



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Υδατοκαλλιέργειες» -
«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»

ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**“Αντιστροφή φύλου του διακοσμητικού ψαριού μονομάχος
(*Betta splendens*, Regan 1910)”**

Κωνσταντίνος Χ. Κηπουρός

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ι. Πάσχος, Επιβλέπων Καθηγητής
Βιολόγος, Δρ. Α.Π.Θ.
2. Ι. Κλαδάς, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Βιολόγος, Δρ. Πανεπιστημίου Paris IV
3. Κ. Περδικάρης, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Ιχθυολόγος, Δρ. Πανεπιστημίου Αιγαίου

ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣΑ 2010



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”

***IN COLLABORATION WITH
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE
OF EPIRUS***

Thesis:

**“Sex reversal in Siamese fighting fish
(*Betta splendens*, Regan 1910)”**

Konstantinos C. Kipouros

ADVISOR COMMITTEE

1. I. Paschos, Supervisor
Biologist, PhD University Aristotle University of Thessaloniki
2. I. Kladas, Member of Advisor committee
Biologist, PhD University of Paris IV
3. K. Perdikaris, Member of Advisor committee
Ichthyologist, PhD University of the Aegean

IGOUMENITSA 2010

Αφιερωμένη στο Χρηστάκο
που “έφυγε” πρόωρα...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Υδατοκαλλιέργειες - Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών” του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε σύμπραξη με το Τ.Ε.Ι. Ηπείρου. Υλοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών Εσωτερικών Υδάτων του Τμήματος Ιχθυοκομίας - Αλιείας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιωάννη Πάσχου.

Στις σελίδες της παρούσας διπλωματικής περιλαμβάνονται όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που καθιστούν το διακοσμητικό ψάρι μονομάχος (*Betta splendens* Regan, 1910) ένα από τα πιο δημοφιλή παγκοσμίως, περιλαμβάνει την τεχνητή αναπαραγωγή και την παραγωγή ολοαρσενικών απογόνων με χορήγηση 17 α -methyltestosterone. Η ορμόνη δεν είχε επίδραση στην επιβίωση των ψαριών, ενώ στις συγκεντρώσεις 3 & 4mg kg⁻¹ στην τροφή επιτεύχθηκε υψηλότερη επιβίωση και 100% αντιστροφή φύλου.

Η εν λόγω εργασία έδειξε ότι με τη χρήση μικρής ποσότητας ορμόνης μπορεί να επιτευχθεί η αντιστροφή φύλου σε μονομάχους με αποτέλεσμα την κεφαλαιοποίηση (οικον.) του πλεονεκτήματος που έχουν τα αρσενικά άτομα έναντι των θηλυκών, τόσο σε θέματα ζήτησης αλλά και αναλογίας τιμής στο εμπόριο διακοσμητικών ειδών.

ABSTRACT

The current thesis was submitted to the University of Veterinary Science of Thessaly, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in the Departmental program "Aquaculture - Aquatic Animal Health". It took place in the laboratory of Inland waters & Freshwater Aquaculture of the Technological Educational Institute of Epirus, under the supervision of Professor Ioannis Paschos.

This thesis presents the specific characteristics of the ornamental Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910) which have made it popular among aquarium enthusiasts while the main of the study, involves the artificial reproduction of the species and the attempt of production male offspring using 17alpha-methyltestosterone. The hormone didn't effected the survival rate of the offspring, while concentrations of 3 & 4 mg kg⁻¹ resulted in 100% masculinization.

This paper showed that small quantities of hormone can successfully achieve the inversion of sex in Siamese fighting fish with result the advantage of economic capitalization that male individuals have against the females, so much on issues of demand but also in the proportion of trade price of decorative species.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η επιτυχής έκβαση της παρούσας εργασίας είναι αποτέλεσμα μιας ουσιαστικής βοήθειας & συνεργασίας με πρόσωπα που οφείλω να ευχαριστήσω θερμά. Εκφράζω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους εκείνους που συνέβαλαν με την βοήθεια τους στην δημιουργία της παρούσας διπλωματικής διατριβής.

Καταρχήν θέλω να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου στον κ. Πάσχο Ιωάννη καθηγητή του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου για την δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το θέμα καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε. Ευχαριστώ πολύ τον Κώστα Περδικάρη, την Ευαγγελία Γκούβα & την Άννα Εργολάβου ιχθυολόγους του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου συμπαραστάτες στην πορεία μου ως ιχθυολόγος, η βοήθεια τους ήταν πολύτιμη πριν και κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον συμφοιτητή μου βιολόγο Χρήστο Χατζόπουλο καθώς επίσης στους φίλους μου ιχθυολόγους Σταύρο Σεψά & Μάρκο Κολύγα η βοήθεια των οποίων ήταν κάτι περισσότερο από σημαντική. Δεν θα ήταν δυνατόν να ξεχάσω να ευχαριστήσω τον φίλο μου Αλέξανδρο Κατσώνη για την βοήθεια του κατά την πειραματική διαδικασία όπως επίσης την εταιρία ΓΑΛΟΝΗΣ Μ. & ΣΙΑ Ο.Ε. για την σημαντικότερη ανιδιοτελή προσφορά για την υλοποίηση μέρους του πειράματος. Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω όλους όσους πίστεψαν στις δυνατότητες μου όπως και εκείνους που συνέβαλαν με τον δικό τους λίγο πιο μικρό αλλά ταυτόχρονα πολύτιμο τρόπο ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία αυτή η μεταπτυχιακή διατριβή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

		Σελίδα
	Περίληψη	I
	Abstract	II
	Ευχαριστίες	III
	Περιεχόμενα	IV
	Λίστα διαγραμμάτων	VI
	Λίστα εικόνων	VIII
	Λίστα πινάκων	IX
Κεφάλαιο 1^ο	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1	Γενικά	1
1.2	Συστηματική κατάταξη	2
1.3	Κατηγορίες μονομάχων	2
1.4	Μορφολογικά χαρακτηριστικά	3
1.5	Γεωγραφική κατανομή	6
1.6	Βιολογία του είδους	6
1.6.1	Αναπαραγωγή	6
1.6.2	Διατροφή	6
1.6.3	Οικολογία - φυσιολογία	7
1.7	Στοιχεία γενετικής	8
1.8	Ασθένειες	9
1.9	Οι μονομάχοι στην υδατοκαλλιέργεια & την έρευνα	9
1.10	Ηθολογία	11
1.11	Αντιστροφή φύλου ιχθύων	14
1.12	Σκοπός της εργασίας	18
1.13	Πληροφοριακό υπόβαθρο	19
1.13.1	Αναπαραγωγικό σύστημα και ο ρόλος των ορμονών	20
1.13.2	Τρόποι χορήγησης των ορμονών	20
Κεφάλαιο 2^ο	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1	Πειραματικός σχεδιασμός	22
2.2	Υλικά & μεθοδολογία	23
2.2.1	Ενυδρεία & εξοπλισμός	23

2.2.2	Ποιότητα του νερού	28
2.3	Πειραματική διαδικασία	29
2.4	1 ^η πειραματική διαδικασία	30
2.4.1	1 ^ο στάδιο (Γεννήτορες - Ελεγχόμενη αναπαραγωγή)	30
2.4.2	2 ^ο στάδιο (Επώαση γονιμοποιημένων ωαρίων - Εκκόλαψη προνυμφών - Εκτροφή - ανάπτυξη του γόνου - αντιστροφή φύλου)	34
2.4.3	Διαδικασία παρασκευή τροφής με 17alpha-methyltestosterone	39
2.5	2 ^η πειραματική διαδικασία	40
2.5.1	1 ^ο στάδιο (Γεννήτορες - Ελεγχόμενη αναπαραγωγή)	40
2.5.2	2 ^ο στάδιο (Επώαση γονιμοποιημένων ωαρίων - Εκκόλαψη προνυμφών - Εκτροφή - ανάπτυξη του γόνου - αντιστροφή φύλου)	41
2.6	Στατιστική ανάλυση	42
Κεφάλαιο 3^ο	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1	Ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού εκτροφής	43
3.1.1	Γενικά	43
3.1.2	Θερμοκρασία	43
3.1.3	pH	44
3.1.4	NO ₂	45
3.1.5	NO ₃	46
3.1.6	NH ₃	47
3.1.7	gH	48
3.2	Θνησιμότητα	48
3.3	Αντιστροφή φύλου	57
Κεφάλαιο 4^ο	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
	Συζήτηση	62
	Βιβλιογραφία	68
	Παράρτημα	77

Λίστα διαγραμμάτων

	Τίτλος	Σελίδα
Διάγραμμα 1	Πειραματική διαδικασία	29
Διάγραμμα 2	1 ^ο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας	30
Διάγραμμα 3	2 ^ο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας	34
Διάγραμμα 4	Αποτελέσματα μετρήσεων pH	44
Διάγραμμα 5	Αποτελέσματα μετρήσεων NO ₂	45
Διάγραμμα 6	Αποτελέσματα μετρήσεων NO ₃	46
Διάγραμμα 7	Αποτελέσματα μετρήσεων NH ₃	47
Διάγραμμα 8	Αποτελέσματα μετρήσεων gH	48
Διάγραμμα 9	Θνησιμότητα των Ομάδων A0 & A0 b (“μάρτυρες”)	49
Διάγραμμα 10	Θνησιμότητα των Ομάδων A0 & A0 b (“μάρτυρες”)	49
Διάγραμμα 11	Θνησιμότητα των Ομάδων A1 & A1 b	50
Διάγραμμα 12	Θνησιμότητα των Ομάδων A1 & A1 b	50
Διάγραμμα 13	Θνησιμότητα των Ομάδων A2 & A2 b	51
Διάγραμμα 14	Θνησιμότητα των Ομάδων A2 & A2 b	51
Διάγραμμα 15	Θνησιμότητα των Ομάδων A3 & A3 b	52
Διάγραμμα 16	Θνησιμότητα των Ομάδων A3 & A3 b	53
Διάγραμμα 17	Θνησιμότητα των Ομάδων A4 & A4 b	54
Διάγραμμα 18	Θνησιμότητα των Ομάδων A4 & A4 b	55

Διάγραμμα 19	Θνησιμότητα των ομάδων της 1 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	55
Διάγραμμα 20	Θνησιμότητα των ομάδων της 2 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	56
Διάγραμμα 21	Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A1 & A1b των δυο πειραματικών διαδικασιών	57
Διάγραμμα 22	Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A2 & A2b των δυο πειραματικών διαδικασιών	58
Διάγραμμα 23	Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A3 & A3b των δυο πειραματικών διαδικασιών	58
Διάγραμμα 24	Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A4 & A4b των δυο πειραματικών διαδικασιών	59
Διάγραμμα 25	Ποσοστά αντιστροφής φύλου των ομάδων της 1 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	59
Διάγραμμα 26	Ποσοστά αντιστροφής φύλου των ομάδων της 2 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	60

Λίστα εικόνων

	Τίτλος	Σελίδα
Εικόνα 1	Αρσενικός μονομάχος του είδους <i>B. splendens</i>	1
Εικόνα 2	Εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά αρσενικού <i>B. splendens</i>	3
Εικόνα 3	Εσωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά αρσενικού <i>B. splendens</i>	4
Εικόνα 4	Λαβύρινθος	5
Εικόνα 5	“Betta’s beard”	5
Εικόνα 6	Γεωγραφική κατανομή των μονομάχων	6
Εικόνα 7	Αλειία μονομάχων	7
Εικόνα 8	Ποικιλίες μονομάχων	8
Εικόνα 9	Ωτόλιθοι μονομάχου	10
Εικόνα 10	Ενυδρείο αποκοπής	23
Εικόνα 11	Ιχθυοκλωβοί προνυμφών	24
Εικόνα 12	Πλαστικά ενυδρεία αρσενικών μονομάχων	25
Εικόνα 13	Mini cooler	26
Εικόνα 14	Ζύγιση 17 AMT	27
Εικόνα 15	Ενυδρείο αναπαραγωγής	33
Εικόνα 16	Ζευγάρι μονομάχων κατά την αναπαραγωγή	33
Εικόνα 17	Δημιουργία φουσαλίδων από αρσενικό μονομάχο	33
Εικόνα 18	Λεκάνες επώασης	34
Εικόνα 19	Νεοεκκολαφθείσες προνύμφες σε μεγέθυνση 10X ηλεκτρονικού μικροσκοπίου	36
Εικόνα 20	Πλαστικοί ιχθυοκλωβοί προνυμφών	38
Εικόνα 21	Εμπλουτιστικό ζωντανής τροφής “Red Pepper”	41

Εικόνα 22	Ανδροποιημένοι μονομάχοι	60
Εικόνα 23	Ανδροποιημένοι μονομάχοι (φωτ. από στερεοσκόπιο)	61
Εικόνα 24	Ανδροποιημένος μονομάχος (φωτ. από στερεοσκόπιο)	61
Εικόνα Α - ΣΤ	Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης 12h & 24h	35
Εικόνα Α - Γ	Λεκτιθοφόρες προνύμφες κατά την 1 ^η - 3 ^η ημέρα	37

Λίστα πινάκων

	Τίτλος	Σελίδα
Πίνακας 1	Χρονοδιάγραμμα μετρήσεων	28
Πίνακας 2	Χρονοδιάγραμμα απαιτούμενων ενεργειών	31
Πίνακας 3	Ποσότητα τροφής και συγκέντρωση ορμόνης	39
Πίνακας 4	Απόκλιση τιμών ανάμεσα σε αρσενικά & θηλυκά άτομα οχτώ ειδών διακοσμητικών ψαριών του γλυκού νερού	66
Πίνακες παραρτήματος		
Πίνακας Π.1	Κωδικοποίηση των γεννητόρων της 1 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	77
Πίνακας Π.2	Κωδικοποίηση των γεννητόρων της 2 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	77
Πίνακας Π.3	Διατροφικά στοιχεία των χορηγούμενων τροφών των γεννητόρων	78
Πίνακας Π.4	Σύσταση των χορηγούμενων τροφών των γεννητόρων	79
Πίνακας Π.5	Διατροφικά στοιχεία των χορηγούμενων τροφών των προνυμφών	80
Πίνακας Π.6	Αποτελέσματα μετρήσεων του νερού εκτροφής της 1 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	89
Πίνακας Π.7	Αποτελέσματα μετρήσεων του νερού εκτροφής της 2 ^{ης} πειραματικής διαδικασίας	89
Πίνακας Π.8	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θνησιμότητας & αντιστροφής φύλου μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών	90

Γραμματόσημα διαφόρων χωρών που εικονίζεται το είδος
Betta splendens



Βιετνάμ



Ουγγαρία



Καμπότζη



Μαδασκάρη



Ρουμανία



Μογγολία



Κούβα



Ταϊλάνδη



Μαλαισία

Ηλεκτρονικές πηγές: www.fishbase.org/photos/SpeciesStampsList.php?speccode=4768,
<http://stampsalbum.blogspot.com/2008/06/ornamental-fish-fighting-fish-stamp.html>
& www.ioffer.com/i/102720453

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι μονομάχοι είναι ιχθείς των εσωτερικών υδάτων που ανήκουν στην οικογένεια Osphronemidae, ενώ μέχρι πρότινος κατατάσσονταν στην οικογένεια Anabantidae λόγω της ύπαρξης οργάνου λαβύρινθων χαρακτηριστικού αυτής της οικογένειας. Ο όρος "Betta" χρησιμοποιείται παγκοσμίως ως κοινό όνομα για τα συνολικά 72 είδη του γένους, αλλά αναφέρεται συχνά συγκεκριμένα στο *Betta splendens* (Goldstein, 2004; www.fightingfish.com.au/articles.php).

Τα ψάρια αυτά αξίζουν τον χαρακτηρισμό "μονομάχοι" διότι τα αρσενικά μάχονται μεταξύ τους μέχρις ότου επικρατήσει ένα από αυτά (Tulloch, 2006) ενώ είναι εξαιρετικά φιλήσυχα και μπορούν να συμβιώσουν με άλλα είδη ψαριών χωρίς κανένα πρόβλημα (Ginger, 2000).

Από το 1880, στην Ευρώπη πέρα από τα χρυσόψαρα πωλούνταν μόνο δύο ακόμη διακοσμητικά είδη ψαριών του γλυκού νερού το *Macropodus opercularis* (Paradise fish) και οι μονομάχοι του είδους *B. splendens* (Εικόνα 1). Μέχρι το 1900 ο αριθμός των διαθέσιμων τροπικών ψαριών αυξήθηκε στα 23 είδη. Σύμφωνα με το Ornamental Fish International (2007), οι μονομάχοι παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ζήτηση παγκοσμίως με τις Η.Π.Α., την Ιαπωνία, την Ευρώπη και την Αυστραλία να είναι οι μεγαλύτεροι εισαγωγείς και μεταπωλητές.



Εικόνα 1. Αρσενικός μονομάχος του είδους *B. splendens*

1.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Φύλο:	Χορδωτά
Υπέρ-κλάση:	Οστεϊχθύες
Κλάση:	Ακτινοπερύγιοι
Τάξη:	Περκοειδείς
Υπόταξη:	Anabantoidei
Οικογένεια:	Osphronemidae (Bleeker, 1859)
Υπό-οικογένεια:	Macropodinae (Liem, 1963)
Γένος:	Betta (Bleeker, 1850)
Είδος:	<i>Betta splendens</i> (Regan, 1910)
Κοινά ονόματα:	Μονομάχοι, σιαμαίοι μαχητές, Siamese fighting fish, Bettas, Fighting fishes
Taxonomic Serial:	172611
(Myers <i>et al.</i> , 2008; Froese & Pauly 2009; Integrated Taxonomic Information System, 2009)	

1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΟΝΟΜΑΧΩΝ

Σύμφωνα με το International Betta Congress (2010) στο γένος *Betta* ανήκουν επίσημα 72 είδη τα οποία διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

- Ⓢ Τα *bubblenesting Bettas*, που δημιουργούν φωλιά από φουσαλίδες όπου τοποθετούν τα γονιμοποιημένα ωάρια,
- Ⓢ τα *mouthbrooding Bettas*, που κρατούν τα αυγά στο στόμα τους όπου και γίνεται η επώαση τους.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των *bubblenesting Bettas* είναι η επιθετική τους συμπεριφορά καθώς και ο τρόπος επώασης των γονιμοποιημένων ωαρίων. Πραγματοποιείται στην επιφάνεια μέσα σε φωλιά από φουσαλίδες που δημιουργεί κυρίως το αρσενικό άτομο. Το δημοφιλέστερο είδος της κατηγορίας αυτής είναι το *B. splendens*.

Τα mouthbrooders Bettas δεν είναι τόσο επιθετικά όπως τα είδη της προηγούμενης κατηγορίας. Ο γόνος τους έχει μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τον γόνο των bubblenesters, αλλά αυτό δεν σχετίζεται με το μέγεθος των αυγών ή την διάρκεια της εκκόλαψης (Ruber *et al.*, 2004).

