίων κόπηκαν σε τμήματα κάθετα ως προς τον οριζόντιο άξονα των ψαριών και τοποθετήθηκαν στις ειδικές θήκες με κάθετο προσανατολισμό. Σε κάθε θήκη τοποθετούνταν τουλάχιστον δύο περιοχές του ιστού (μία πρόσθια και μια οπίσθια για τα μικρού μεγέθους ιχθύδια, και μια πρόσθια, μια ενδιάμεση και μια οπίσθια για τα μεγαλύτερα ιχθύδια), έτσι ώστε να είναι δυνατή μια πιο ολοκληρωμένη παρατήρηση της γονάδας κατά μήκος της. Στις θήκες τοποθετήθηκε επίσης ρητίνη σε συνδυασμό με το σκληρυντικό που παρέχεται από το πρωτόκολλο, ώστε να πολυμεριστεί και να σκληρύνει. Τα δείγματα αφέθηκαν για 24 ώρες στις θήκες. Στη συνέχεια, πάνω από τα δείγματα της πολυμερισμένης πλέον ρητίνης τοποθετήθηκαν ειδικά πλαστικά, τα οποία είχαν ως χρήση την αποκόλληση των δειγμάτων από τις θήκες της ιστολογίας και τη στερέωσή τους στη μικροτόμο. Η προσθήκη των πλαστικών αυτών έγινε με τη χρήση ειδικής κόλλας (Technovit 3040, Heraeus Kulzer, Γερμανία). Οι τομές των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μικροτόμο Biocut 2035 (Reichert Jung, Γερμανία) και το πάχος τους ήταν 3–5 μm .

IV. Χρώση δειγμάτων

Η χρώση των τομών έγινε με τις χρωστικές Polychrome I και Polychrome II (Bennett et al., 1976) και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν:

- Χρώση στο Polychrome I για 120 sec.
- Ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με απεσταγμένο νερό για 15 λεπτά με συχνές αλλαγές του νερού.
- Χρώση των αντικειμενοφόρων με Polychrome II για 60 sec.
- Εκ νέου ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων για 15 λεπτά με απεσταγμένο νερό και συχνές αλλαγές του.
- Στέγνωμα των αντικειμενοφόρων.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων των χρωστικών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

Polychrome I

0.325 g Methylene blue

0.05 g Azure II

25 ml Glycerol

25 ml methanol

200 ml ddW.

Polychrome II

0,5 g Basic Fuchsin

250 ml ddW.

Μετά την παρασκευή των διαλυμάτων των χρωστικών, αυτά φιλτραρίστηκαν και το διάλυμα Polychrome II αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1: 3.5 πριν από τη χρήση του.

Οι παρατηρήσεις των τομών πραγματοποιήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Olympus CH-2, (Αμβούργο, Γερμανία).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