1.4 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

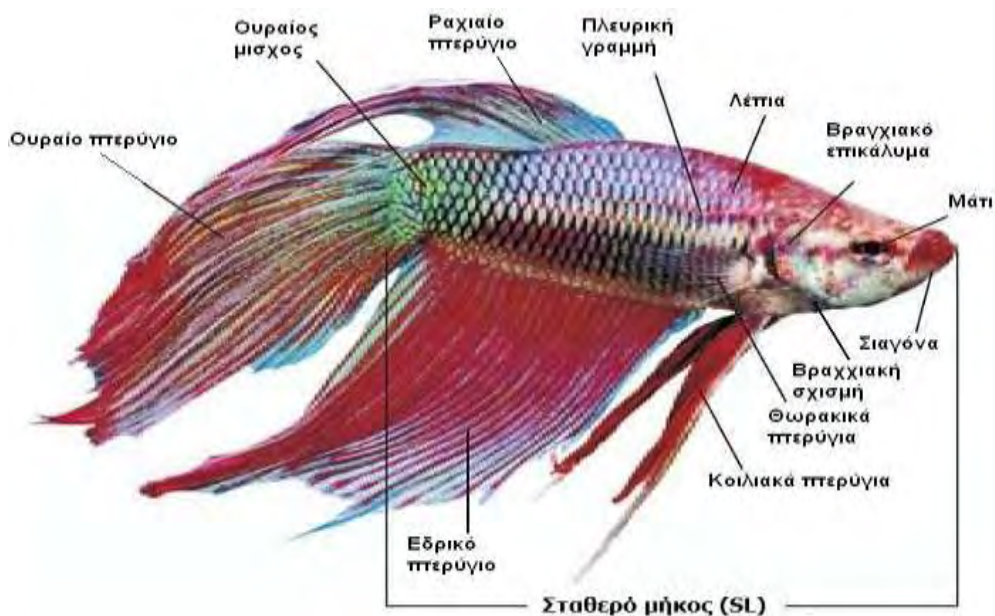
Οι μονομάχοι έχουν 3 μονά πτερύγια:

- Ⓢ Ραχιαίο πτερύγιο
- Ⓢ Εδρικό πτερύγιο
- Ⓢ Ουραίο πτερύγιο

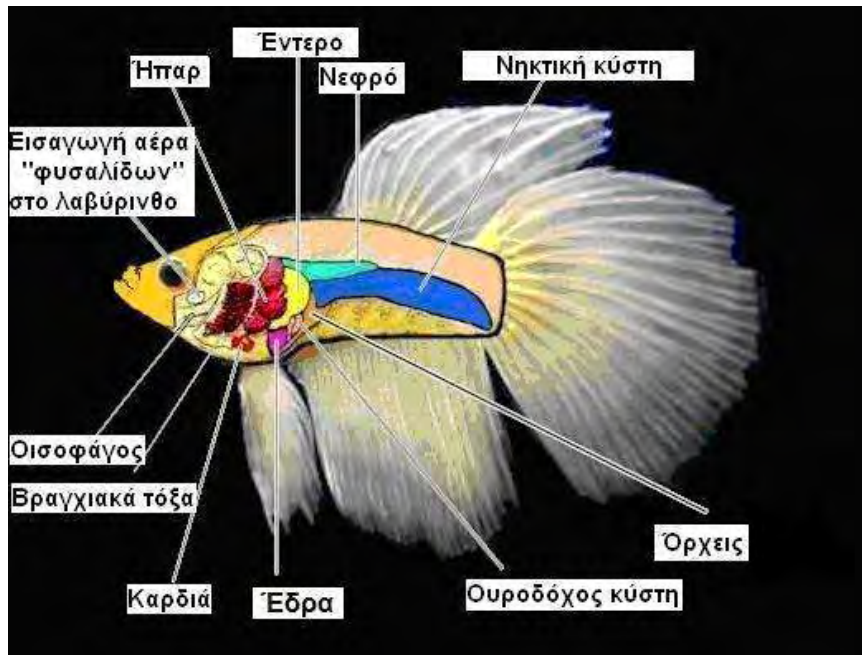
και 2 ζεύγη πτερυγίων:

- Ⓢ Θωρακικά (πίσω από τα βράγχια)
- Ⓢ & κοιλιακά πτερύγια (Stafford, 2005).

Στις Εικόνες 2 & 3 παρουσιάζονται αντίστοιχα τα εξωτερικά και εσωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των αρσενικών μονομάχων.



Εικόνα 2. Εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά αρσενικού *B. splendens* (τροποποιημένο από Goldstein, 2004)



Εικόνα 3. Εσωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά (internal anatomy) αρσενικού *B. splendens* (τροποποιημένο από Stafford, 2005)

Το **στόμα** των μονομάχων είναι στραμμένο προς τα πάνω και αυτό τους διευκολύνει στην σύλληψη της τροφής και στην πρόσληψη οξυγόνου από την επιφάνεια του νερού. Επίσης λόγω την ιδιαίτερης αυτής κατασκευής βοηθάει στη δημιουργία φουσαλίδων στην επιφάνεια του νερού.

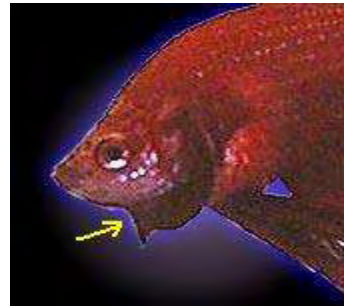
Η **κάτω σιαγόνα** είναι πολύ ισχυρή και ικανή να τεμαχίσει μικρά ζωντανά σκουλήκια, προνύμφες κουνουπιών, μικρές γαρίδες κλπ. Τα δόντια αν και μικρά είναι πολύ κοφτερά. Εντούτοις αν και επιθετικό είδος είναι πολύ υπερπροστατευτικό καθώς προφυλάσει μέσα στο στόμα του τις νεοεκκολαφθείσες προνύμφες για να τις τοποθετήσει εκ νέου κοντά στις φουσαλίδες.

Τα **μάτια** προεξέχουν ελαφρά προς τα έξω και η ίριδα είναι συνήθως μαύρη, ενώ το υπόλοιπο του ματιού μπορεί να είναι διαφορετικού χρώματος κινούνται κατά την παρατήρηση διαφόρων κινούμενων αντικειμένων και δεν ανοιγοκλείνουν (www.bettatalk.com/betta_anatomy.htm). Οι Bisazza & de Santi (2003), αναφέρουν ότι οι μονομάχοι κατά την διάρκεια των επιθέσεων και των επιδείξεων χρησιμοποιούν επιλεκτικά για άγνωστους λόγους κυρίως τον δεξιό οφθαλμό.

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά γνωρίσματα των μονομάχων είναι η ύπαρξη ενός βοηθητικού αναπνευστικού οργάνου του “λαβύρινθου” οπότε βρίσκεται παράλληλα και άνω των βραγχίων [Εικόνα 4, Stafford (2005)]. Αποτελείται από οστέινα μέρη με πολλές πτυχές που καλύπτονται από μία μεμβράνη μέσω της οποίας διέρχεται το φλεβικό αίμα. Μετά την ανταλλαγή των αερίων που διέρχονται μέσα από το λαβύρινθο γίνεται οξυγόνωση του αίματος και στο τέλος αποβολή του “χρησιμοποιούμενου” αέρα. (Goldstein, 2004; www.fightingfish.com.au/articles.php).



Εικόνα 4. Λαβύρινθος



Εικόνα 5. “Betta’s beard”

Στον λαβύρινθο μπορεί να αποθηκευτεί μόνο μια μικρή ποσότητα οξυγόνου και για το λόγο αυτό οι μονομάχοι ανεβαίνουν τακτικά στην επιφάνεια. Αυτό το όργανο είναι χρήσιμο στα νερά που είναι φτωχά σε οξυγόνο και επιτρέπει στους μονομάχους να ζουν ακόμη και σε μικρά κύπελλα ή έξω από το νερό για λίγη ώρα χωρίς να πεθαίνουν (www.bettatalk.com/betta_anatomy.htm) ενώ είναι ιδιαίτερα σημαντική η προσαρμογή του κατά την ώρα των “μαχών” καθώς παρατηρείται μειωμένη ροή νερού μέσα από τα βράγχια τους (Abrahams *et al.*, 2005).

Ένα ενδιαφέρον γνώρισμα των μονομάχων είναι η ύπαρξη μιας μεμβράνης (“Betta’s beard”) κάτω από το βραγχιακό επικάλυμμα (Εικόνα 5, Stafford, 2005). Αυτή η μεμβράνη μπορεί να είναι διαφορετικού χρωματισμού ανάλογα το χρώμα του ψαριού. Στους μονομάχους που έχουν σκούρα χρώματα αλλά και χρώματα όπως γαλάζιο ή κόκκινο, η μεμβράνη είναι σκουρόχρωμη. Ενώ σε εκείνους που είναι λευκοί ή κίτρινοι έχουν μεμβράνη υπόλευκου χρώματος. Στα αρσενικά η μεμβράνη αυτή είναι μεγαλύτερη από εκείνη των θηλυκών (Ginger, 2000; Goldstein, 2001) η οποία είναι ιδιαίτερα εμφανής κατά τη διάρκεια των “μαχών” (Abrahams *et al.*, 2005).

1.5 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Οι μονομάχοι έχουν τις “ρίζες” τους σε χώρες της Ν.Α. Ασίας όπως είναι η Μαλαισία, η Ταϊλάνδη, η Ινδονησία, η Καμπότζη, το Βιετνάμ και ορισμένες περιοχές της Κίνας (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Γεωγραφική κατανομή των μονομάχων

1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ

1.6.1 Αναπαραγωγή

Η φυσική αναπαραγωγή των μονομάχων πραγματοποιείται κυρίως σε στάσιμα νερά με πλούσια βλάστηση και μειωμένο βάθος. Η ποιότητα του νερού δεν είναι τόσο σημαντική, όμως χρειάζονται υψηλή θερμοκρασία $>24^{\circ}\text{C}$ (Esther, 2003).

1.6.2 Διατροφή

Στην φύση οι μονομάχοι τρέφονται με κουνούπια και άλλα έντομα όπως επίσης και με ζωοπλακτονικούς οργανισμούς που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του νερού (Esther, 2003). Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα, οι μονομάχοι έχουν την ικανότητα να καταναλώσουν 523 προνύμφες κουνουπιού *Aedes aegypti* g^{-1} βάρους την ημέρα, με τους θηλυκούς

μονομάχους να είναι πιο δεινοί θηρευτές (Cavalcanti *et al.*, 2007). Σε ενυδρεία οι μονομάχοι προτιμούν τα αποξηραμένα σκουλήκια (bloodworms) και συνθετική τροφή σε μορφή pellets και νιφάδες.

1.6.3 Οικολογία - φυσιολογία

Οι μονομάχοι ζουν κοντά στην επιφάνεια του νερού ανάμεσα σε αιωρούμενα φυτά (Ginger, 2000; Sneksner *et al.*, 2006) και απαντώνται σε ορυζώνες, σε λίμνες και σε θερμά γλυκά νερά χαμηλής ροής (Εικόνα 7, Goldstein, 2004), τις περισσότερες φορές στάσιμα. Το προσδόκιμο ζωής τους είναι 3 - 5 χρόνια και το μέγιστο μέγεθος τους 7 cm (Esther 2003; Froese & Pauly, 2009).



Εικόνα 7. Αλιεία μονομάχων

Οι μονομάχοι συγκριτικά με άλλα διακοσμητικά είδη των εσωτερικών υδάτων αποτρέπουν αποτελεσματικότερα από τον πολλαπλασιασμό του εντόμου *Aedes aegypti* μέσα σε δεξαμενές και δοχεία μεταφοράς ψαριών (Pamploma *et al.*, 2009), χαρακτηριστικό το οποίο αποτρέπει την μεταφορά ασθενειών μέσω των υπό εκκόλαψη κουνουπιών.

Συνοπτικά, οι μονομάχοι ζουν σε περιβάλλον με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

pH 6-8 (Βέλτιστη: 7.0)

Θερμοκρασία: 24-30°C

Θερμοκρασία αναπαραγωγής: 27-29°C (Βέλτιστη 28°C)

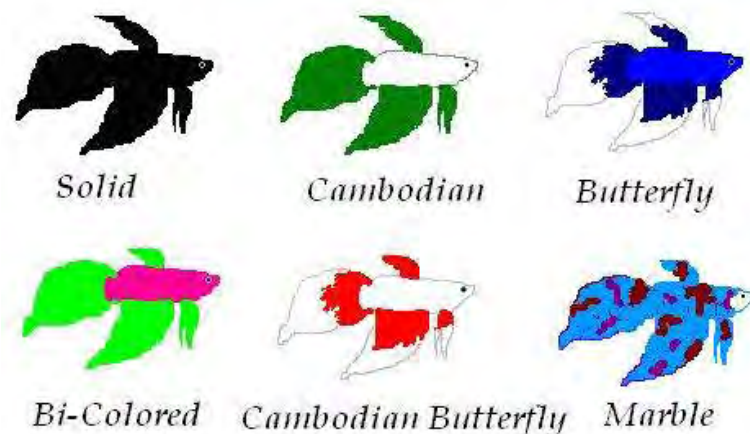
Ποιότητα νερού: Μαλακό - μέτριο μαλακό

(Wikerling, 1990; Esther 2003; Froese & Pauly, 2009)

1.7 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Οι μονομάχοι λόγω της ανθεκτικότητας τους αλλά και του μικρού αριθμού χρωμοσωμάτων που διαθέτουν (n=21) είναι κατάλληλοι για κυτταρολογικές έρευνες (Bennington, 1937). Όπως αναφέρουν οι Monvisses *et al.* (2009), η γενετική βάση των χρωστικών ουσιών των μονομάχων δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά το 1934 από τους Goodrich & Mercer (Bennington, 1937; International Betta Congress, 2010).

Στο εμπόριο υπάρχουν μονομάχοι όλων των χρωμάτων και ποικιλιών, ενώ στην Εικόνα 8 που ακολουθεί παρουσιάζονται μερικές ποικιλίες.



Εικόνα 8. Ποικιλίες μονομάχων (τροποποιημένο από Ginger, 2000)

1.8 ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οι μονομάχοι είναι εξαιρετικά ανθεκτικό είδος όμως αυτό δεν σημαίνει ότι δεν μπορούν να προσβληθούν από κάποια ασθένεια. Οι πιο σημαντικοί παθολογικοί παράγοντες που έχουν καταγραφεί (Ginger, 2000; Miller, 2008) είναι:

- *Oodinium pillularis* βελούδο “velvet”
- λοίμωξη της νηκτικής κύστης
- Ιχθυοφθειρίαση (Ich)
- Dropsy (βακτηριακή μόλυνση) καθώς και άλλες βακτηριακές μολύνσεις
- Σαπρολεγνίαση (*Saprolegnia spp.*)

1.9 ΟΙ ΜΟΝΟΜΑΧΟΙ ΣΤΗΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ

Η εκτροφή μονομάχων θεωρείται παραδοσιακή στην Ν.Α. Ασία και το ενδιαφέρον για μαζική παραγωγή έχει αυξηθεί λόγω της ανάπτυξης και της κερδοφορίας των επιχειρήσεων παραγωγής και εμπορίας διακοσμητικών ειδών. Δεσπόζουσα θέση στον τομέα της εκτροφής λόγω του αυξημένου εμπορικού ενδιαφέροντος κατέχει το είδος *B. splendens*. Η εκτροφή μονομάχων σε χωμάτινες δεξαμενές, είναι το πιο συνηθισμένο σύστημα εκτροφής στον κόσμο, το οποίο σταδιακά δίνει τη θέση του σε πιο σύγχρονα συστήματα εκτροφής. Στις περισσότερες περιοχές εκτροφής προτιμούνται τα ημι-εντατικά και εντατικά συστήματα εκτροφής, ενώ η ανθεκτικότητα του είδους προσφέρει την δυνατότητα εντατικοποίησης της παραγωγής.

Όπως συμβαίνει και στην φύση, έτσι και κατά την ελεγχόμενη αναπαραγωγή οι μονομάχοι μεριμνούν όχι μόνο να κυριαρχήσουν σε μία περιοχή αλλά και να εξασφαλίσουν ασφαλή μέρη για τους απογόνους τους (Clotfelter *et al.*, 2006; Collins, 2008). Σημαντικότερος παράγοντας επιτυχίας αποτελεί η κατασκευή μεγάλης και πυκνής “φωλιάς” φυσαλίδων εκ μέρους των αρσενικών, κάτι που συνεπάγεται ποιοτική γονική μέριμνα (Clotfelter *et al.*, 2006).

Σύμφωνα με τους Clotfelter et al., 2006 τα θηλυκά επιλέγουν συνήθως τους μεγαλύτερους μονομάχους για γονιμοποίηση. Αντίθετα, οι Jaroensutasinee M. & Jaroensutasinee K. (2005), υποστηρίζουν ότι η επιλογή των θηλυκών δεν είναι πάντοτε τα μεγαλύτερα αρσενικά άτομα.

Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας που αφορά στους μονομάχους αφορά στη χρήση στεροειδών και στην ηθολογία τους.

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες που σχετίζονται με μονομάχους εντείνονται και αφορούν σε θέματα, όπως είναι:

- η επίδραση των χημικών ουσιών στη διατροφή ενήλικων ατόμων (Gouveia et al., 2007),
- η αντίδραση άγριων και ατόμων σε αιχμαλωσία σε στρεσογόνα ερεθίσματα (Verbeek et al., 2008),
- τα φυλογενετικά χαρακτηριστικά (Ruber et al., 2006) και η σύσταση των μυών (Yamada et al., 2009),
- οι αλλαγές στα εσωτερικά ανατομικά χαρακτηριστικά από την επίδραση στεροειδών (Foberg, 2003).

Στην Εικόνα 9 που ακολουθεί διακρίνονται ωτόλιθοι μονομάχου (φωτ. στερεοσκοπίου)



Εικόνα 9. Ωτόλιθοι μονομάχου (φώτο: Κ. Κηπουρός, 2009)

1.10 ΗΘΟΛΟΓΙΑ

Η ηθολογία αποτελεί γνωστικό κλάδο που αφορά στη μελέτη της συμπεριφοράς των ζωικών οργανισμών. Όπως όλα τα ζώα έτσι και στα ψάρια δεν απαιτείται εμπειρία για την εμφάνιση μιας συμπεριφοράς αλλά αποτελεί μιας ζωτικής σημασίας ενέργεια που πρωταρχικό στόχο έχει την επιβίωση. Επίσης, τα ένστικτα δεν απαιτούν εκτενή νευρική κωδικοποίηση για την αποθήκευση και τροποποίηση πληροφοριών. Οι μορφές επικοινωνίας των ζωικών οργανισμών είναι: ο χημικός, ο οπτικός και ο μηχανικός τρόπος (συμπεριλαμβανομένης και της αφής και της επικοινωνίας από ήχους ή δονήσεις). Η πιο πρωτόγονη μορφή επικοινωνίας εκτιμάται ότι είναι η διαβίβαση των μηνυμάτων μέσω των χημικών ουσιών (Παπουτούγλου, 1998). Στους μονομάχους, κατά την διάρκεια των “επιδείξεων” η χρήση των ματιών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο απέναντι στο ίδιο φύλο αλλά και κατά την διάρκεια της αναπαραγωγής και πιθανολογείται ότι σχετίζεται με την εξέλιξη τμήματος του εγκεφάλου (Cantalupo *et al.*, 1996).

Πολλά ψάρια ζουν όλη τη ζωή τους ομαδικά και αυτό τους εξασφαλίζει προστασία από θηρευτές, μεγαλύτερες πιθανότητες εύρεσης τροφής αλλά και ζευγαρώματος. Οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις των μονομάχων διαφέρουν από πολλά είδη ψαριών και έχουν μελετηθεί εκτενώς στα πλαίσια των ιεραρχιών κυριαρχίας, της μεταξύ τους επικοινωνίας, αλλά και της επιλογής συντρόφων. Εδώ και πολλά χρόνια σημαντικός αριθμός ερευνητών μελετούν την συμπεριφορά των μονομάχων (Craft *et al.*, 2003), τα σήματα των οποίων είναι ευδιάκριτα και καλύπτουν μεγάλη ακτίνα δράσης (Doutreland *et al.*, 2001) ενώ η συμπεριφορά τους μεταβάλλεται αναλόγως των περιστάσεων (Dzieweczynski *et al.*, 2005). Η ανταλλαγή επιθετικών σημάτων, τους επιτρέπει να οργανώσουν τις σχέσεις κυριαρχίας μεταξύ τους (Abate, 2005; Dzieweczynski *et al.*, 2006a) όπου γίνεται ανίχνευση της αγωνιστικής δυνατότητας και ετοιμότητας του αντιπάλου (Castro *et al.*, 2006), ενώ οι αντιδράσεις των μονομάχων απέναντι σε κάποιο ερέθισμα είναι αποτέλεσμα επιθετικής συμπεριφοράς παρά περιέργειας (Bols, 1977).

Οι μεγαλύτερου μεγέθους μονομάχοι συνήθως είναι πιο επιθετικοί και πιο ικανοί να τρέψουν σε φυγή τον αντίπαλο σε σχέση με τους μικρότερους, ενώ η στρατηγική και η επιθετικότητα κατά την μάχη είναι παρόμοια (Jaroensutasinee M. & Jaroensutasinee K. (2005), ενώ σύμφωνα με τους Halperin *et al.* (1998), τα υπερβολικά επιθετικά αρσενικά χάνουν συνήθως περισσότερες μάχες από τα άλλα αρσενικά. Η επιθετική συμπεριφορά των μονομάχων εκδηλώνεται ακόμη και απέναντι σε έναν καθρέφτη ή ένα ομοίωμα (Cantalupo *et al.*, 1996; Dzieweczynski *et al.*, 2006b). Αποτέλεσμα αυτής της συμπεριφοράς είναι η εμφάνιση κινήσεων αυτοκυριαρχίας όπως το άνοιγμα όλων των περυσίων του σώματος, του βραγχιακού επικαλύμματος και η επιθετική κολύμβηση (Dzieweczynski *et al.*, 2006b ; Collins, 2008), ενώ ταυτόχρονα έχει μελετηθεί ότι αυτό οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων 11-κετοτεστοστερόνης (Snekser *et al.*, 2006). Μεγαλύτερα ποσοστά 11-κετοτεστοστερόνης παρουσιάζονται όταν ο μονομάχος είναι πλησίον της φωλιάς του και όταν υπάρχει παρουσία άλλων ατόμων (Dzieweczynski *et al.*, 2006a), ενώ η αύξηση της έντασης των “επιδειξεων” (“flare”) εκδηλώνεται κυρίως απέναντι στα θηλυκά άτομα (Doutreland *et al.*, 2001), κάτι που οδηγεί σε αύξηση των μεταβολικών δαπανών και μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων (Abate, 2005; Castro *et al.*, 2006).

Οι Herb *et al.* (2003) υποστήριξαν ότι η επιλογή των αρσενικών για ζευγάριμα σχετίζεται με την οπτική παρουσία θηλυκών ατόμων κατά την διάρκεια των “μαχών” μεταξύ αρσενικών ατόμων, ενώ, πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η “επίδειξη” των αρσενικών απέναντι στα θηλυκά πριν την αναπαραγωγή ήταν αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων στην φωλιά του ζευγαριού (Clotfelter *et al.*, 2006).

Οι Jaroensutasinee M. & Jaroensutasinee K. (2003), υποστήριξαν ότι η επιθετικότητα των αρσενικών γεννητόρων αυξάνεται βαθμιαία αναλόγως του βαθμού ωριμότητας των γονιμοποιημένων ωαρίων. Πιο συγκεκριμένα, τα αρσενικά που πρόσεχαν τα αυγά επέδειξαν επιθετικότερη στάση απέναντι σε άλλα αρσενικά εισβολείς, μέτρια-ενδιάμεση επιθετικότητα απέναντι σε

θηλυκούς μονομάχους και χαμηλότερη απέναντι στα θηλυκά που είχαν γεννήσει.

Μελέτη του 1979 από τους Weiss & Coughlin, κατέληξε στο συμπέρασμα πως η συμπεριφορά των ενήλικων αρσενικών μονομάχων πιθανό να μην είναι υπό τον έλεγχο των αναπαραγωγικών ορμονών. Ύστερα από σύγκριση αρσενικών ατόμων με γοναδεκτομή και φυσιολογικών αρσενικών, τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα πως οι γοναδοτροπίνες ευθύνονται για την διατήρηση της επιθετικότητας ακόμη και μετά την γοναδεκτομή. Αντίθετα ο Oliveira (2009) υποστήριξε πως με δεδομένο ότι οι στεροειδείς ορμόνες ανταποκρίνονται στις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις και στους δέκτες εκφράζοντας εκτενώς το συμπεριφοριστικό νευρικό σύστημα, τα στεροειδή διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ορμονική διαμόρφωση της κοινωνικής πλαστικότητας.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστό πως η γοναδεκτομή προκαλεί την αντιστροφή φύλου σε ορισμένους τελεόστεους ιχθύες (Παπουτσόγλου, 1998). Σύμφωνα με τους Lowe & Larkin (1975) τα 2/3 των ψαριών που θα επιζήσουν ύστερα από χειρουργική επέμβαση θα αλλάξουν φύλο, ενώ οι Pandian & Koteeswaran (1998) αναφέρουν ότι θηλυκός μονομάχος ανέπτυξε ορχείς μετά από ωθηκεκτομή και έγινε λειτουργικό αρσενικό.

Η αφαίρεση του πρόσθιου τμήματος του εγκεφάλου σύμφωνα με τους Van Cantfort & Bingham (2002) οδήγησε σε μείωση της επιθετικότητας των αρσενικών μονομάχων, όμως κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο εγκέφαλος δεν μεσολαβεί άμεσα για την εκδήλωση επιθετικών κινήσεων αλλά διευκολύνει την ικανότητα διέγερσης κατά την εκδήλωση επιθετικής συμπεριφοράς.

Σε πείραμα των Braud & Weibel (1969) μελετήθηκε η επίδραση ψυχοτρόπων φαρμάκων (morphine sulfate & phenergan) στη συμπεριφορά των μονομάχων με αποτέλεσμα την αύξηση και μείωση της επιθετικότητας ανάμεσα στις δύο ομάδες αντίστοιχα. Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως χαρακτηριστικό στοιχείο της έρευνας αυτής ήταν ότι η επίδραση στη συμπεριφορά των μονομάχων συνεχίστηκε και μετά την λήψη των

συγκεκριμένων φαρμάκων. Οι Galizio *et al.* (1985) σε παρόμοια μελέτη αναφέρουν ότι η αιθανόλη αυξάνει την επιθετική συμπεριφορά των μονομάχων όσο αυξάνεται η ποσότητα της, ενώ δεν αλληλεπιδρά με οπιούχα όπως είναι η naltrexone. Οι Gonzalez *et al.* (1971) πραγματοποίησαν παρόμοια μελέτη με χρήση Δ⁹-tetrahydro-cannabinol με αποτέλεσμα τη μεγάλη μείωση της επιθετικής συμπεριφοράς των μονομάχων. Εντούτοις, ύστερα από 8 - 10 εκθέσεις σε διάστημα 31 ημερών είχε σαν αποτέλεσμα την ανοχή των ψαριών στο φάρμακο ενώ δεν προκλήθηκε περαιτέρω τροποποίηση στη συμπεριφορά τους. Σε νεότερη έρευνα των Lynn *et al.* (2007) επιτεύχθει ο έλεγχος της επιθετικής συμπεριφοράς αρσενικών μονομάχων με την χορήγηση 3 mg ml⁻¹ fluoxetine στο νερό του ενυδρείου για διάρκεια 3 ωρών, καθώς η χορήγηση της fluoxetine οδήγησε στον έλεγχο της σεροτονίνης (ουσία που ρυθμίζει την επιθετική συμπεριφορά των σπονδυλωτών).

Όσον αφορά στους θηλυκούς μονομάχους οι Blakeslee *et al.* (2009) αναφέρουν πως επιλέγουν να κολυμπούν κοντά σε άτομα παρόμοιου χρωματισμού ενώ συνήθως αποφεύγουν να κολυμπούν κοντά σε μεμονωμένα ή μεγαλύτερα θηλυκά άτομα.

1.11 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΦΥΛΟΥ ΙΧΘΥΩΝ

Σε πολλά είδη όπως είναι τα σολομοειδή, η τιλάπια κ.α. ο έλεγχος του φύλου επιδιώκεται κυρίως με σκοπό την εμφάνιση ποιοτικών χαρακτηριστικών, την αξιοποίηση του διαφορετικού ρυθμού ανάπτυξης μεταξύ των δύο φύλων και τον περιορισμό της πρόωρης γεννητικής ωριμότητας (Πάσχος, 2004). Στα διακοσμητικά ψάρια δίνεται έμφαση κυρίως στα εξωτερικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ψαριών (Piferrer & Chuan Lim, 1997). Οι παράγοντες που κρίνουν την επιτυχή αντιστροφή φύλου είναι το είδος του στεροειδούς που θα χρησιμοποιηθεί, η μέθοδος εφαρμογής, η χορηγούμενη δόση, ο συγχρονισμός (timing) και η διάρκεια της μεθόδου (Piferrer & Chuan Lim, 1997; Piferrer, 2001).

Η αλλαγή φύλου αποτελεί μια πολυποίκιλη διαδικασία στα πρωτόγυνα και πρώτανδρα ερμαφρόδιτα ψάρια (Frisch, 2004) που πιθανώς χρησιμεύει στη βελτίωση της αναπαραγωγικής επιτυχίας κατά τη διάρκεια της ζωής τους με στόχο τη διαιώνιση του είδους. Για περισσότερα από 30 χρόνια οι βιολόγοι πίστευαν πως η αλλαγή του φύλου οφείλεται στα στεροειδή. Η πρόοδος της επιστήμης επιτάχυνε τις εξελίξεις και στην πορεία ανακαλύφθηκαν νέες μέθοδοι όπως είναι η ραδιοανοσολογία (RIA) και η πιο πρόσφατη τεχνική ELISA που επέτρεψαν το γρήγορο και ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης στεροειδών στα δείγματα. Έτσι, ο αριθμός των ερευνών αναφορικά με την αλλαγή φύλου έχει αυξηθεί όπως και ο αριθμός των υποθέσεων-ερωτημάτων για την διαδικασία αυτή (Frisch, 2004).

Η ορμονική παρέμβαση αντιστροφής φύλου είναι εφικτή σε 47 είδη (15 οικογενειών) γονοχωριστικών, 34 είδη (9 οικογενειών) ερμαφρόδιτων ψαριών, με χρήση ενός εκ των 31 στεροειδών (16 ανδρογόνα, 15 οιστρογόνα) (Pandian & Sheela, 1995). Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως τα γεννητικά στεροειδή στα ερμαφρόδιτα είδη διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ωρίμανση και ανάπτυξη των γονάδων όπως ισχύει και στα γονοχωριστικά είδη (Frisch, 2004). Συνολικά η δυνατότητα αντιστροφής φύλου εμφανίζεται ανεξάρτητα σε τουλάχιστον 23 οικογένειες τελεόστεων ιχθύων που περιλαμβάνουν 350 είδη, τα περισσότερα από τα οποία διαβιούν σε κοραλλιογενείς υφάλους (Frisch, 2004).

Σε πολλά εκτρεφόμενα είδη, τα θηλυκά εμφανίζουν υψηλότερο ρυθμό σωματικής αύξησης σε σχέση με τα αντίστοιχα αρσενικά. Πολλά είδη αρσενικών επίσης ωριμάζουν γεννητικά πριν ακόμη φτάσουν στο εμπορεύσιμο μέγεθος. Αυτό οδηγεί σε ανομοιομορφία μεγεθών και γενική μείωση της παραγωγής, επομένως υπάρχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παγκοσμίως για τον έλεγχο του φύλου των ψαριών (Piferrer, 2001).

Η αντιστροφή φύλου περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό εδώδιμων ψαριών αλλά και διακοσμητικών. Σύμφωνα με τον Piferrer (2001) σε αυτά περιλαμβάνονται τα χέλια, τα σολομοειδή, τα κυπρινοειδή, τα πλατύψαρα, τα γατόψαρα, οι τιλάπιες κ.α., Όσον αφορά τα εδώδιμα ψάρια εφαρμόζεται η

έμμεση αντιστροφή φύλου ή εναλλακτικά ακόμη και η άμεση χορήγηση ορμονών με την χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωση.

Στις **τιλάπιες** και τα **κουπρινοειδή** σύμφωνα με τους Pandian & Sheela (1995) η αντιστροφή φύλου μπορεί να εμφανιστεί 2-3 φορές ταχύτερα αν χορηγηθεί η βέλτιστη ποσότητα ορμόνης.

Σε **γατόψαρα** του είδους *Heteropneustes fossilis* (Bloch) έχει επιτευχθεί αντιστροφή φύλου ύστερα από έκθεση των γονιμοποιημένων ωαρίων σε 2 είδη ανδρογόνων, 17 α -methyltestosterone (AMT) & 17 α -ethyltestosterone (ET) και 2 είδη οιστρογόνων, 17 β -estradiol (E₂) & diethylstilbestrol (DES). Τα ωάρια εκτέθηκαν στις τέσσερις διαφορετικές ορμόνες 20h μετά την γονιμοποίηση σε συγκεντρώσεις 100–400 mg l⁻¹ για 1–4 h. Η εμβάπτιση για 3 h σε (17AMT) & (17AET) παρήγαγε 80–82 % αρσενικά, ενώ η εμβάπτιση σε (E) & (DES) εμφάνισε 79–89 % θηλυκά. Η έκθεση σε άλλες συγκεντρώσεις και χρονικές περιόδους παρήγαγε πολλά intersex άτομα που χαρακτηριζόταν από εμφάνιση σπερματογονίων αλλά και ωοκυττάρων στην ίδια γονάδα (Haniffa *et al.*, 2004).

Θετικά αποτελέσματα επιτυχής αντιστροφής φύλου έχει επιτευχθεί με εμφύτευση (implantation) 17 AMT σε **ροφούς** (*Epinephelus malabaricus*) όπου ύστερα από 2 εμφυτεύσεις σε θηλυκά άτομα 3 ετών προέκυψαν λειτουργικά αρσενικά. Τα ανδροποιημένα ψάρια έγιναν 100% λειτουργικά 301 ημέρες μετά την τελευταία χορήγηση της ορμόνης και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως γεννήτορες με φυσιολογικά αποτελέσματα (Chen & Zhang, 2001).

Στα **Guppy** (*Poecilia reticulata*) η διαφοροποίηση του φύλου πραγματοποιείται πριν την γέννηση (ζωοτόκα) και αν δεν πραγματοποιηθεί έγκαιρα η χορήγηση ορμόνης το αποτέλεσμα της αντιστροφής φύλου θα είναι προσωρινό (Piferrer & Chuan Lim, 1997). Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στην Σιγκαπούρη χορηγήθηκε 17 AMT δια μέσω της τροφής για 2–4 εβδομάδες (από την 3^η ημέρα της γέννησης τους) σε συγκεντρώσεις 20, 40 & 80 mg kg⁻¹ (Piferrer & Chuan Lim, 1997).

Οι **ξιφοφόροι** *Xiphophorus helleri*, όπως ισχύει στους μονομάχους αποτελούν ένα σημαντικό εμπορικά διακοσμητικό είδος του γλυκού νερού με τα αρσενικά άτομα να υπερτερούν φαινοτυπικά έναντι των θηλυκών λόγω της επέκτασης του ουραίου πτερυγίου σαν ξίφος. Η αντιστροφή φύλου των ξιφοφόρων μπορεί να επιτευχθεί σε άτομα που δεν έχουν αναπτύξει ακόμη τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά τους με τη χορήγηση 17 AMT μέσω της τροφής. Για 100% επιτυχή αντιστροφή φύλου απαιτείται διατροφή διάρκειας 28 ημερών σε συγκέντρωση 60 mg kg⁻¹ τροφής και ποσότητα (τροφής) 3 - 5 % του σωματικού τους βάρους (Yanong *et al.*, 2006), ενώ σε πρόσφατη έρευνα επιτεύχθει η αντιστροφή φύλου 100% με τη χορήγηση 17 AMT σε συγκέντρωση 50 mg kg⁻¹ διάρκειας 45 ημερών (Amiri-Moghaddam *et al.*, 2010).

Επιστήμονες στις Φιλιππίνες πέτυχαν την αντιστροφή φύλου σε υβρίδιο κόκκινου χρώματος ύστερα από διασταύρωση των ειδών *Oreochromis niloticus* Linn. x *Oreochromis mossambicus* Linn. Το στεροειδές που χρησιμοποιήθηκε ήταν fluoxymesterone και χορηγήθηκε σε γόνου μέσω της τροφής στις συγκεντρώσεις 40, 60 & 80 mg kg⁻¹ τροφής για διάστημα 21 ημερών. Η ομάδα του γόνου στην οποία χορηγήθηκε fluoxymesterone στη συγκέντρωση 40 mg kg⁻¹ τροφής παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά αντιστροφής φύλου 96,10% ενώ οι άλλες δύο συγκεντρώσεις οδήγησαν σε αυξημένα ποσοστά στειρότητας, ενώ το ποσοστό επιβίωσης των μαρτύρων δεν διέφερε από εκείνο των τριών ομάδων. (Manosroi *et al.*, 2004).

Η παραγωγή ολοαρσενικών μονομάχων μπορεί να επιτευχθεί με την μέθοδο **εμβάπτισης** των προνυμφών σε διάλυμα 17 AMT (17α-methyltestosterone) με συγκέντρωση 100-1000 mg l⁻¹ η οποία πραγματοποιείται την 2^η, 5^η & 8^η ημέρα μετά την εκκόλαψη (Kirankumar & Pandian, 2002). Ομοίως, με την παραπάνω μέθοδο έχει επιτευχθεί η παραγωγή ολοαρσενικών μονομάχων με χρήση NE (norethindrone acetate) (250 - 1250 mg l⁻¹) την 2^η, 5^η & 8^η ημέρα μετά την εκκόλαψη με διάρκεια εμβάπτισης τριών ωρών (Balasubramani & Pandian, 2008).

Οι Badura & Friedman (1988) πέτυχαν την αντιστροφή φύλου με την μέθοδο της **έγχυσης** τεστοστερόνης σε ενήλικα θηλυκά άτομα για διάρκεια 3,6 & 9 εβδομάδων, ενώ οι Pandian & Sheela (1995) υποστηρίζουν ότι η χρήση στεροειδών με στόχο την αντιστροφή φύλου μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη θνησιμότητα ανάμεσα σε ψάρια που παρουσιάζουν ομόζυγους γενότυπους (XX, ZZ).

Οι Kavumpurath & Pandian (1994b) πέτυχαν την αντιστροφή φύλου με χρήση τεσσάρων διαφορετικών ανδρογόνων και αναφέρουν ότι η θνησιμότητα του γόνου είναι πολύ μικρότερη όταν χρησιμοποιούνται φυσικές ορμόνες 11-ketotestosterone & androstenedione, έναντι των συνθετικών 17-alpha-methyltestosterone & 19-nor-ethynyltestosterone.