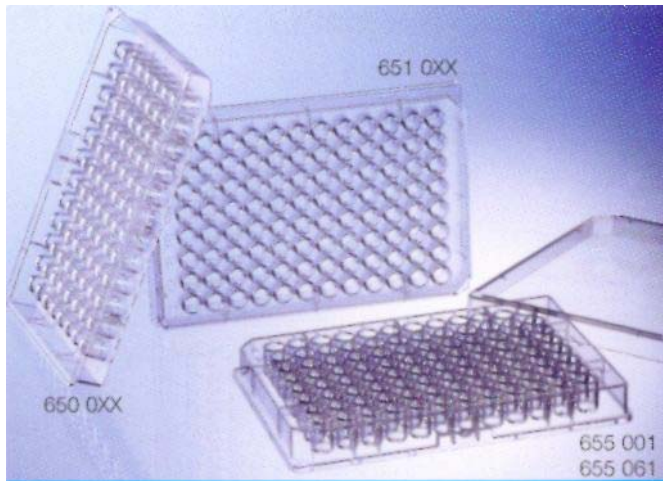
1. Εισαγωγή στην ενζυμική ανοσοανάλυση

Οι αναλύσεις ELISA έχουν γίνει μια από τις πιο δημοφιλείς βιοϊατρικές μεθόδους για την ποσοτικοποίηση ουσιών σε δείγματα γιατί, εκτός από την ευαισθησία και την εξειδίκευση που παρέχουν, είναι απλούστερες και φθηνότερες από τις περισσότερες άλλες αναλύσεις. Βασίζονται σε ανοσολογικές αντιδράσεις κατά τις οποίες αντισώματα ή αντιγόνα μαρκάρονται με διάφορους δείκτες (Voller et al., 1979). Οι μέθοδοι ELISA είναι βασικά εργαλεία στη φαρμακευτική βιομηχανία με εφαρμογές στην ανακάλυψη φαρμάκων, τις μελέτες ζώων και τις κλινικές εξετάσεις (Voller et al., 1979).

Ο ορισμός της ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) είναι: «μια ευαίσθητη τεχνική για τον ακριβή καθορισμό του ποσού της πρωτεΐνης ή άλλου αντιγόνου σε δεδομένο δείγμα με τη χρησιμοποίηση μιας αλλαγής χρώματος που καταλύεται από ένζυμο. Ένα αντίσωμα εξειδικευμένο ως προς την πρωτεΐνη αυτή απορροφάται σε ένα σταθερό υπόστρωμα και ένα γνωστό ποσό δείγματος προστίθεται, έτσι ώστε όλα τα μόρια της ζητούμενης πρωτεΐνης του δείγματος να συνδέονται με το αντίσωμα. Ένα δεύτερο αντίσωμα ειδικό ως προς ένα δεύτερο σημείο της πρωτεΐνης προστίθεται και δημιουργεί σύμπλοκο με ένα ένζυμο, το οποίο καταλύει την αλλαγή χρώματος στο τέταρτο αντιδραστήριο που προστίθεται τελικά. Η μεταβολή χρώματος μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση φωτομέτρου και να συγκριθεί με μια πρότυπη καμπύλη για να δώσει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα» (Martin, 2000).

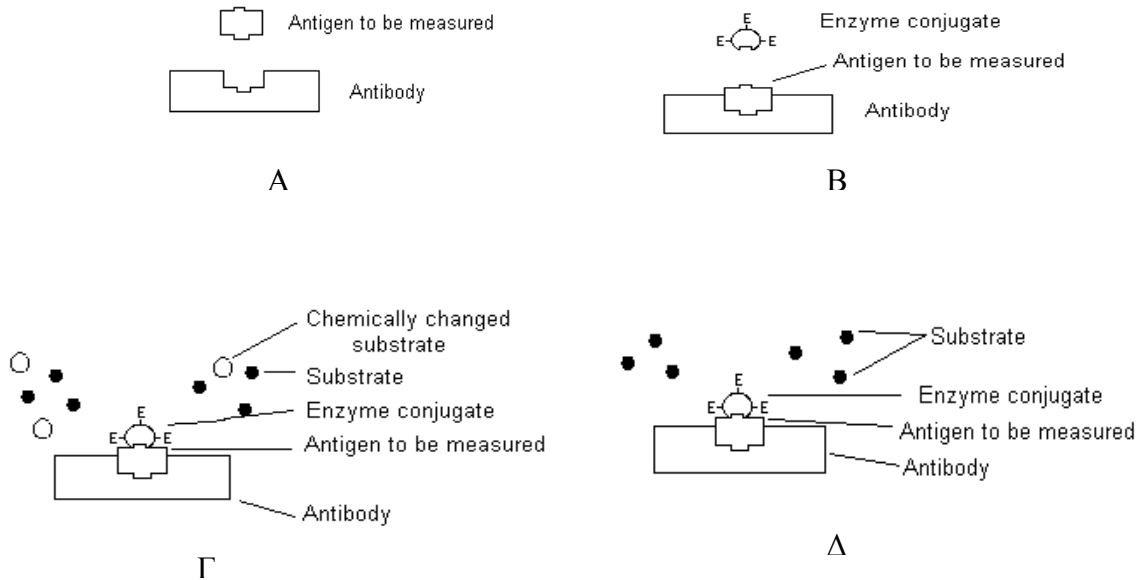
Οι μέθοδοι ELISA συνήθως πραγματοποιούνται σε microtiter plates 96 θέσεων με 8 σειρές και 12 στήλες (Εικόνα 18). Κάθε θέση των microtiter plates χρησιμοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να προκαλείται μια αντίδραση σ' αυτήν. Για τις περισσότερες μεθόδους ELISA η τυπική αντίδραση είναι η αλλαγή χρώματος του διαλύματος της θήκης, η οποία μετριέται με σπεκτροφωτόμετρο. Καθώς το χρώμα του διαλύματος στη θήκη αλλάζει από ένα διαυγές υγρό (καθόλου αντίδραση) σε σκούρο χρώμα η αντίστοιχη

οπτική πυκνότητα αυξάνεται. Αυτή η οπτική πυκνότητα είναι που χρησιμοποιείται και για περαιτέρω αναλύσεις (Voller et al., 1979).



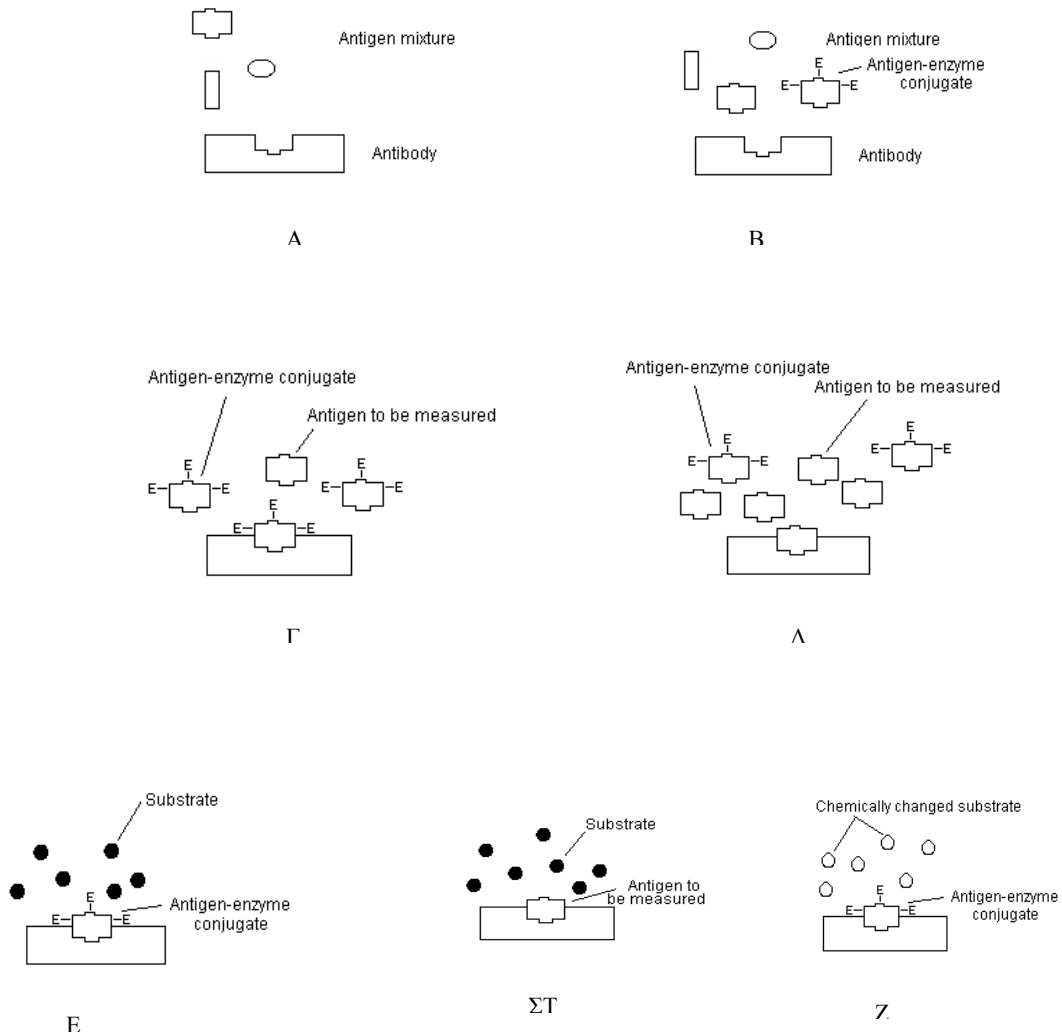
Εικόνα 18. Μορφή microtiter plate, όπως χρησιμοποιείται για την τεχνική ELISA.