Αν και στην πλειονότητα της η αντιστροφή φύλου των μονομάχων έχει ως επίκεντρο τα αρσενικά άτομα (Kavumpurath & Pandian, 1992) δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που έχει επιτευχθεί αντιστροφή φύλου για την παραγωγή θηλυκών ατόμων με χρήση οιστρογόνων ή με έμμεση αντιστροφή φύλου όπως πραγματοποιήθηκε από τους Lowe & Larkin (1975). Τις περισσότερες φορές, στόχος της παραγωγής ολοθηλυκών μονομάχων αποτελούσε η μελέτη της κοινωνικής τους συμπεριφοράς (Kavumpurath & Pandian, 1992).

1.12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η σύλληψη “άγριων” διακοσμητικών ψαριών από τη φύση δεν θεωρείται η πιο ενδεδειγμένη μέθοδος από παραγωγική και οικολογική άποψη μιας και η αλόγιστη αλιείωση νεαρών μονομάχων μπορεί να οδηγήσει στη συρρίκνωση των άγριων πληθυσμών. Οι συνέπειες αυτής της πρακτικής είναι άγνωστες μιας και δεν υπάρχει μελέτη για τον μέγιστο επιτρεπόμενο αριθμό άγριων ατόμων που συλλαμβάνονται κατ’ έτος. Έτσι, απαιτείται η παραγωγή μονομάχων με τη χρήση νέων μεθόδων. Η ελεγχόμενη αναπαραγωγή απαιτεί λεπτούς χειρισμούς λόγω της επιθετικότητας των συγκεκριμένων ψαριών, είναι όμως εφικτή και η χρήση της μπορεί να μειώσει την υπεραλιείωση των μονομάχων που πραγματοποιείται σε χώρες της Ν.Α. Ασίας.

Η παρέμβαση με χρήση στεροειδών ορμονών συνίσταται στην χορήγηση συνθετικών ανδρογόνων σε δυφυλετικά ψάρια με σκοπό τον έλεγχο του φύλου τους. Έτσι με την χορήγηση των ορμονών αναπτύσσονται όλοι εκείνοι οι μηχανισμοί ανατομικής αντιστροφής φύλου.

Το παρόν πείραμα υλοποιήθηκε 2 φορές σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η επιλογή των γεννητόρων έγινε από το εμπόριο διακίνησης ψαριών (από διαφορετικούς προμηθευτές) και ήταν διαφορετικοί και στις δυο περιπτώσεις για την εξασφάλιση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποικιλομορφίας των απογόνων. Όταν οι γεννήτορες έφτασαν στο επιθυμητό επίπεδο γεννητικής ωριμότητας ξεκίνησε η διαδικασία της ελεγχόμενης αναπαραγωγής ύστερα από την επίτευξη συγχρονισμού των γεννητόρων για την εξασφάλιση μεγαλύτερου αριθμού γονιμοποιημένων ωαρίων από πολλές γέννες την ίδια μέρα. Στόχος της εργασίας ήταν η ελεγχόμενη αναπαραγωγή του είδους *B. splendens* και στη συνέχεια η παραγωγή ολοαρσενικών απογόνων με χρήση 17 AMT. Καταγράφηκαν τα ποσοστά θνησιμότητας σε όλα τα στάδια ανάπτυξης μέχρι την 56^η ημέρα μετά την εκκόλαψη και το ποσοστό του γόνου που άλλαξε φαινότυπο με την χορήγηση συνθετικής τροφής με 17 AMT σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 2, 3, 4 mg kg⁻¹). Παράλληλα, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την ομάδα των “μαρτύρων” απουσία ορμόνης.

1.13 ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Για την έκφραση του φύλου σύμφωνα με τους Devlin & Nagahama (2002) θεωρούνται υπεύθυνες δύο διαδικασίες, ο **καθορισμός του φύλου** (sex determination) και η **διαφοροποίηση του φύλου** (sex differentiation). Ο καθορισμός του φύλου γίνεται τη στιγμή της γονιμοποίησης, ενώ για την περιγραφή της φυσιολογικής εξέλιξης των διαδικασιών της ορχικής και ωοθηκικής ανάπτυξης χρησιμοποιείται ο όρος “διαφοροποίηση φύλου”.

Σύμφωνα με την Piferrer (2001) οι διαδικασίες καθορισμού και διαφοροποίησης του φύλου είναι ασταθείς στους τελεόστεους ιχθύες. Την τελευταία δεκαετία έχει αποδειχτεί η παρουσία ενός νέου μηχανισμού

διαφοροποίησης φύλου στα ψάρια η ονομαζόμενη “περιβαλλοντική διαφοροποίηση” οπου το περιβάλλον επιδρά στο γενότυπο για τη διαφοροποίηση του φύλου. Άλλοι παράγοντες για την ανάπτυξη του φύλου εκτός από τη θερμοκρασία είναι η ποιότητα του νερού, όπως επίσης και κοινωνικοί παράγοντες της ζωής των ψαριών (Pandian & Koteeswaran, 1999; Frisch, 2004).

1.13.1 Αναπαραγωγικό σύστημα & ο ρόλος των ορμονών

Οι ορμόνες που παράγουν οι γονάδες των τελεόστεων ιχθύων ανήκουν στα γοναδικά ή φυλετικά στεροειδή. Διακρίνονται στα **ανδρογόνα** (19 άτομα C), στα παράγωγα του **πρεγνανίου** (21 άτομα C), στα **οιστρογόνα** (18 άτομα C) καθώς επίσης και σε μία ακόμη ομάδα που περιλαμβάνει τα ενωμένα με **γλυκουρονικό** οξύ στεροειδή (Παπουτσόγλου 1998). Για την αντιστροφή του φύλου των ψαριών οι προτιμώμενες ορμόνες είναι η 17α- methyltestosterone και η 17β-estradiol για παραγωγή ολοαρσενικών και ολοθηλυκών ψαριών αντίστοιχα (Pandian & Sheela, 1995), ενώ σύμφωνα με τον Oliveira (2009) οι ορμόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως διαμορφωτές του τρόπου συμπεριφοράς των ιχθύων.

1.13.2 Τρόποι χορήγησης των ορμονών

Οι βασικοί τρόποι χορήγησης των ορμονών που χρησιμοποιούνται στα ψάρια με στόχο την αντιστροφή φύλου είναι 4, με **έγχυση** (injection), με **εμφύτευση** (implantation) (Chen & Zhang, 2001), με **εμβάπτιση** (immersion) & **μέσω της τροφής** (Pandian & Koteeswaran, 1999; Kirankumar & Pandian, 2002). Τα ανδρογόνα ή γοναδικά στεροειδή των αρσενικών σύμφωνα με τον Παπουτσόγλου (1998) παρουσιάζουν μια πολύπλοκη βιολογική δράση στους οργανισμούς των ιχθύων και όχι μόνο διότι η δράση τους είναι συνδεδεμένη με χαρακτηριστικά των αρσενικών ατόμων, που σχετίζονται με:

- ↪ την αναπαραγωγική συμπεριφορά,
- ↪ τη σπερματογένεση (αφορά σε όλα τα στάδια παραγωγής σπερματοζωαρίων),

- τη σπερμιογένεση (πλήρης παραγωγή σπέρματοζωαρίων μέχρι το μέρος των σπερματιδίων),
- δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου.

Η βιοσύνθεση τους πραγματοποιείται σε διάφορα κύτταρα-τμήματα των όρχεων καθώς και σε άλλους ιστούς-όργανα με την συμβολή διαφόρων ενζύμων. Το είδος των ανδρογόνων ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα είδη και οι συνηθέστερες μορφές ανδρογόνων που κυριαρχούν είναι η testosterone, η 11-ketotestosterone & η androstendione. Οι εξωγενείς γοναδικές ορμόνες παρεμβαίνουν στους ορμονικούς μηχανισμούς οι οποίοι καθορίζουν στα νεαρά άτομα την ανατομική μορφοποίηση των γεννητικών αδένων. Η εκδήλωση των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου προκύπτει μέσα από ένα πλήθος βιολογικών διεργασιών που είναι μέρος της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς και ικανότητας των γεννητικά ώριμων ιχθύων. Τα χαρακτηριστικά αυτά διαφοροποιούν τα δύο φύλα από τα πρώτα στάδια της ζωής τους και γίνονται όλο και πιο εμφανή κατά την αναπαραγωγική περίοδο.

Σύμφωνα με τον Παπουτσόγλου (1998) στα αρσενικά άτομα των ιχθύων τα χαρακτηριστικά αυτά ελέγχονται και ρυθμίζονται από τα διάφορα είδη ανδρογόνων. Αυτά συμβάλουν:

- ⇒ στις μορφολογικές μεταβολές της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος τους (δέρμα, οφθαλμοί, πτερύγια, χρωματισμός),
- ⇒ στις μορφολογικές μεταβολές των εσωτερικών οργάνων και ιστών,
- ⇒ στη συμπεριφορά των ψαριών.

Τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά των αρσενικών στους μονομάχους είναι ιδιαίτερα εμφανή σε σχέση με τα θηλυκά και αυτή η διαφορά σωματικού μεγέθους δίνει πλεονέκτημα στη διεκδίκηση και κυριαρχία συγκεκριμένου χώρου.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών Εσωτερικών Υδάτων του Τμήματος Ιχθυοκομίας - Αλιείας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου και περιλαμβάνει δύο πειράματα που εκτελέστηκαν σε δυο διαφορετικές χρονικές περιόδους.

Η 1^η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε στις 01/01/2009, είχε διάρκεια 90 ημερών με στόχο την αντιστροφή φύλου του διακοσμητικού ψαριού μονομάχος (*B. splendens*). Για το πρώτο στάδιο του πειράματος (ελεγχόμενη αναπαραγωγή) χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 11 γεννήτορες (6 θηλυκοί & 5 αρσενικοί) ενώ για το στάδιο της εκτροφής των προνυμφών χρησιμοποιήθηκαν 400 προνύμφες.

Η 2^η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε στις 01/05/2009, είχε διάρκεια 92 ημερών και περιλάμβανε την επανάληψη του πρώτου πειράματος επιμηκώνοντας τη χορήγηση ζωντανής τροφής στις προνύμφες λόγω της υψηλής θνησιμότητας που σημειώθηκε τις πρώτες ημέρες διατροφής. Χορηγήθηκε εμπλουτισμένη artemia για 4 επιπλέον ημέρες επιμηκώνοντας έτσι την διάρκεια του απογαλακτισμού. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 12 γεννήτορες (7 θηλυκοί & 5 αρσενικοί) και 450 προνύμφες.

Το πείραμα περιλάμβανε μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού (pH, NO₂, NO₃, NH₃, gH), καθώς και συνεχή παρατήρηση των μονομάχων άμεσα αλλά και έμμεσα με χρήση ασύρματης κάμερας, καθώς η φυσική παρουσία του ανθρώπου επηρεάζει τις θετικές αλληλεπιδράσεις των μονομάχων (Dzieweczynski *et al.*, 2006b).

Ο έλεγχος της επιτυχούς αντιστροφής φύλου πραγματοποιήθηκε μακροσκοπικά λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορά των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των δύο φύλων (μεγαλύτερο μέγεθος σώματος και πτερυγίων των αρσενικών) καθώς και με χρήση στερεοσκοπίου κατά την 8^η εβδομάδα.

2.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 Ενυδρεία & εξοπλισμός

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός ενυδρείων διαφόρων διαστάσεων 2, 12, 15, 100 l. Στα ενυδρεία των 2 l τοποθετήθηκαν οι αρσενικοί γεννήτορες (ο κάθε ένας χωριστά), στο ενυδρείο των 12 l οι θηλυκοί γεννήτορες ενώ τα ενυδρεία των 15 l χρησιμοποιήθηκαν για την ελεγχόμενη αναπαραγωγή. Στο ενυδρείο των θηλυκών γεννητόρων υπήρχε εξωτερικό βιολογικό φίλτρο ενεργού άνθρακα, θερμοστάτης νερού ρυθμισμένος στους 28° C και θερμομέτρο, ενώ στα ενυδρεία των αρσενικών μονομάχων υπήρχε θερμοστάτης νερού ρυθμισμένος στους 28°C και θερμομέτρο.

Για την εκτροφή των προνυμφών έως την αντιστροφή φύλου χρησιμοποιήθηκε γυάλινο τετράγωνο ενυδρείο 100 l στο οποίο υπήρχε βιολογικό ενεργού φίλτρο άνθρακα, θερμοστάτης ρυθμισμένος στους 28° C και θερμομέτρο. Μέσα στο ενυδρείο τοποθετήθηκαν 5 μικροί ιχθυοκλωβοί στους οποίους τοποθετήθηκαν οι προνύμφες.

Μετά από κάθε μετακίνηση των ψαριών σε άλλο ενυδρείο, μετά το άδειασμα, γινόταν απολύμανση των ενυδρείων για την αποφυγή μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ ο πυθμένας των μεγάλων ενυδρείων καθαριζόταν καθημερινά με χρήση σιφονιού. Στην Εικόνα 10 διακρίνεται το ενυδρείο αποκοπής των προνυμφών από τη ζωντανή τροφή το οποίο τέθηκε σε λειτουργία ένα μήνα πριν την τοποθέτηση των προνυμφών.



Εικόνα 10. Ενυδρείο αποκοπής

Ιχθυοκλωβοί

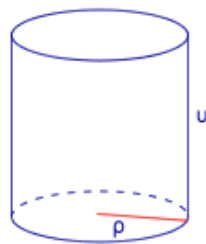
Κατά το 2^ο και κύριο στάδιο του πειράματος (από την επώαση μέχρι την ανάπτυξη των προνυμφών) απαιτήθηκε η χρήση ιχθυοκλωβών. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 5 ιχθυοκλωβοί όγκου ~1,8 l. Μέσα σε αυτούς τοποθετήθηκαν οι νύμφες την 7^η ημέρα ζωής τους. Στην Εικόνα 11 διακρίνονται οι κλωβοί που χρησιμοποιήθηκαν.

Το σύστημα επίπλευσης αποτελούνταν από 4 μέρη εξηλασμένου πολυστηρενίου, ο σκελετός από δικτυωτό πλαστικό, ενώ το δικτυωτό τμήμα αποτελούνταν από πλαστικό πλέγμα με διάμετρο “ματιού” 0,5 mm.



Εικόνα 11. Ιχθυοκλωβοί προνυμφών

Όγκος ιχθυοκλωβών



$$V = \pi \times \rho^2 \times \upsilon$$

$$\pi = 3,14$$

$$\rho = 6,5$$

$$\upsilon = 13,5$$

$$V = 3,14 \times 6,5^2 \times 13,5$$

$$V = 1,7909 \text{ (~1,8l)}$$

Δεξαμενές - δοχεία

Για την ομοιόμορφη θέρμανση του νερού των ενυδρείων 2 l των αρσενικών γεννητόρων χρησιμοποιήθηκε ημιδιαφανής δεξαμενή 80 x 50 x 20 cm. Μέσα σε αυτή ήταν τοποθετημένα τα ενυδρεία των αρσενικών μονομάχων. Εντός της δεξαμενής αυτής υπήρχε θερμοστάτης ρυθμισμένος στους 28° C, θερμόμετρο και πλαστικά διαχωριστικά για την αποφυγή οπτικής επαφής μεταξύ των γεννητόρων. Στην Εικόνα 12 φαίνονται τα μικρά ενυδρεία των αρσενικών μονομάχων εντός της ημιδιαφανής δεξαμενής.



Εικόνα 12. Πλαστικά ενυδρεία αρσενικών μονομάχων

Η προμήθεια νερού σε κάθε ενυδρείο γινόταν από νερό ύδρευσης 2 - 4 ημερών ίδιας θερμοκρασίας που προερχόταν από δοχεία 15 l στα οποία εκτός του θερμοστάτη υπήρχε συνεχής αερισμός με χρήση αεραντλίας Sera air 110. Για την θέρμανση και απομάκρυνση του χλωρίου του νερού ύδρευσης γινόταν διαδοχικά, τοποθέτηση νερού μέσα σε δοχεία 15 l. Μέσα από αυτά γινόταν καθημερινά η παροχή νερού για τις αλλαγές στα ενυδρεία.

Αεραντλίες

Οι αεραντλίες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκκόλαψη της “ζωντανής” τροφής (artemia) και τον αερισμό του νερού ήταν 3, τύπου air 110 της εταιρείας Sera και η δυναμικότητα τους 110 l h⁻¹.

Βιολογικά φίλτρα

Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι βιολογικών φίλτρων:

- ★ εξωτερικό βιολογικό φίλτρο άνθρακα τύπου Niagara 190 &
- ★ εσωτερικό βιολογικό φίλτρο άνθρακα τύπου HAILEA HL-BT 400.

Το εξωτερικό φίλτρο χρησιμοποιήθηκε στο πλαστικό ενυδρείο των θηλυκών γεννητόρων καθώς λόγω της φύσεως του δεν δημιουργεί αυξημένη κίνηση του νερού κάτι που θα προκαλούσε όχληση των ψαριών. Η δυναμικότητα ανακύκλωσης νερού του φίλτρου Niagara 190 ήταν μέχρι 190 l h^{-1} . Το εσωτερικό φίλτρο (HAILEA HL-BT 400) χρησιμοποιήθηκε στο γυάλινο ενυδρείο αποκοπής των προνυμφων και η δυναμικότητα του κυμαίνεται μεταξύ 50 – 110 l, ενώ η ανανέωση του νερού ήταν 5% ημερησίως.

Θέρμανση - ψύξη νερού

Για την θέρμανση του νερού χρησιμοποιήθηκαν 8 θερμοστάτες, όλοι ρυθμισμένοι στους 28°C σε όλα τα στάδια των πειραματικών διαδικασιών. Οι τύποι που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής:

- 👉 1 θερμοστάτης Sera precision 150W δυναμικότητας 75 – 200 lt. για την θέρμανση του νερού του ενυδρείου αποκοπής.
- 👉 1 θερμοστάτης hydor 50W, 265 mm δυναμικότητας 50 l &
- 👉 6 θερμοστάτες Scuba 25W και 50W δυναμικότητας >25 l και >50 l αντίστοιχα.

Κατά την διάρκεια της επανάληψης του πειράματος λόγω της αυξημένης εξωτερικής θερμοκρασίας απαιτήθηκε έλεγχος της θερμοκρασίας στο ίδιο επίπεδο και η ψύξη του επιτεύχθηκε με χρήση mini cooler (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Mini cooler

Χρησιμοποιήθηκαν 5 φορές (ημέρες) 2 ψήκτρες τύπου Cooler master DC 12V 0,14 A, model M802512M για την επίτευξη σταθερής θερμοκρασίας 28° C τους καλοκαιρινούς μήνες (18,19,24,25 & 26/7) εντός του ενυδρείου των νυμφών. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του νερού εκτροφής σε όλα τα ενυδρεία γινόταν καθημερινά με χρήση υδραργυρικού βυθιζόμενου θερμόμετρου.

Φωτισμός

Ο φωτισμός των ενυδρείων ήταν φυσικός, ενώ για την εκκόλαψη της artemia χρησιμοποιήθηκαν 2 λάμπες των 60W.

Κιτ εκκόλαψης *Artemia salina*

Η artemia αποτέλεσε την πρώτη τροφή των προνυμφών και για την εκκόλαψη της χρησιμοποιήθηκε Artemia Breeding Kit της εταιρείας Sera. Η θερμοκρασία εκκόλαψης ήταν μεταξύ 28° C και 30° C, ενώ η διάρκεια της εκκόλαψης κυμάνθηκε μεταξύ 24 και 30 h.

Ζυγαριές ακριβείας

Η ζύγιση της 17 AMT έγινε στο εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Ιχθυοκομίας - Αλιείας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου (Εικόνα 14) με χρήση ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας Mettler Toledo τύπου AB54. Η ζύγιση των τροφών της παρασκευής τροφής με 17 AMT πραγματοποιήθηκε με χρήση ηλεκτρονικής ζυγαριάς Tefal style.