Για τη μέτρηση αντιγόνων, η ELISA έχει κυρίως δύο διαθέσιμες τεχνικές. Την τεχνική sandwich και την ανταγωνιστική τεχνική (competitive). Η τεχνική sandwich ή διπλού αντισώματος ξεκινάει με το ακινητοποιημένο αντίσωμα και το αντιγόνο προς μέτρηση (Εικόνα 19Α). Ένα ενζυμικό σύμπλοκο προστίθεται στη συνέχεια στη θέση με το σύμπλοκο αντιγόνο-αντίσωμα και ενώνεται μαζί τους (Εικόνα 19Β). Κατάλληλο υπόστρωμα προστίθεται στο ενζυμικό σύμπλοκο, που συνδέεται με τη σειρά του με το ανοσολογικό σύμπλοκο (Εικόνα 19Γ). Αν υπάρχουν αλλαγές στο ενζυμικό σύμπλοκο θα προκύψει θετικό τεστ ή αλλαγή χρώματος (Εικόνα 19Δ).



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής sandwich ELISA(<http://www.pharm.uky.edu/HomeTest/Elisa/elisa.html>).

Η ανταγωνιστική ELISA ξεκινάει με ένα αντίσωμα, στο οποίο προστίθεται το δείγμα που περιέχει μίγμα αντιγόνου (Εικόνα 20Α) και στη συνέχεια προστίθεται ένα σύμπλοκο αντιγόνου–ενζύμου (Εικόνα 20Β). Σε αυτό το σημείο παρατηρείται ανταγωνιστική αναστολή ανάμεσα στο σύμπλοκο αντιγόνου–ενζύμου και στο μη μαρκαρισμένο αντιγόνο, ανάλογα με τον τύπο του αντιγόνου που βρίσκεται σε περίσσεια (Εικόνα 20Γ, Δ). Μετά τη δημιουργία ανοσολογικού συμπλόκου αντιγόνου–αντισώματος τα αντιδραστήρια απομακρύνονται με πλύση και στη συνέχεια προστίθεται υπόστρωμα στο ανοσολογικό σύμπλοκο (Εικόνα 20Ε). Αν το σύμπλοκο αντιγόνου–ενζύμου βρίσκεται σε περίσσεια (Εικόνα 20Ζ), θα πραγματοποιηθεί μια αλλαγή χρώματος που θα υποδεικνύει ότι το υπόστρωμα μεταβλήθηκε χημικά ως αποτέλεσμα της σύνδεσης του ενζυμικού συμπλόκου με το ανοσολογικό σύμπλοκο. Αν στο σύμπλοκο αντιγόνου–αντισώματος αυτό που είναι σε περίσσεια είναι το μη μαρκαρισμένο αντιγόνο (Εικόνα 20ΣΤ) θα υπάρχει μικρή έως καθόλου διαφορά στο χρώμα καθώς το δείγμα δεν περιέχει αντιγόνο εξειδικευμένο για το συγκεκριμένο αντίσωμα .



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση της ανταγωνιστικής ELISA (<http://www.pharm.uky.edu/HomeTest/Elisa/elisa.html>).

Σημαντικό πλεονέκτημα της ELISA είναι η ικανότητά της να μειώνει τα λάθη που προκαλούνται από την πολλαπλή χρήση πιπέτας, με τη χρησιμοποίηση των πολυκάναλων πιπετών (Nash et al, 2000). Σε σχέση με τη radio immunoassay που χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα στο παρελθόν για την ποσοτικοποίηση των στεροειδών του πλάσματος, τα πλεονεκτήματά της είναι ότι δεν απαιτεί τη χρήση ραδιενεργών υλικών, είναι φτηνότερη και πιο γρήγορη και τα μαρκαρισμένα με ένζυμο στεροειδή που χρησιμοποιεί είναι πιο

εύκολο να παραχθούν από ότι τα αντίστοιχα στεροειδή της radio immunoassay, τα μαρκαρισμένα με ραδιενεργά στοιχεία (Nash et al., 2000).

Η αρχή της τεχνικής ELISA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη βασίζεται στον ανταγωνισμό ανάμεσα στην ελεύθερη ορμόνη του δείγματός μας (αντιγόνο) και την ορμόνη τη συνδεδεμένη με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (σύμπλοκο αντιγόνου–ένζυμου) για το αντίσωμα (ανταγωνιστική ELISA) (Cuisset et al., 1994). Αυτό το αντίσωμα βρίσκεται ενωμένο με μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού στη βάση των θηκών του micro titer plate. Τα αποτελέσματα της τεχνικής αυτής καθορίζονται με την προσθήκη του αντιδραστηρίου Ellman, το οποίο όταν έρχεται σε επαφή με την ακετυλοχολινεστεράση αποκτά κίτρινο χρώμα. Ανάλογα με την πυκνότητα του χρώματος γνωρίζουμε την ποσότητα του συμπλόκου αντιγόνου–ένζυμου που ενώθηκε με το αντίσωμα κατά την επώαση της πλάκας. Η ποσότητα της ελεύθερης μας ορμόνης είναι αντιστρόφως ανάλογη της πυκνότητας του χρώματος που καθορίζεται με τη φωτομετρία.

II. Πρωτόκολλο ενζυμικής ανοσοανάλυσης

II.1 Εκχύλιση στεροειδών ορμονών

A. Εκχύλιση στεροειδών ορμονών πλάσματος.

Η εκχύλιση των στεροειδών ορμονών από το πλάσμα των ψαριών πραγματοποιήθηκε σε διεθλαιθέρα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το παρακάτω:

- Προσθήκη 2 ml διεθλαιθέρα στο δοκιμαστικό σωλήνα με τα 200 μl πλάσματος από κάθε δείγμα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εκχύλιση.
- Ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων για 3 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4° Κελσίου στις 3000 r.p.m. για 3 λεπτά.
- Πάγωμα των δειγμάτων για 10 λεπτά στους -80° Κελσίου.
- Μεταφορά του υπερκειμένου (που παρέμεινε σε υγρή φάση) σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες και εκ νέου εκχύλιση του δείγματος σε 2 ml διεθλαιθέρα.
- Εξάτμιση του υπερκειμένου διεθλαιθέρα υπό ατμό αζώτου.
- Η ανασύσταση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε 250 μl Reaction Buffer.

B. Εκχύλιση στεροειδών ορμονών γονάδων.

Το πρωτόκολλο ομογενοποίησης και εκχύλισης των στεροειδών ορμονών των γονάδων είναι το παρακάτω.

B1. Ομογενοποίηση γονάδων.

- Ζύγισμα των γονάδων (με ακρίβεια 0.001g).
- Μεταφορά τους σε δοκιμαστικό σωλήνα με 1 ml NaOH 0.5 N.
- Ομογενοποίηση στις 8000 r/min.
- Sonication για 30 sec, amplitude 30 %, κύκλος 100 %.

B2. Εκχύλιση στεροειδών ορμονών γονάδων.

- Προσθήκη 8 ml διεθλαιθέρα στο 1 ml του δείγματος.
- Πάγωμα των δειγμάτων για 10 λεπτά στους - 80° C.

- Μεταφορά του υπερκειμένου που παρέμεινε σε υγρή φάση σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες και πραγματοποίηση δεύτερης εκχύλισης με 8 ml διεθλαιθέρα.
- Εξάτμιση του υπερκειμένου διεθλαιθέρα υπό ατμό αζώτου.
- Ανασύσταση των δειγμάτων σε 500 µl Reaction buffer.
- Ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων και δημιουργία aliquots των 250 µl.

II.II Coating των microtiter plates.

Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα (2500 determinations, 5 mg, Cat 400003 Lot 584176 Cayman Chemical Company). Έγινε ανασύστασή του σε 5 ml PPB (Potassium Phosphate Buffer) 0.05 M, διάλυση 1mg/ml.