Εικόνα 14. Ζύγιση 17 AMT

2.2.2 Ποιότητα του νερού

Ο έλεγχος των φυσικοχημικών παραμέτρων σε όλα τα στάδια και των δύο πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τον αρχικό πειραματικό σχεδιασμό. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται το χρονοδιάγραμμα των μετρήσεων.

Πίνακας 1. Χρονοδιάγραμμα μετρήσεων

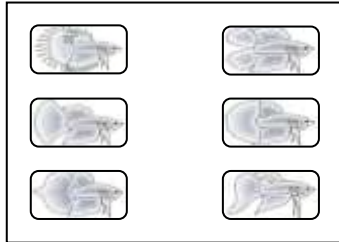
Χρονοδιάγραμμα μετρήσεων			
	Καθημερινά	Κάθε εβδομάδα	
Μέτρηση θερμοκρασίας	✓		
Νεκρά άτομα	✓		
pH		✓	
gH		✓	
NO ₂		✓	
NO ₃		✓	
NH ₃		✓	
Cl			Πριν από κάθε αλλαγή νερού

Για την μέτρηση της ενεργούς οξύτητας (pH), της σκληρότητας (gH) των νιτρωδών (NO₂), νιτρικών (NO₃) & αμμωνίας (NH₃) χρησιμοποιήθηκαν test της εταιρείας Sera, ενώ για τις μετρήσεις χλωρίου (Cl) στο νερό πριν από κάθε αλλαγή γινόταν χρήση strip test της εταιρείας Land & Marine Environmental.

2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΕΚΤΡΟΦΗ ΓΕΝΝΗΤΟΡΩΝ

Ενδρεία αρσενικών μονομάχων (2 l)



Ενδρείο θηλυκών γεννητόρων (12 l)



Διάρκεια εκτροφής γεννητόρων πριν την αναπαραγωγή: 30 ημέρες (28° C)

ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

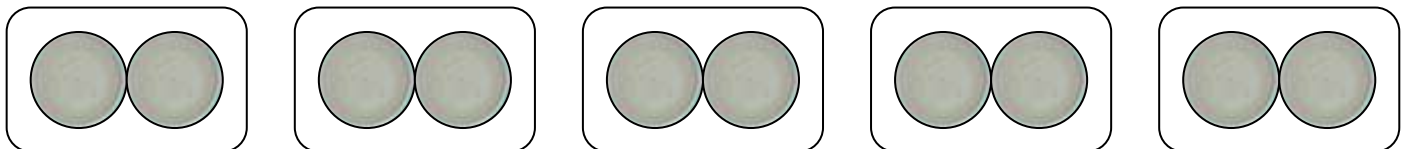
Ενδρεία ελεγχόμενης αναπαραγωγής (15 lt)



Διάρκεια παραμονής γεννητόρων: 3 ημέρες
Διάρκεια ελεγχόμενης αναπαραγωγής: 2-4 ώρες (28° C)

Ωριμα ζευγάρια γεννητόρων

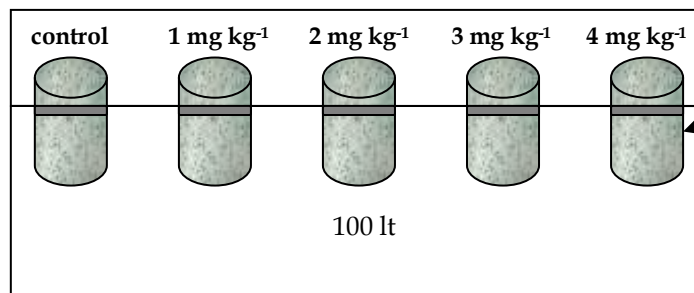
ΕΠΩΑΣΗ ΑΥΤΩΝ - ΕΚΚΟΛΑΨΗ ΤΩΝ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ



Λεκάνες επώασης

Εκκόλαψη των προνυμφών: 30-36 ώρες (28° C)
Διάρκεια απορρόφησης λεκθικού σάκου: 3 ημέρες
Χορήγηση "ζωντανής τροφής": Από την 4^η-6^η ημέρα

ΕΚΤΡΟΦΗ - ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΦΥΛΟΥ



1,8 l
~ 40 προνύμφες/l

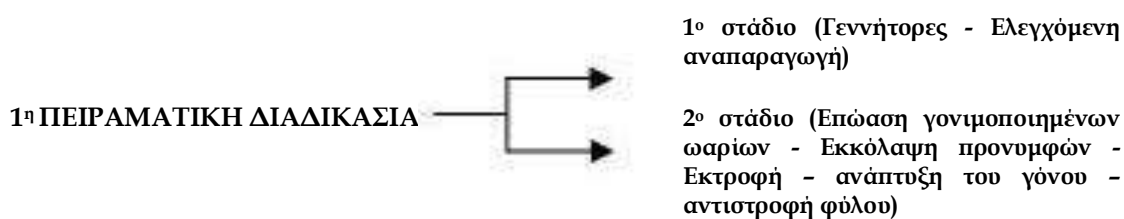
Διάρκεια εκτροφής: 8 εβδομάδες (28° C)

Διάγραμμα 1. Πειραματική διαδικασία

2.4 1^η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

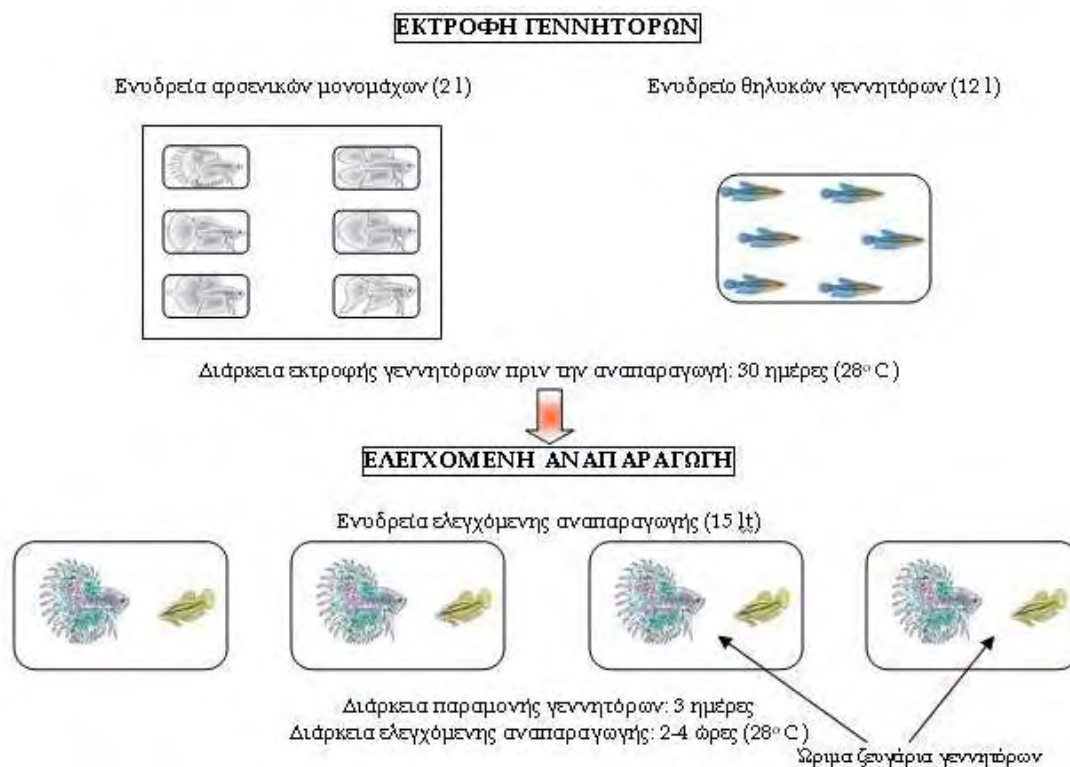
Το πρώτο πείραμα περιλάμβανε 2 κύρια στάδια:

- ① 1^ο στάδιο, από την προμήθεια γεννητόρων μέχρι την ελεγχόμενη αναπαραγωγή.
- ② 2^ο στάδιο, από την επώαση των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι την αντιστροφή φύλου των απογόνων.



2.4.1 1^ο στάδιο (Γεννήτορες - Ελεγχόμενη αναπαραγωγή)

Το 1^ο στάδιο του πειράματος περιλάμβανε την προμήθεια των γεννητόρων μέχρι την ελεγχόμενη αναπαραγωγή (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. 1^ο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας

Γεννήτορες

Οι γεννήτορες που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του 1^{ου} πειράματος προήλθαν από διαφορετικά pet shops της Αθήνας και είχαν διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για την εξασφάλιση μεγαλύτερης ποικιλομορφίας αλλά και αναγνώρισης τους (μαρκάρισμα).

Για την καλύτερη διαχείριση των γεννητόρων και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων έγινε κωδικοποίηση των γεννητόρων-μαρκάρισμα σύμφωνα με τα χρωματικά τους πρότυπα (Πίνακες Π.1 & Π.2 του παραρτήματος).

Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί παρουσιάζεται το χρονοδιάγραμμα των χειρισμών που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 2. Χρονοδιάγραμμα απαιτούμενων ενεργειών στον χειρισμό των γεννητόρων και προνυμφών

Χρονοδιάγραμμα ενεργειών				
	Καθημερινά	Κάθε εβδομάδα	Κάθε μήνα	Όποτε κρινόταν αναγκαία
Διατροφή γεννητόρων	2 φορές			
Διατροφή προνυμφών	4 - 6 φορές			✓
Σιφόνι	✓			
Μπάνιο με NaCl				✓

Δύο ημέρες μετά την παραλαβή των γεννητόρων έγινε προληπτικά, “μπάνιο” με NaCl (~4 ppt) για 5’ (<http://swishfish.com/anatomy.shtml>). Στη συνέχεια, οι αρσενικοί μονομάχοι τοποθετήθηκαν σε πλαστικά ενυδρεία 2 l. Τα ενυδρεία αυτά τοποθετήθηκαν μέσα σε πλαστική τετράγωνη δεξαμενή μεγέθους 80 x 50 x 20, με παρουσία θερμοστάτη δυναμικότητας 50W, και υδραργυρικού βυθιζόμενου θερμομέτρου.

Οι θηλυκοί μονομάχοι τοποθετήθηκαν σε πλαστικό ενυδρείο 12 lt. που περιείχε θερμοστάτη τύπου Scuba 25W ρυθμισμένο στους 28° C, εξωτερικό βιολογικό φίλτρο Niagara 190 καθώς και υδραργυρικό βυθιζόμενο θερμομέτρο.

Για τη διατροφή των γεννητόρων χρησιμοποιήθηκαν τεσσάρων ειδών τροφές, pellets (F1), flakes (F2), bloodworms (F3) & tubifex (F4), διαφορετικών εταιρειών. Η διατροφή γινόταν 2 φορές ημερησίως, το πρωί και το μεσημέρι. Οι τρεις πρώτες τροφές (F1, F2 & F3) χορηγούνταν 2 φορές εβδομαδιαίως και η τροφή F4 (tubifex) 1 φορά την εβδομάδα (“εμπειρικό πρωτόκολλο”). Στους Πίνακες Π.3 & Π.4 του Παραρτήματος παρουσιάζονται τα διατροφικά στοιχεία και η σύσταση των χορηγούμενων τροφών των γεννητόρων αντίστοιχα όπως επίσης το ημερολογιακό πρόγραμμα διατροφής των γεννητόρων.

Ελεγχόμενη αναπαραγωγή

Για τις ανάγκες της ελεγχόμενης αναπαραγωγής επιλέχθηκαν 4 ώριμοι αρσενικοί μονομάχοι και τοποθετήθηκαν σε 4 διαφορετικά πλαστικά ενυδρεία των 15 l. Μέσα σε αυτά τοποθετήθηκαν πλαστικά σπιράλ για την διευκόλυνση του αρσενικού στο σχηματισμό φωλιάς φυσαλίδων καθώς και για τη χρήση τους ως καταφύγιο.

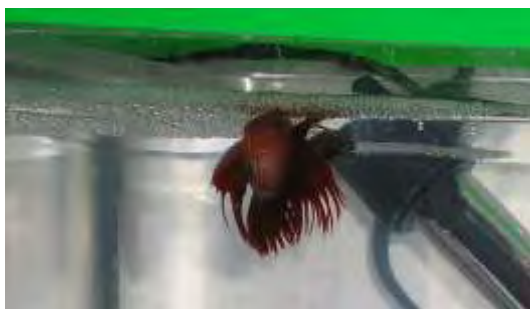
Την 3^η ημέρα τοποθετήθηκαν σε κάθε ενυδρείο αναπαραγωγής αντίστοιχα ένας θηλυκός μονομάχος μέσα σε διάφανο πλαστικό ποτήρι το οποίο επέπλεε μέσα στο ενυδρείο. Η χρήση αυτού του μέσου έγινε για την εξοικείωση των δύο φύλων μεταξύ τους (δράση φερομόνων) και την αποφυγή μαχών (Εικόνα 15). Το διάφανο πλαστικό ποτήρι είχε μικρές τρύπες στον πυθμένα για επικοινωνία του νερού, ενώ η απομάκρυνση του γινόταν μόλις το θηλυκό έβγαине μόνο του έξω από αυτό.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σκίαστρα γύρω από τα ενυδρεία για να μην υπάρχει οπτική επαφή με άλλους μονομάχους κάτι που θα οδηγούσε στην αύξηση της επιθετικότητας των γεννητόρων (Matos *et al.*, 2003), ενώ η παρακολούθηση των ζευγαριών πραγματοποιούνταν με χρήση κάμερας τύπου JMK, μέσω Η/Υ.



Εικόνα 15. Ενυδρείο αναπαραγωγής

Με την ολοκλήρωση της “φωλιάς” φυσαλίδων από το αρσενικό και όταν το θηλυκό ήταν έτοιμο, πραγματοποιούνταν η αναπαραγωγή (εξωτερική) η οποία είχε διάρκεια 2 - 4 ωρών (Εικόνα 16). Μετά το πέρας αυτής γινόταν απομάκρυνση του θηλυκού από το ενυδρείο αναπαραγωγής και μεταφορά του στο ενυδρείο των θηλυκών γεννητόρων διότι τα αρσενικά γίνονται ιδιαίτερα επιθετικά προς κάθε εισβολέα μετά τη γονιμοποίηση των ωαρίων (Jaroensutasinee M. & Jaroensutasinee K., 2003). Η απομάκρυνση του αρσενικού γινόταν 30 λεπτά αργότερα γιατί συνέβαλε στον σχηματισμό φυσαλίδων στην επιφάνεια του νερού για την οξυγόνωση των γονιμοποιημένων ωαρίων (Εικόνα 17). Κατά την ελεγχόμενη αναπαραγωγή της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε συγχρονισμός (αναπαραγωγή την ίδια χρονική περίοδο) στα δύο από τα τέσσερα ζευγάρια.



Εικόνα 16. Ζευγάρι μονομάχων κατά την αναπαραγωγή

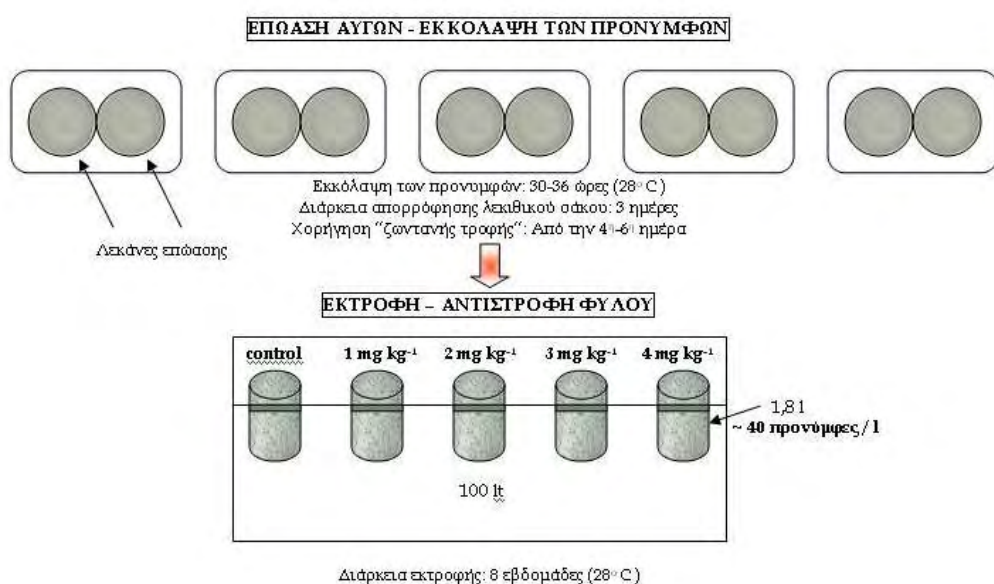


Εικόνα 17. Δημιουργία φυσαλίδων από αρσενικό μονομάχο

Μετά την απομάκρυνση του αρσενικού μονομάχου και με την χρήση πλαστικών λεκανών γινόταν συλλογή των φυσαλίδων μαζί με τα γονιμοποιημένα ωάρια και αυτά τοποθετούνταν σε λεκάνες μέσα στο ίδιο ευυδρείο. Μέσα σε αυτές γινόταν η επώαση των γονιμοποιημένων ωαρίων.

2.4.2 2^ο στάδιο (Επώαση γονιμοποιημένων ωαρίων - Εκκόλαψη προνυμφών - Εκτροφή - ανάπτυξη του γόνου - αντιστροφή φύλου)

Το 2^ο στάδιο του πειράματος περιλάμβανε την επώαση των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι την αντιστροφή φύλου των απογόνων. (Διάγραμμα 3.)