- Προσθήκη 2 ml μονοκλωνικού αντισώματος 1 mg/ml σε 198 ml PPB 0.05 M (συγκέντρωση 10 µg/ml).
- Προσθήκη σε 10 πλάκες (200 µl/ θήκη) του αντισώματος.
- Επώαση των πλακών ELISA στους 20° Κελσίου overnight χωρίς ανάδευση.
- Αφαίρεση του αντισώματος από τις πλάκες και προσθήκη 300 µl R.B. σε κάθε θήκη. Προσθήκη του αντισώματος των πλακών σε 10 νέες πλάκες.
- Αποθήκευση των πλακών με το RB στους 4° Κελσίου και αυτών με το αντίσωμα στους 20° Κελσίου overnight.
- Προσθήκη saturation buffer στις 10 πλάκες με το αντίσωμα και αποθήκευση τους στους 4° Κελσίου.

II.III Προετοιμασία assay

A. Τεστοστερόνη και 11-κετοτεστοστερόνη

1. Ξέπλυμα της πλάκας τρεις φορές με washing buffer.
2. Προσθήκη 100 µl RB στις θέσεις NSB.
3. Προσθήκη 50 µl RB στις θέσεις Bo.
4. Προσθήκη 50 µl St στις καθορισμένες θέσεις.
5. Προσθήκη 50 µl QC στις καθορισμένες θέσεις.

6. Προσθήκη 50 μl δειγμάτων στις καθορισμένες θέσεις.
7. Προσθήκη 50 μl tracer σε όλες τις θέσεις εκτός από N και AT.
8. Προσθήκη 50 μl Ab σε όλες τις θέσεις εκτός από N, AT και NSB.
9. Επώαση της πλάκας στους 20° C σε ανάδευση (140 r.p.m.) για 1 ώρα.
10. Μετά την επώαση, η πλάκα ξεπλένεται τρεις φορές με washing buffer.
11. Προσθήκη 5 μl Tr στις θέσεις AT.
12. Προσθήκη 200 μl Ellman σε όλες τις θήκες.
13. Επώαση της πλάκας για 4 ώρες σε ελαφριά ανάδευση (140 r.p.m.) στους 20° C στον επωαστήρα.
14. Η ανάγνωση της πλάκας πραγματοποιήθηκε σε ELISA reader (Anthos Labtec Instruments htII) στα 405 nm.

B. Οιστραδιόλη

1. Ξέπλυμα της πλάκας τρεις φορές με washing buffer.
2. Προσθήκη 100 μl RB στις θέσεις NSB.
3. Προσθήκη 50 μl RB στις θέσεις Bo.
4. Προσθήκη 50 μl St στις καθορισμένες θέσεις.
5. Προσθήκη 50 μl QC στις καθορισμένες θέσεις.
6. Προσθήκη 50 μl δειγμάτων στις καθορισμένες θέσεις.
7. Προσθήκη 50 μl tracer σε όλες τις θέσεις εκτός από N και AT.
8. Προσθήκη 50 μl Ab σε όλες τις θέσεις εκτός από N, AT και NSB.
9. Επώαση της πλάκας στους 37° C σε ανάδευση (140 r.p.m.) overnight
10. Μετά την επώαση, η πλάκα ξεπλένεται τρεις φορές με washing buffer.
11. Προσθήκη 5 μl Tr στις θέσεις AT.
12. Προσθήκη 200 μl Ellman σε όλες τις θήκες.
13. Επώαση της πλάκας για 1 ώρα σε ελαφριά ανάδευση (140 r.p.m.) στους 20° C στον επωαστήρα.
14. Η ανάγνωση της πλάκας πραγματοποιήθηκε στα 405 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	Bo	Std 1	Std 5	Std 9	P	P	P	P	P	P	P
B	B	Bo	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
C	B	Bo	Std 2	Std 6	Std 10	P	P	P	P	P	P	P
D	NSB	Bo	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
E	NSB	QC	Std 3	Std 7	Std 11	P	P	P	P	P	P	P
F	NSB	QC	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
G	AT	QC	Std 4	Std 8	Std 12	P	P	P	P	P	P	P
H	AT	QC	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

Std (standards): 50 µl Tr + 50 µl Ab + 50 µl Std/ 200 µl Ellman

Bo (maximum binding): 50 µl tracer + 50 µl Ab + 50 µl RB/ 200 µl Ellman

NSB (non-specific binding): 50 µl tracer +100 µl RB / 200 µl Ellman

B (Blank): τίποτα / 200 µl αντιδραστήριο Ellman.

P (δείγμα): 50 µl tracer +50 µl Ab + 50 µl P/ 200 µl Ellman.

AT (total activity): τίποτα / 5 µl tracer + 200 µl Ellman

QC: quality control: δείγμα πλάσματος με γνωστή ποσότητα τεστοστερόνης κοινό σε όλες τις πλάκες.

II.V Χρησιμοποιούμενα υλικά

POTASSIUM PHOSPHATE BUFFER

43.5 g K_2HPO_4 + 250 ml ddW = A

34 g KH_2PO_4 + 250 ml ddW = B

Προσαρμόζουμε το pH του διαλύματος A στο 7.4 με το διάλυμα B.

REACTION BUFFER (RB) (EIA BUFFER)

100 ml potassium phosphate buffer 1M

0.1 g NaN_3

23.4 g NaCl

0.37 g EDTA

1g BSA (Bovine serum albumin)

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι ο όγκος του διαλύματος να γίνει 1 l.

SATURATION BUFFER

100 M ml potassium phosphate buffer 1 M

0.3 g NaN_3

23.4 g NaCl

0.37 g EDTA

3 g BSA (Bovine Serum Albumin)

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι ο όγκος του διαλύματος να γίνει 1 l.

WASHING BUFFER

10 ml potassium phosphate buffer 1M

0.5 ml Tween 20.

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι ο όγκος του διαλύματος να γίνει 1 l.

ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ELLMAN

20 ml potassium phosphate buffer 0.5 M.

215 mg DTNB (5'5' dithio – bis – nitrobenzoic acid)

200 mg ακετυλοχολίνη

Δημιουργία aliquots σε erppendorf των 440 μl και διατήρησή τους σε προστασία από το φως στους -20°C .

Για κάθε πλάκα πραγματοποιούταν διάλυση για καθένα από τα aliquots σε 19.6 ml απεσταγμένο νερό πριν από τη χρήση του. Γινόταν προσθήκη 200 μl ανά θέση.

Το tracer που χρησιμοποιήθηκε για την τεστοστερόνη είχε συγκέντρωση 0,5 UE/ml, ενώ το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1/2000000.

II.VI Πρότυπες καμπύλες**A. Τεστοστερόνη**

Στο Std1 η συγκέντρωση τεστοστερόνης που χρησιμοποιείται είναι 5 ng/ml.

- Προετοιμάζονταν 9 σωλήνες με 150 μl RB και πραγματοποιούνταν διαδοχικές αραιώσεις από το πρώτο σημείο της καμπύλης (5 ng/ml), προσθέτοντας 150 μl του προηγούμενου Std και τελικά αποκτώντας τις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

Std 1: 5.000 (ng/ml)

Std 2: 2.5 (ng/ml)

Std 3: 1.25 (ng/ml)

Std 4: 0.625 (ng/ml)

Std 5: 0.3125 (ng/ml)

Std 6: 0.1562 (ng/ml)

Std 7: 0.0781 (ng/ml)

Std 8: 0.0391 (ng/ml)

Std 9: 0.0195 (ng/ml)

Std 10: 0.0097 (ng/ml).

B. Οιστραδιόλη

Στο Std1 η συγκέντρωση οιστραδιόλης που χρησιμοποιείται είναι 80 ng/ml.

- Προετοιμάζονταν 9 σωλήνες με 150 μl RB και πραγματοποιούνταν διαδοχικές αραιώσεις από το πρώτο σημείο της καμπύλης (80 ng/ml), προσθέτοντας 150 μl του προηγούμενου Std και τελικά αποκτώντας τις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

Std 1: 80 (ng/ml)

Std 2: 40 (ng/ml)

Std 3: 20 (ng/ml)

Std 4: 10 (ng/ml)

Std 5: 5 (ng/ml)

Std 6: 2.5 (ng/ml)

Std 7: 1.25 (ng/ml)

Std 8: 0.625 (ng/ml)

Std 9: 0.3125 (ng/ml)

Std 10: 0.1563 (ng/ml).