Διάγραμμα 3. 2^ο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας

Επώαση γονιμοποιημένων ωαρίων

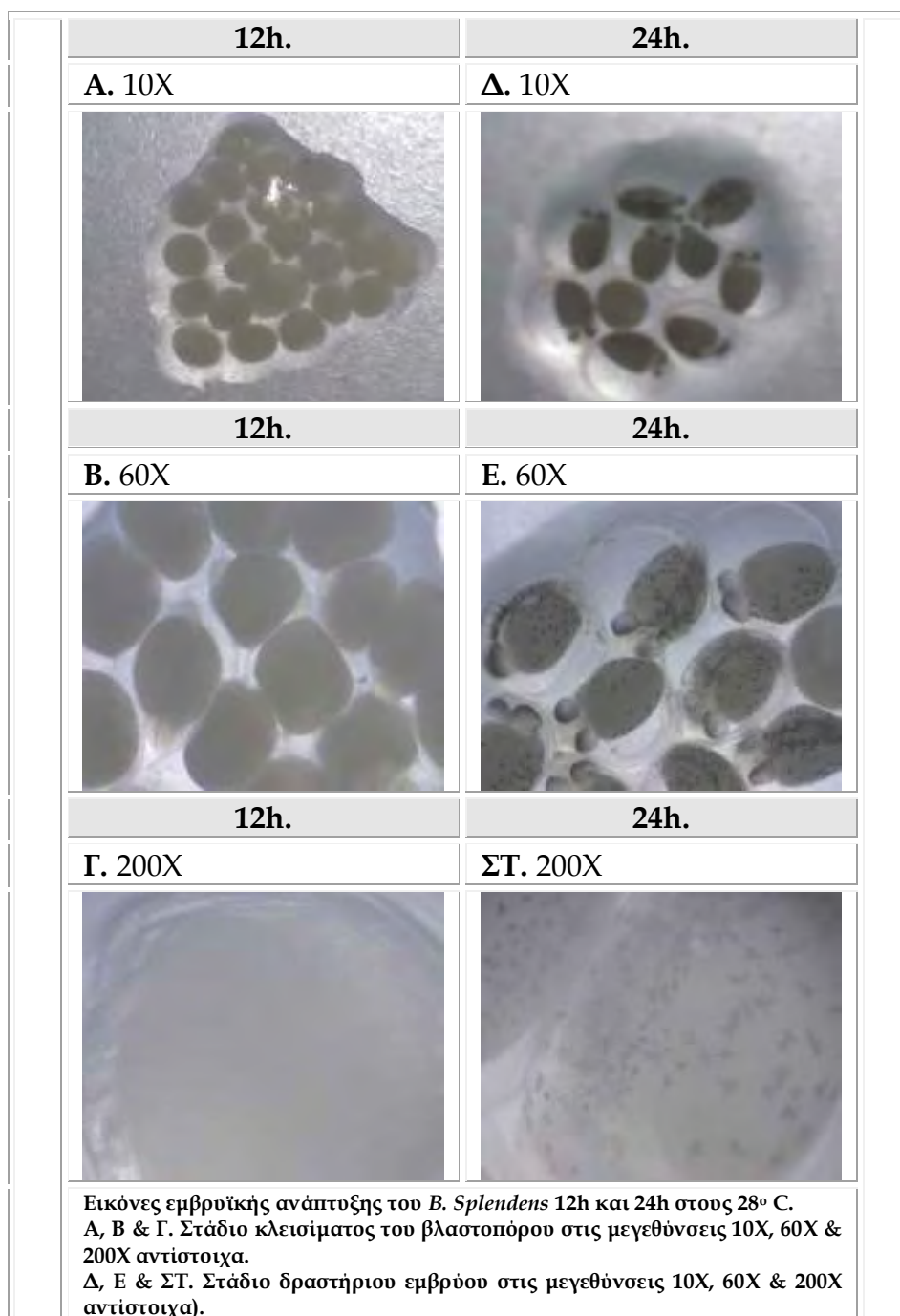
Η επώαση λάμβανε χώρα μέσα στις μικρές λεκάνες επώασης 1 – 1,5 l σε θερμοκρασία 28° C. (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Λεκάνες επώασης

Στην Εικόνα (Α-ΣΤ) που ακολουθεί παρουσιάζονται τα διαδοχικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου Traveler USB της κατασκευάστριας εταιρείας SUPRA GmbH, ενώ η επεξεργασία των εικόνων με την βοήθεια των λογισμικών Ulead VideoStudio 7 SE VCD και Howies's Quick Screen Capture.

Εικόνα Α - ΣΤ. Στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης 12h & 24h




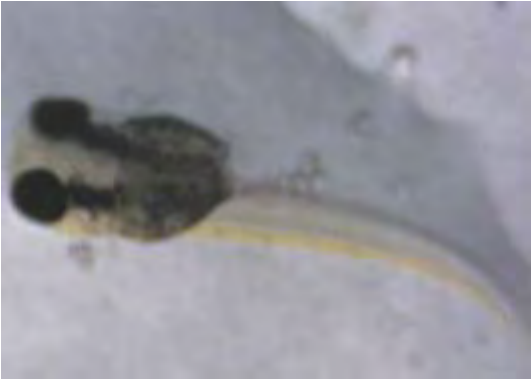

Εκκόλαψη προνυμφών

Η εκκόλαψη των γονιμοποιημένων γινόταν μέσα στις μικρές λεκάνες επώασης 1 - 1,5 l σε 30 - 36 ώρες σε θερμοκρασία 28° C (Jaroensutasinee M. & Jaroensutasinee K., 2003). Μία πολύ σημαντική διαδικασία σε αυτό το στάδιο ήταν η επαρκής οξυγόνωση των προνυμφών, ως εκ τούτου, για την διευκόλυνση ανόδου τους προς την επιφάνεια με σκοπό την λήψη οξυγόνου, η στάθμη του νερού διατηρήθηκε χαμηλή <10 cm. Επίσης η χρήση των μικρών πλαστικών μέσων εξασφάλισε καλύτερη διαχείριση και έμμεση επαφή με το νερό του ενυδρείου αναπαραγωγής. Η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου είχε διάρκεια 3 ημερών πάντοτε σε θερμοκρασία 28°C. Στην Εικόνα 19 διακρίνονται νεοεκκολαφθείσες προνύμφες σε μεγέθυνση 10X και στην Εικόνα (Α-Γ) που ακολουθεί φαίνονται τα διαφορετικά στάδια απορρόφησης του λεκιθικού σάκου.



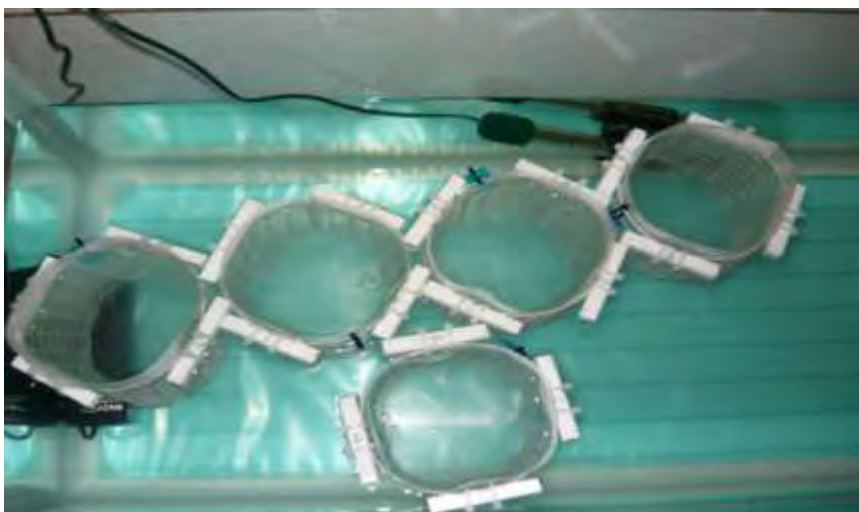
Εικόνα 19. Νεοεκκολαφθείσες προνύμφες σε μεγέθυνση 10X ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Εικόνα Α-Γ. Λεκιθοφόρες προνύμφες κατά την 1^η – 3^η ημέρα

<p>A.</p>	<p>Νεοεκκολαφθείσα προνύμφη (60X)</p>		
<p>B.</p>	<p>Προνύμφη κατά την 2^η ημέρα (60X)</p>		
<p>Γ.</p>	<p>Προνύμφη κατά την 3^η ημέρα (60X)</p>		
<p>Εικόνες λεκιθοφόρων προνυμφών του <i>B. splendens</i> 1 – 3^η ημέρα στους 28° C.</p> <p>A. Η νεοεκκολαφθείσα προνύμφη έχει μεγάλο λεκιθικό σάκο, ενώ τα μάτια της είναι άχρωμα. Το μεγαλύτερο διάστημα παραμένει προσκολλημένη στα τοιχώματα, πραγματοποιεί κατακόρυφες μετακινήσεις ενώ δεν αντιδρά σε ερεθίσματα.</p> <p>B. Κατά την 2^η ημέρα παρουσιάζεται μείωση του λεκιθικού σάκου και ανάπτυξη μικρών καφέ χρωστικών κηλίδων γύρω από τα μάτια, το πεπτικό σύστημα αρχίζει να διαφοροποιείται, ενώ προνύμφη αντιδρά στις άμεσες επιθέσεις.</p> <p>Γ. Κατά την 3^η ημέρα έχει μείνει ένα μικρό μόνο μέρος του λεκιθικού σάκου. Ο χρωματισμός του σώματος γίνεται πιο σκούρος, ενώ το χρώμα των ματιών έχει γίνει μαύρο, ενώ το πεπτικό σύστημα συνεχίζει να εξελίσσεται. Τα εσωτερικά όργανα διακρίνονται καλύτερα ενώ το πεπτικό σύστημα συνεχίζει να εξελίσσεται συνεχώς.</p>			

Εκτροφή - ανάπτυξη του γόνου - αντιστροφή φύλου

Μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, για λόγους υγιεινής, έγινε μεταφορά των νυμφών σε νέες μικρές πλαστικές λεκάνες ίδιες με αυτές της επώασης. Η διατροφή των προνυμφών ξεκίνησε την 4^η ημέρα με χορήγηση ναυπλίων *artemia*, ενώ την 7^η ημέρα έγινε μεταφορά των προνυμφών στο γυάλινο ενυδρείο των 160 l. (πληρότητα νερού 100 l) και τοποθέτηση τους μέσα σε ιχθυοκλωβούς (Εικόνα 20). Την ίδια ημέρα ξεκίνησε παράλληλα και η χορήγηση συνθετικής τροφής.



Εικόνα 20. Πλαστικοί ιχθυοκλωβοί προνυμφών

Διατροφή

Για τις ανάγκες του πειράματος η χορήγηση των ορμονών έγινε μέσω της τροφής. Ως εκ τούτου κρίθηκε απαραίτητο η έναρξη χορήγησης της ορμόνης να γίνει όσο το δυνατόν πιο άμεσα με την πρώτη διατροφή (Πάσχος, 2004). Για την διατροφή των νυμφών χρησιμοποιήθηκαν πέραν της “ζωντανής” τροφής, δύο διαφορετικού διαμετρήματος και σύστασης συνθετικές τροφές στις οποίες ενσωματώθηκε η ορμόνη 17 AMT σε συγκεντρώσεις: 1, 2, 3, 4 mg kg⁻¹ & καθώς και η ομάδα των “μαρτύρων” με απουσία ορμόνης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε τροφή CLASSIC AAF-F (S1) και μετά την 30^η ημέρα LUCKY STAR 2 (S2). Στον Πίνακα Π.5 του Παραρτήματος παρουσιάζονται τα διατροφικά στοιχεία των χρησιμοποιούμενων τροφών των προνυμφών καθώς και το ημερολογιακό πρόγραμμα διατροφής των γεννητόρων.

2.4.3 Διαδικασία παρασκευής τροφής με 17 AMT

Η διαδικασία για την παρασκευή τροφής με 17 AMT πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται στην ιριδιζουσα πέστροφα (Chantzaropoulos *et al.*, 2007). Πιο αναλυτικά, έγινε παρασκευή του stock solution (A) ως εξής:

- ✓ Σε 100 ml αιθανόλης (95-99%) προστέθηκαν 0,3 g 17 AMT. Ύστερα από ελαφρά ανάδευση έγινε συντήρηση του stock solution σε θερμοκρασία 4° C.
- ✓ Στη συνέχεια ζυγίστηκαν οι 2 διαφορετικοί τύποι τροφών CLASSIC AAF-F & LUCKY STAR 2 και μοιράστηκαν ισόποσα (300 g.) σε 10 διαφορετικά δοχεία.
- ✓ Έπειτα, σύμφωνα με τον Πίνακα 3 που ακολουθεί έγινε προσθήκη της ανάλογης ποσότητας του διαλύματος A, στην τροφή με την βοήθεια μικρού ψεκαστικού μέσου.
- ✓ Μετά την ενσωμάτωση της τροφής με την ορμόνη, αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία 25° C για 12 ώρες.

Μετά την πάροδο των 12 ωρών έγινε κοσκίνισμα και αποθήκευση των τροφών.

Πίνακας 3. Ποσότητα τροφής και συγκέντρωση ορμόνης

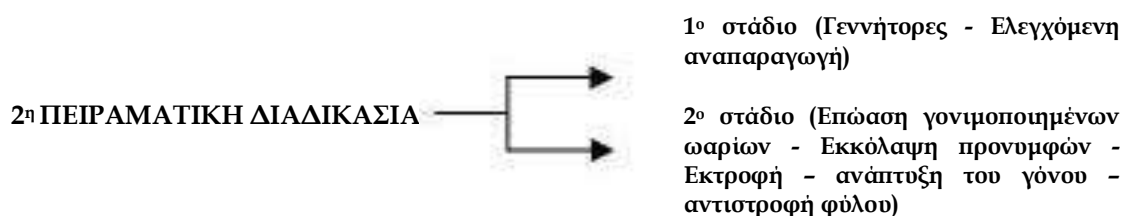
Διάλυμα A	90% αιθανόλη	Ποσότητα τροφής	Τελική συγκέντρωση 17 AMT στην τροφή (mg Kg ⁻¹)
0,1 ml	68,9 ml	300 g	1 mg 17 AMT Kg ⁻¹ τροφής
0,2 ml	68,8 ml	300 g	2 mg 17 AMT Kg ⁻¹ τροφής
0,3 ml	68,7 ml	300 g	3 mg 17 AMT Kg ⁻¹ τροφής
0,4 ml	68,6 ml	300 g	4 mg 17 AMT Kg ⁻¹ τροφής

2.5 2^η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σκοπός της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας ήταν η βελτίωση της παραγωγικής διαδικασίας με την χορήγηση εμπλουτισμένης “ζωντανής” τροφής για 4 επιπλέον ημέρες σε σχέση με την 1^η πειραματική διαδικασία. Επίσης αυξήθηκε ο αριθμός των γεννητόρων και ο αριθμός των προνυμφών.

Όπως και στο πρώτο πείραμα, έτσι και το δεύτερο περιλάμβανε 2 κύρια στάδια:

- ☉ Το 1^ο στάδιο που είχε ως αφετηρία την προμήθεια των γεννητόρων μέχρι την ελεγχόμενη αναπαραγωγή &
- ☉ το 2^ο στάδιο, από την επώαση των γονιμοποιημένων ωαρίων μέχρι την αντιστροφή φύλου των απογόνων.



2.5.1 1^ο στάδιο (Γεννήτορες - Ελεγχόμενη αναπαραγωγή)

Γεννήτορες

Για τις ανάγκες του 2^{ου} πειράματος χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί γεννήτορες που προήλθαν από pet shops της Αθήνας και της Πάτρας. Όπως και το 1^ο πείραμα επιλέχθηκαν υγιείς γεννήτορες με διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για την εξασφάλιση μεγαλύτερης ποικιλομορφίας αλλά και εύκολης αναγνώρισης τους.

Ελεγχόμενη αναπαραγωγή

Η ελεγχόμενη αναπαραγωγή του 2^{ου} πειράματος πραγματοποιήθηκε όμοια με αυτή του 1^{ου} πειράματος με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 12 νέοι γεννήτορες (7 θηλυκοί & 5 αρσενικοί), ενώ επιτεύχθηκε ο συγχρονισμός (αναπαραγωγή την ίδια χρονική περίοδο) ελεγχόμενης αναπαραγωγής στα τρία από τα πέντε ζευγάρια. Ο συγχρονισμός της αναπαραγωγής ήταν πολύ σημαντικός για την εξασφάλιση ίδιας ηλικίας προνυμφών πριν την έναρξη του 2^{ου} σταδίου.

2.5.2 2^ο στάδιο (Επώαση γονιμοποιημένων ωαρίων - Εκκόλαψη προνυμφών - Εκτροφή – ανάπτυξη του γόνου - αντιστροφή φύλου)

Η επώαση των γονιμοποιημένων ωαρίων και εκκόλαψη των προνυμφών πραγματοποιήθηκε ομοίως με την 1^η πειραματική διαδικασία.

Εκτροφή – ανάπτυξη του γόνου – αντιστροφή φύλου

Την 4^η ημέρα έγινε μεταφορά των νυμφών για λόγους υγιεινής σε νέες μικρές πλαστικές λεκάνες ίδιες με αυτές της επώασης. Η διατροφή τους ξεκίνησε στα μέσα της ίδιας ημέρας με πρώτη τροφή εμπλουτισμένους μεταναύπλιους artemia, ενώ την 7^η ημέρα έγινε μεταφορά των νυμφών στο γυάλινο ενυδρείο 160 l (πληρότητα νερού 100 l). Κατά την 2^η πειραματική διαδικασία εντός των ιχθυοκλωβών τοποθετήθηκαν 450 προνύμφες (5 x 90).

Διατροφή

Ο εμπλουτισμός έγινε με εμπλουτιστικό Red Pepper της εταιρίας Bernaqua (Εικόνα 21) καθώς οι απαιτήσεις των προνυμφών των ψαριών είναι μεγαλύτερες από των ενηλίκων τόσο σε πρωτεΐνες αλλά και σε λιπαρά οξέα (Κωλέττας, 1998). Την 6^η ημέρα ξεκίνησε παράλληλα χορήγηση ξηράς τροφής CLASSIC AAF-F (S1) ενώ την επόμενη ημέρα άρχισε η χορήγηση CLASSIC AAF-F σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις 17 AMT. Η σίτιση πραγματοποιούνταν 4 – 6 φορές ημερησίως ενώ την 31^η ημέρα ξεκίνησε η χορήγηση τροφής μεγαλύτερου διαμετρήματος τύπου LUCKY STAR 2 (S2).



Εικόνα 21. Εμπλουτιστικό “ζωντανής τροφής” Red Pepper

2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα των διάφορων παραμέτρων που προέκυψαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων αναλύθηκαν στατιστικά με την χρήση του στατιστικού πακέτου Minitab 12.0 και τη βοήθεια του προγράμματος λογιστικών φύλλων (Excel, 2003) της εταιρείας Microsoft. Υπάρχουν διάφοροι post hoc έλεγχοι, στην παρούσα εργασία μεταξύ των αποτελεσμάτων θνησιμότητας και αντιστροφής φύλου των ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Tukey test (t-test) το οποίο θεωρείται ευρέως αποδεκτό και χρησιμοποιείται στις βιολογικές μελέτες. Σε όλες τις στατιστικές αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας που επιλέχθηκε είναι το $p = 0,05$. Για την στατιστική σύγκριση μεταξύ των αντίστοιχων ομάδων των δυο πειραματικών διαδικασιών, εφαρμόστηκε one-way ANOVA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΕΚΤΡΟΦΗΣ

3.1.1 Γενικά

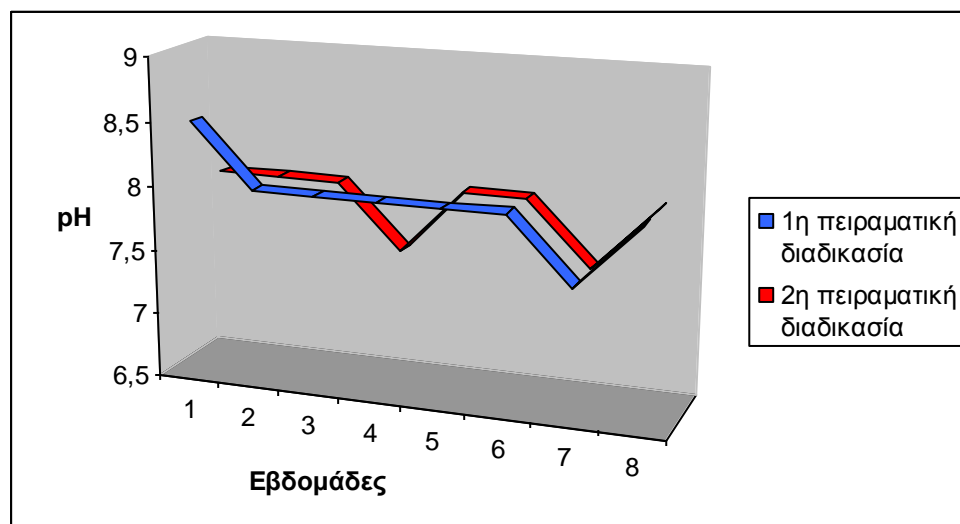
Τα κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού εκτροφής παρακολούθηθηκαν σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Η αλατότητα ήταν σταθερή σε επίπεδα πόσιμου νερού ενώ ο κορεσμός του οξυγόνου εκτροφής δεν παρακολούθηθηκε μιας και το εν λόγω είδος δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις οξυγόνου μέσω του νερού εκτροφής. Παρακάτω ακολουθούν αναλυτικά όλα εκείνα τα αποτελέσματα των μετρήσεων των χαρακτηριστικών του νερού εκτροφής, ενώ στους Πίνακες Π.6 & Π.7 του Παραρτήματος παρουσιάζονται τα εβδομαδιαία αποτελέσματα των μετρήσεων του νερού εκτροφής των προνυμφών

3.1.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία των γεννητόρων αλλά και των προνυμφών παρέμεινε σταθερή στους **28°C** καθ' όλη την διάρκεια των δύο πειραματικών διαδικασιών.