Γ. 11 - κετοτεστοστερόνη

Στο Std1 η συγκέντρωση 11 - κετοτεστοστερόνης που χρησιμοποιείται είναι 1 ng/ml.

- Προετοιμάζονταν 9 σωλήνες με 150 μl RB και πραγματοποιούνταν διαδοχικές αραιώσεις από το πρώτο σημείο της καμπύλης (1 ng/ml), προσθέτοντας 150 μl του προηγούμενου Std και τελικά αποκτώντας τις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

Std 1: 1 (ng/ml)

Std 2: 0.5 (ng/ml)

Std 3: 0.25 (ng/ml)

Std 4: 0.125 (ng/ml)

Std 5: 0.0625 (ng/ml)

Std 6: 0.03125 (ng/ml)

Std 7: 0.0156 (ng/ml)

Std 8: 0.0078 (ng/ml)

Std 9: 0.0039 (ng/ml)

Std 10: 0.002 (ng/ml).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΡΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

1. Maria Papadaki, Constantinos C. Mylonas, Eric Maingot, Pascal Divanach, Sylvia Zanuy and Francesc Piferrer (0000). Production of male- and female-dominant populations using size grading, and correlation of sex differentiation with plasma and gonad levels of sex steroid hormones in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.)

Aquaculture (in preparation)

2. Sylvia Zanuy, Maria Papadaki and Constantinos C. Mylonas. Histological description of gonadal differentiation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Fish Biology**

(in preparation)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Όνομα: Μαρία Παπαδάκη

Ημερομηνία γέννησης: 24 Αυγούστου, 1977.

Εθνικότητα: Ελληνική

Διεύθυνση επικοινωνίας: Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας

Ταχ. Θυρίδα: 2214

Ηράκλειο 71003

Κρήτη

Ελλάδα

E-mail: mrapad@edu.biology.uoc.gr, mrapadak@imbc.gr

Εκπαίδευση

1995–2000. Πτυχίο Βιολογίας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο

Θεσσαλονίκης (7.7).

2000–σήμερα. Μεταπτυχιακές σπουδές στο Πανεπιστήμιο

Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, "Διαχείριση Θαλάσσιων

και Χερσαίων Βιολογικών Πόρων" (σειρά εισαγωγής:

1).

Άλλα

Υποτροφία Erasmus/ Socrates για τρίμηνη απασχόληση στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων του Πανεπιστημίου της Χώρας των Βάσκων, Μπιλμπάο, Ισπανία.

Συνέδρια

Αποστολή poster στο "11th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry of Europe", 6-10 May 2001, Μαδρίτη, Ισπανία.

Αποστολή poster στο 7^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας, 6-9 Μαΐου 2003, Χερσόνησος Κρήτης.

Σεμινάρια

"Advances in Fish Reproduction and Their Application to Broodstock Management", 3-7 Φεβρουαρίου, Σαραγόσα, Ισπανία.

Δημοσιεύσεις

Mylonas, C.C., Papadaki, M., Pavlidis, M., and Divanach, P., 2003. Evaluation of egg production and quality in the red porgy (*Pagrus Pagrus*) during two consecutive spawning seasons. *Aquaculture* (in press).

Mylonas, C.C., Papadaki, M., and Divanach, P., 2003. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus Pagrus* (L.). *Aquaculture Research* (in press).

Υποτροφίες

Υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για την εισαγωγή μου ως πρώτη στο Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 1995-1996.

Γλώσσες

Ελληνικά (μητρική)

Αγγλικά (πολύ καλά, Cambridge Certificate of Proficiency in English, 1992)

Γερμανικά (πολύ καλά, Mittelstufe)

Ισπανικά (αρκετά καλά, πιστοποιητικό από το Πανεπιστήμιο της Χώρας των Βάσκων, 2000)