3.1.3 pH

Οι μετρήσεις του pH εντός του ενυδρείου εκτροφής των νυμφών γινόταν κάθε εβδομάδα. Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών.

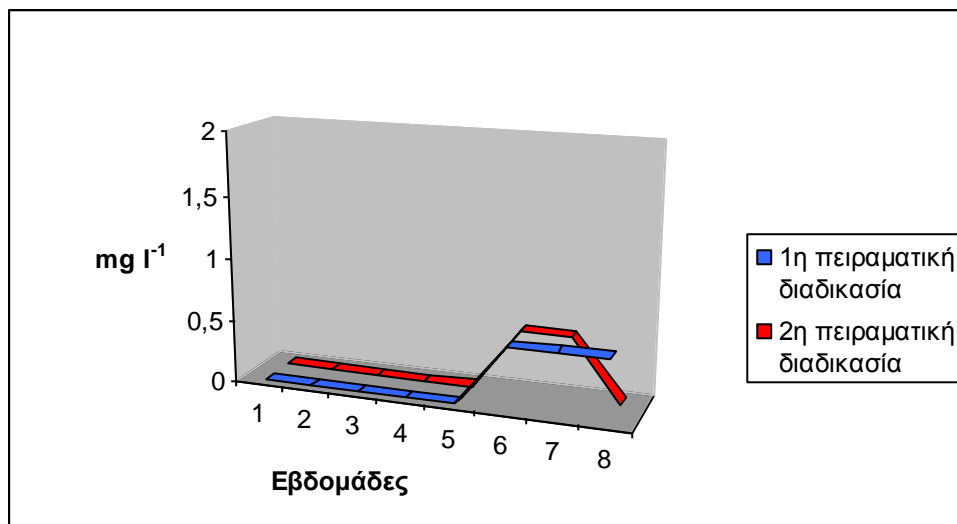


Διάγραμμα 4. Αποτελέσματα μετρήσεων pH

Όπως διακρίνεται στο παραπάνω Διάγραμμα οι τιμές του pH κυμάνθηκαν μεταξύ 7,5-8,5.

3.1.4 NO₂

Οι μετρήσεις των νιτρωδών στο νερό εκτροφής των νυμφών γινόταν κάθε εβδομάδα. Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών.

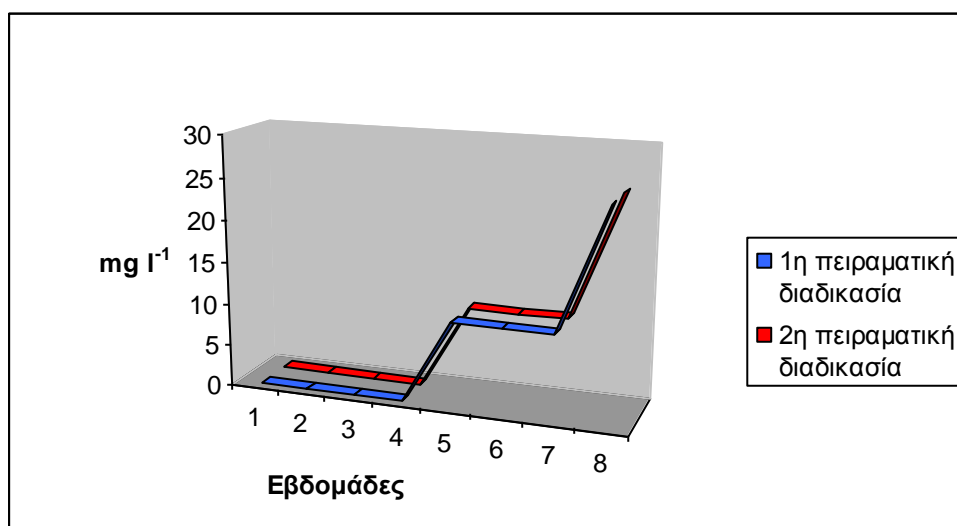


Διάγραμμα 5. Αποτελέσματα μετρήσεων NO₂ (mg l⁻¹)

Η τιμές των νιτρωδών (NO₂) είχαν παρόμοια κλιμάκωση ανάμεσα στις δύο πειραματικές διαδικασίες με μοναδική διαφορά τη μέτρηση της 8^{ης} εβδομάδας που η τιμή της 1^{ης} πειραματική διαδικασία παρέμεινε στο 0,5 mg l⁻¹ ενώ η αντίστοιχη μέτρηση της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας ήταν μηδενική. Η αύξηση των νιτρωδών σημειώθηκε μετά την 6^η εβδομάδα.

3.1.5 NO₃

Στο παρακάτω Διάγραμμα 6 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των νιτρικών στο νερό εκτροφής των νυμφών. Οι μετρήσεις αφορούν το σύνολο των 8 εβδομάδων της κάθε πειραματικής διαδικασίας.

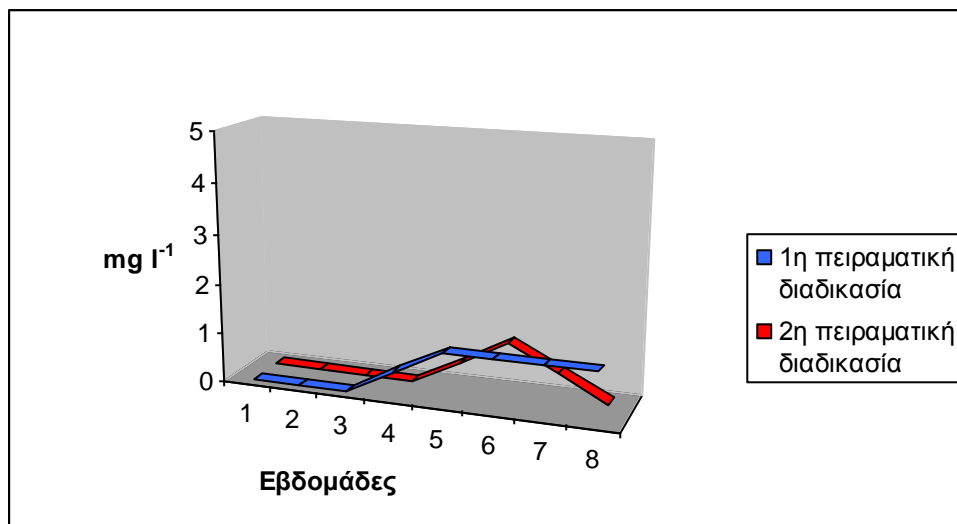


Διάγραμμα 6. Αποτελέσματα μετρήσεων NO₃

Η τιμές των νιτρικών (NO₃) παρουσίασαν ίδια αποτελέσματα μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών, ενώ την τελευταία εβδομάδα το επίπεδο τους έφτασε τα 25mg l⁻¹. Η αύξηση στην τιμή των νιτρικών σημειώθηκε την 5^η εβδομάδα και κορυφώθηκε την 8^η εβδομάδα.

3.1.6 NH₃

Ομοίως με τις υπόλοιπες μετρήσεις, οι μετρήσεις της αμμωνίας γινόταν κάθε εβδομάδα. Στο Διάγραμμα 7 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα των δύο πειραματικών διαδικασιών.

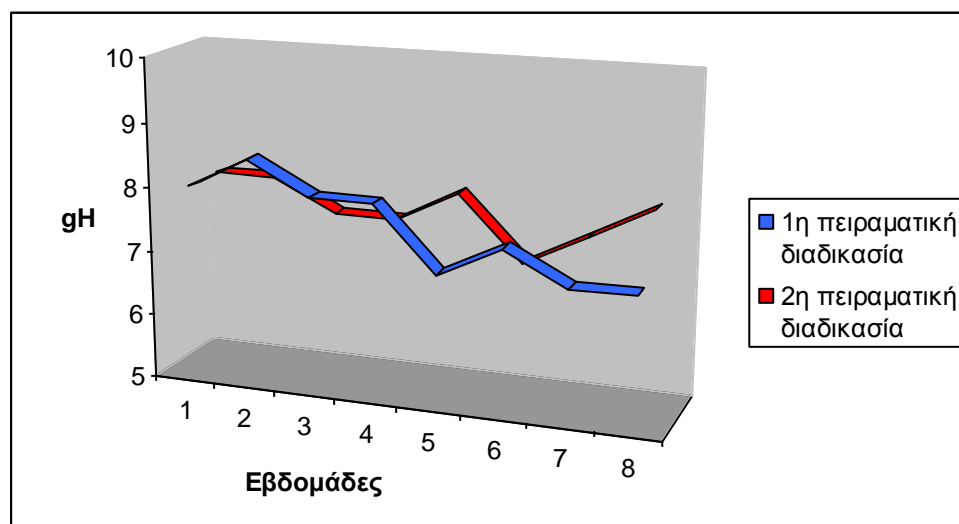


Διάγραμμα 7. Αποτελέσματα μετρήσεων NH₃

Η τιμές της αμμωνίας (NH₃) παρουσίασαν μικρή διαφορά μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών. Την τελευταία εβδομάδα της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας η τιμή της αμμωνίας παρέμεινε στο 1mg l⁻¹, ενώ, κατά την 2^η πειραματική διαδικασία μετά την 6^η εβδομάδα είχε πτωτική τάση.

3.1.7 gH

Στο Διάγραμμα 8 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα της σκληρότητας του νερού μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών.



Διάγραμμα 8. Αποτελέσματα μετρήσεων gH

Το εύρος της σκληρότητας μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών σημείωσε μικρή διαφορά και κυμάνθηκε μεταξύ 7-8,5 κατά την 1^η πειραματική διαδικασία και μεταξύ 7-8 κατά την 2^η πειραματική διαδικασία.

Επίσης, τα επίπεδα των ιόντων Cl^{-1} και στις δύο πειραματικές διαδικασίες ήταν μηδενικά.

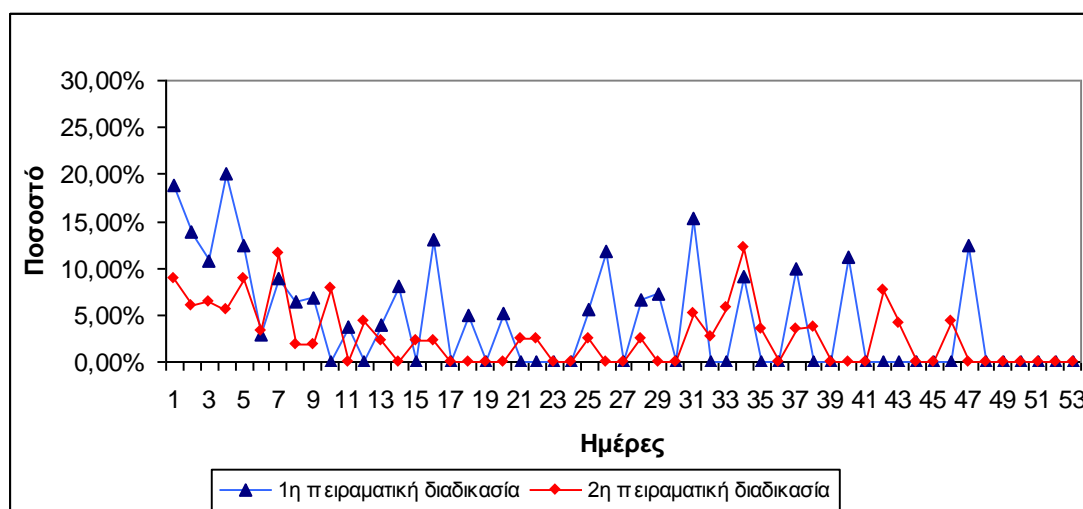
3.2 ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Οι παράμετροι οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν τα ποσοστά θνησιμότητας σε όλα τα στάδια και τα ποσοστά αντιστροφής φύλου ανάμεσα στις πέντε ομάδες. Τα νεκρά άτομα ήταν μικρότερα σε μέγεθος, αδύνατα και από τον 1^ο μήνα κι έπειτα κανιβαλισμένα ή φαγωμένα αφότου πέθαναν.

Ακολουθούν συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων των δύο πειραματικών διαδικασιών. Με γαλάζιο χρώμα εμφανίζονται τα αποτελέσματα της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας ενώ με κόκκινο τα αποτελέσματα της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας όπου χορηγήθηκαν ναύπλιοι εμπλουτισμένης artemia για 4 επιπλέον ημέρες.

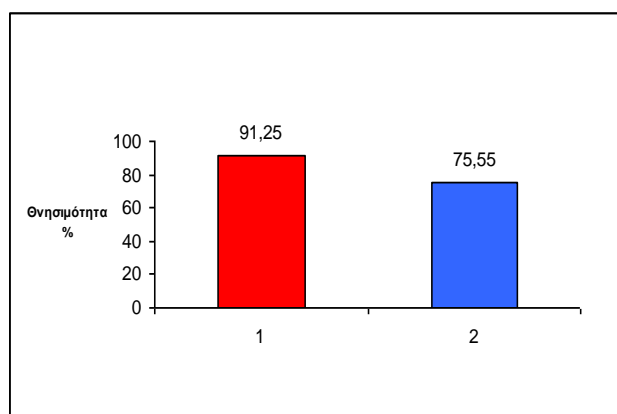
Θνησιμότητα των Ομάδων A0 & A0 b (“μάρτυρες”)

Η θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων του “μάρτυρα” (A0 & A0 b) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9. Θνησιμότητα των Ομάδων A0 & A0 b (“μάρτυρες”)

Από το παραπάνω Διάγραμμα προκύπτει μεγαλύτερη θνησιμότητα κατά την 1^η πειραματική διαδικασία με εμφανή στοιχεία κλιμάκωσης σε σχέση με την 2^η πειραματική διαδικασία που εμφάνισε χαμηλότερα ποσοστά και τάσεις αποκλιμάκωσης, με εξαίρεση τα αποτελέσματα κυρίως μεταξύ της 31^{ης}-34^{ης} ημέρας.

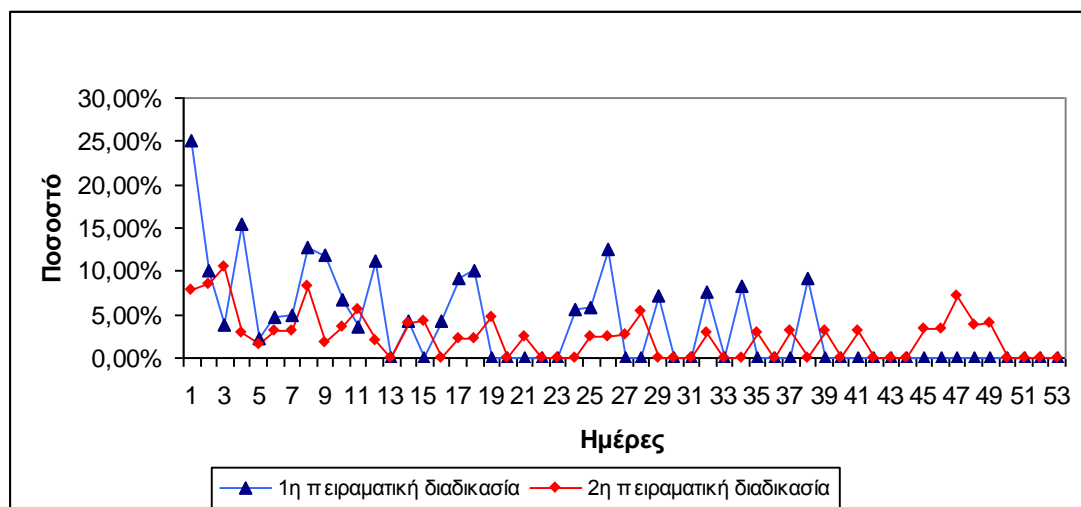


Διάγραμμα 10. Θνησιμότητα των Ομάδων A0 & A0 b (“μάρτυρες”)

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10 μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών το ποσοστό της θνησιμότητας μεταξύ των δύο ομάδων των “μάρτυρων” A0 & A0 b ήταν 91,25% έναντι 75,55% αντίστοιχα.

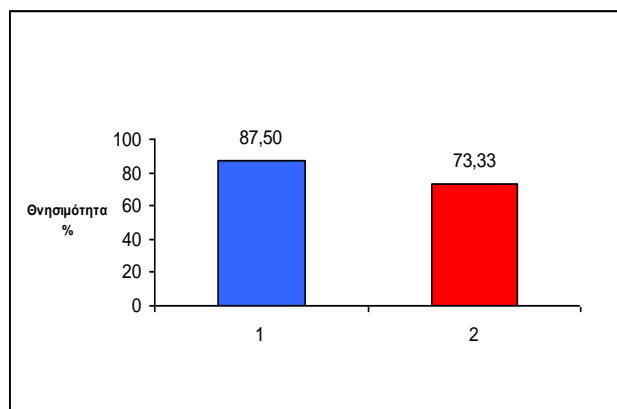
Θνησιμότητα των ομάδων A1 & A1 b

Η θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων (A1 & A1 b) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11.



Διάγραμμα 11. Θνησιμότητα των Ομάδων A1 & A1 b

Από τα αποτελέσματα του γραφήματος παρουσιάζεται εμφανώς μεγαλύτερη θνησιμότητα κατά την 1^η πειραματική διαδικασία κυρίως κατά την διάρκεια των πρώτων τεσσάρων εβδομάδων, ενώ κατά την 2^η πειραματική διαδικασία εμφανίζονται χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας.

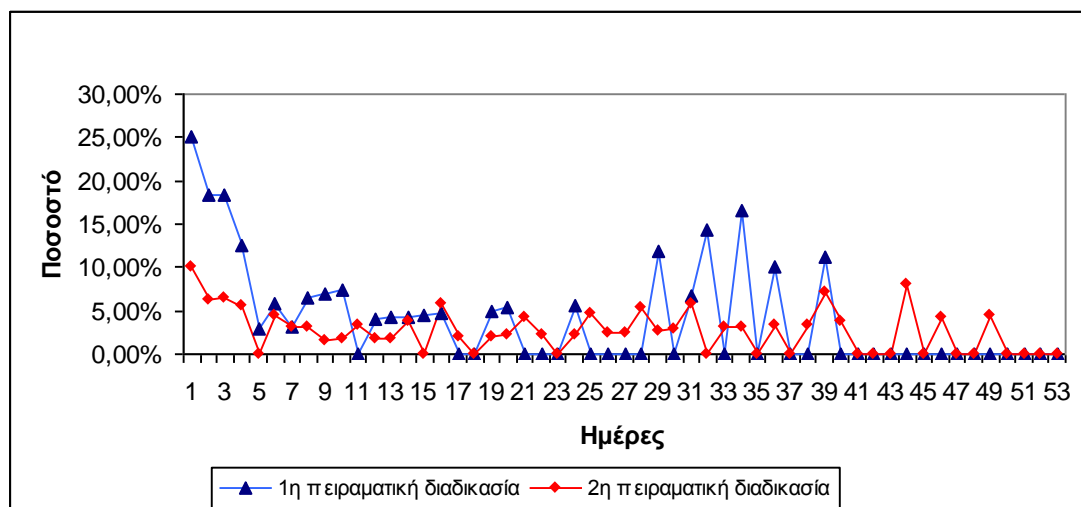


Διάγραμμα 12. Θνησιμότητα των Ομάδων A1 & A1 b

Όπως διακρίνεται στο Διάγραμμα 12 μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών το ποσοστό της θνησιμότητας μεταξύ των δύο ομάδων A1 & A1b ήταν 87,5% και 73,33% αντίστοιχα.

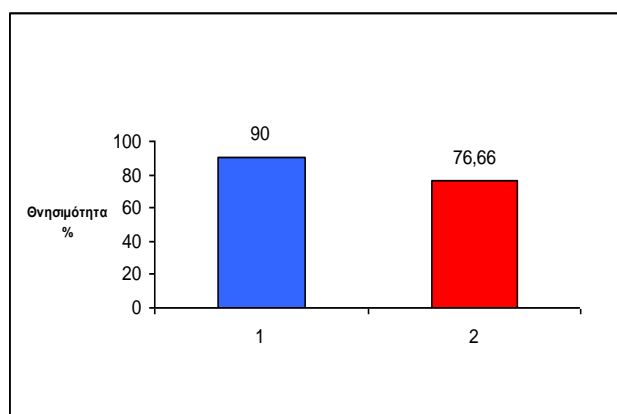
Θνησιμότητα των ομάδων A2 & A2 b

Η θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων (A2 & A2 b) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 13.



Διάγραμμα 13. Θνησιμότητα των Ομάδων A2 & A2 b

Στο παραπάνω Διάγραμμα μεταξύ των ομάδων A2 & A2 b παρουσιάζεται αφενός μεγαλύτερη θνησιμότητα κατά την 1^η πειραματική διαδικασία έναντι της 2^{ης} και αφετέρου η θνησιμότητα της 1^{ης} παρουσιάζει σημαντική αύξηση από την 28^η-39^η ημέρα. Η θνησιμότητα της 2^{ης} παρουσιάζεται σαφώς μικρότερη και πιο σταθερή.

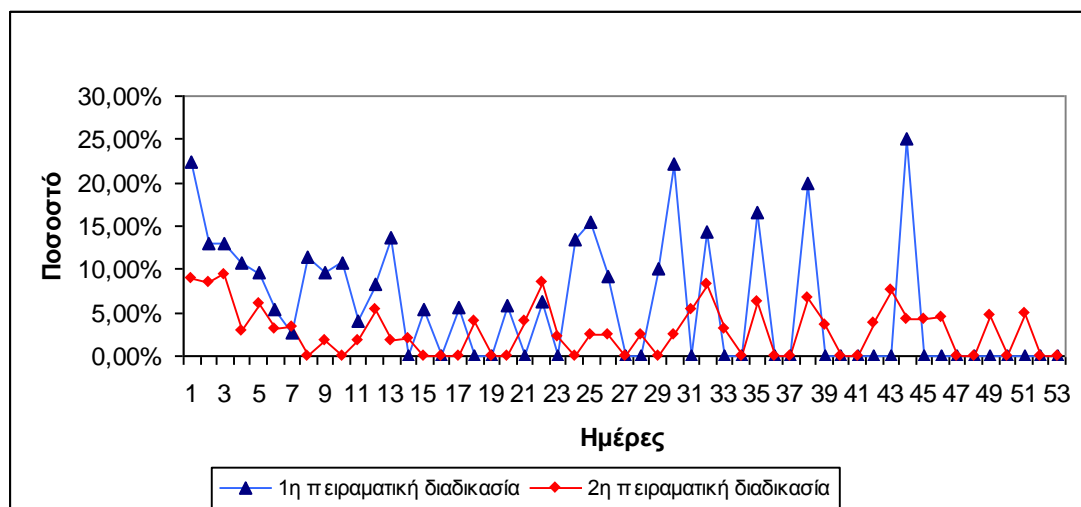


Διάγραμμα 14. Θνησιμότητα των Ομάδων A2 & A2 b

Στο Διάγραμμα 14 διακρίνεται η διαφορά θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A2 & A2b, 90% και 76,66% αντίστοιχα.

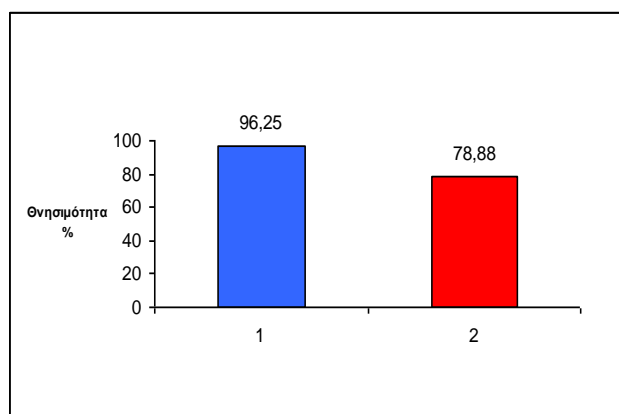
Θνησιμότητα των ομάδων A3 & A3 b

Η θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων (A3 & A3 b) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 15.



Διάγραμμα 15. Θνησιμότητα των Ομάδων A3 & A3 b

Στο Διάγραμμα μεταξύ των δύο ομάδων διακρίνεται εμφανώς μεγαλύτερη θνησιμότητα κατά την 1^η πειραματική διαδικασία έναντι της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας. Η κλιμάκωση της θνησιμότητας μεταξύ των δύο ομάδων παρουσιάζεται διαφορετική με την ομάδα A3 να εμφανίζει μεγάλα ποσοστά κορύφωσης της θνησιμότητας. Η ομάδα A3 b παρουσιάζει μειωμένη θνησιμότητα σε σχέση με την ομάδα A3 και διαφέρει στατιστικά σημαντικά $p=0,008$ ($p < 0,05$).

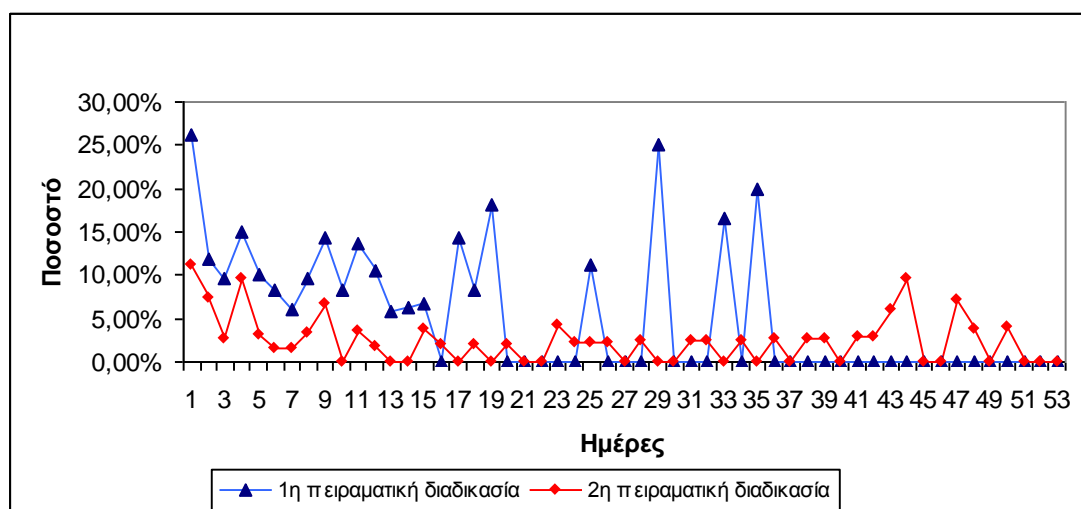


Διάγραμμα 16. Θνησιμότητα των Ομάδων A3 & A3 b

Στα Διάγραμμα 16 διακρίνεται η μεγάλη διαφορά θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A3 & A3b. Οι δύο ομάδες εμφανίζουν την μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες της 1^{ης} & 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας αντίστοιχα . Η θνησιμότητα της ομάδας A3 ήταν 96,25% έναντι 78,88% της ομάδας A3b.

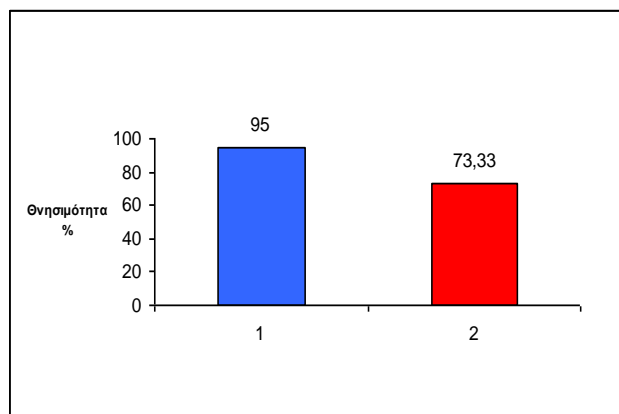
Θνησιμότητα των ομάδων A4 & A4 b

Η θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων (A4 & A4 b) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 17.



Διάγραμμα 17. Θνησιμότητα των Ομάδων A4 & A4 b

Στο παραπάνω συγκριτικό Διάγραμμα μεταξύ των δύο ομάδων διακρίνεται μεγαλύτερη θνησιμότητα κατά την 1^η πειραματική διαδικασία. Η κλιμάκωση της θνησιμότητας μεταξύ των δύο ομάδων παρουσιάζει ανομοιόμορφη κατανομή με την ομάδα A4 να εμφανίζει μεγάλα ποσοστά κορύφωσης κατά διαστήματα μέχρι την 36^η ημέρα. Αντίθετα η ομάδα A4 b εμφάνισε ίδιο ποσοστό θνησιμότητας με την ομάδα A2 b της ίδιας πειραματικής διαδικασίας. Στο μεγαλύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας η ομάδα A4 b εμφανίζει σταθερή θνησιμότητα με εξαίρεση μία κλιμάκωση κατά την 34^η και 35^η ημέρα. Μεταξύ των δύο ομάδων υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά με $p = 0,01$ ($p < 0,05$).

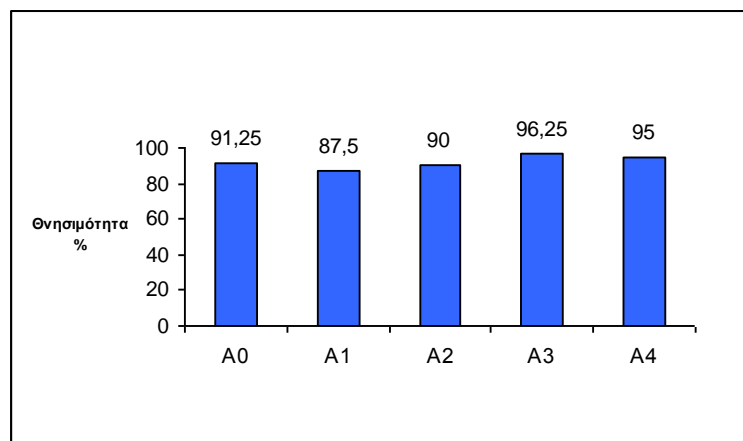


Διάγραμμα 18. Θνησιμότητα των Ομάδων A4 & A4 b

Στο Διάγραμμα 18 διακρίνεται η μεγάλη διαφορά θνησιμότητας μεταξύ των δύο ομάδων η οποία είναι 95% & 73,33% για την ομάδα A4 & A4b αντίστοιχα.

Θνησιμότητα των ομάδων της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Στο Διάγραμμα 19 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά θνησιμότητας των ομάδων της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας.

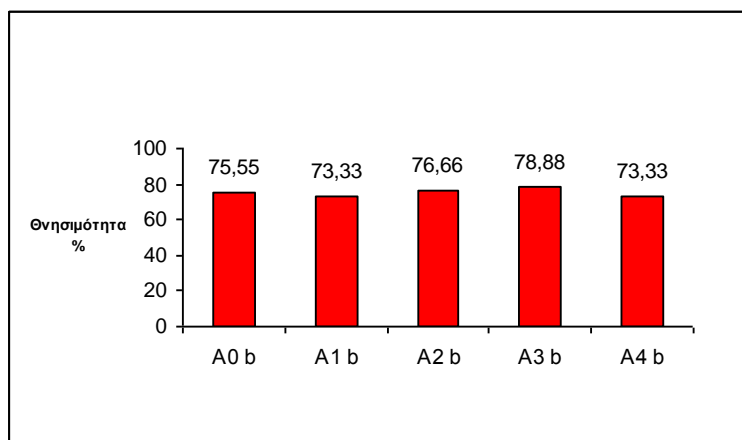


Διάγραμμα 19. Θνησιμότητα των ομάδων της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Όπως διακρίνεται στο παραπάνω Διάγραμμα τα ποσοστά της θνησιμότητας των τεσσάρων ομάδων (A1, A2, A3 & A4) δεν διαφέρουν σημαντικά από εκείνα του “μάρτυρα” (A0).

Θνησιμότητα των ομάδων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Ύστο Διάγραμμα 20 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά θνησιμότητας των ομάδων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας.



Διάγραμμα 20. Θνησιμότητα των ομάδων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Όπως διακρίνεται στο παραπάνω Διάγραμμα τα ποσοστά της θνησιμότητας των τεσσάρων ομάδων (A1b, A2b, A3b & A4b) δεν διαφέρουν σημαντικά από εκείνα του “μάρτυρα” (A0b) και εμφανίζονται χαμηλότερα από εκείνα της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας.

Συνοπτικά αποτελέσματα θνησιμότητας

Από την επεξεργασία των δεδομένων ποσοστιαίας θνησιμότητας των ομάδων της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας (A1, A2, A3 & A4), δεν προκύπτει σημαντική στατιστική διαφορά. Το ίδιο ισχύει μεταξύ των ομάδων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας (A1 b, A2 b, A3 b & A4 b).

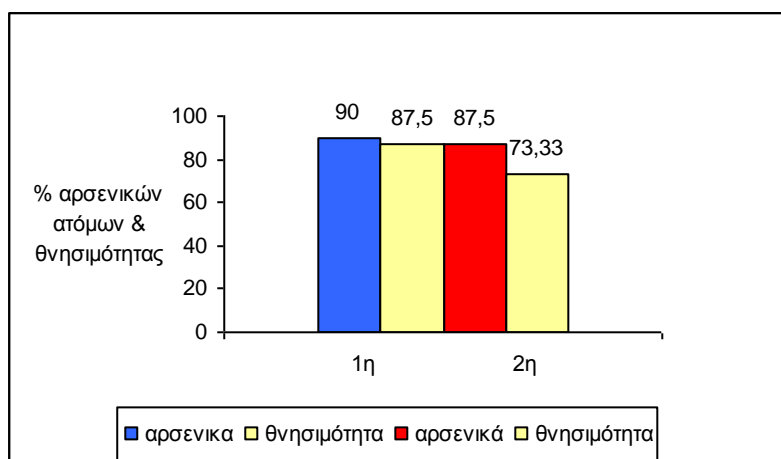
Κατά τη σύγκριση των αντίστοιχων ομάδων προκύπτει ότι όσον αφορά τις ομάδες με τη συγκέντρωση ορμόνης 3mg kg⁻¹ (A3 & A3b) και 4mg/kg⁻¹ (A4 & A4b) υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών (p=0,008 & p= 0,01 αντίστοιχα). Σημαντική επίσης στατιστική διαφορά (p = 0,003) προκύπτει και από τη σύγκριση των τελικών ποσοστών θνησιμότητας όλων των ομάδων των δύο πειραματικών διαδικασιών.

3.3 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΦΥΛΟΥ

Για την επιτυχή αντιστροφή φύλου σε όλα τα στάδια υπήρχε συγχρονισμός και η χορήγηση της ορμόνης ξεκίνησε την ημέρα που ομαδοποιήθηκαν οι προνύμφες. Στα παρακάτω Διαγράμματα γίνεται σύγκριση των ποσοστών αντιστροφής φύλου μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών.

Αντιστροφή φύλου των ομάδων A1 & A1 b

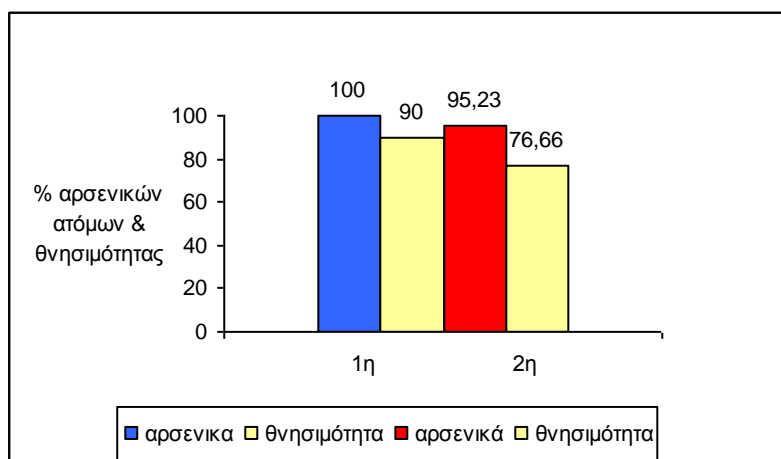
Στο Διάγραμμα 21 γίνεται σύγκριση των ποσοστών θνησιμότητας και επιτυχούς αντιστροφής φύλου μεταξύ των ομάδων A1 & A1b της 1ης & 2ης πειραματικής διαδικασίας. Οι ομάδες με την συγκέντρωση ορμόνης 1mg kg^{-1} εμφάνισαν ποσοστά αντιστροφής φύλου 90% & 87,5% αντίστοιχα και θνησιμότητα 87,5% & 73,33% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 21. Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A1 & A1b των δυο πειραματικών διαδικασιών

Αντιστροφή φύλου των ομάδων A2 & A2 b

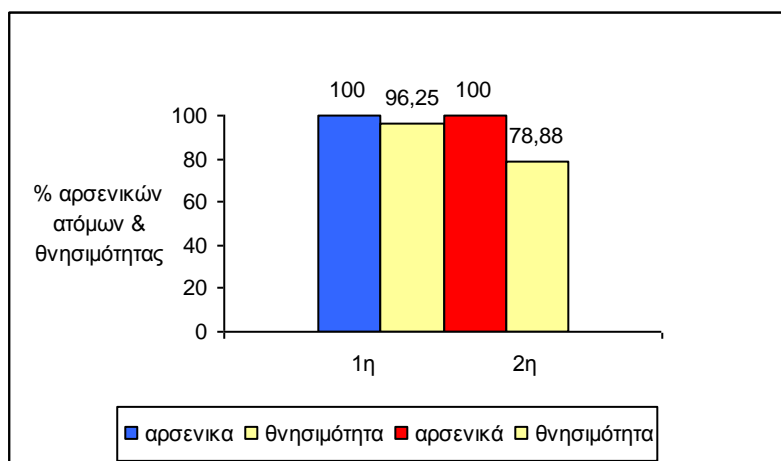
Η ομάδες με την συγκέντρωση $2\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ (A2 & A2 b) παρουσίασαν αντιστροφής φύλου 100% & 95,23% αντίστοιχα, ενώ, η θνησιμότητα ήταν 90% & 76,66% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 22. Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A2 & A2b των δυο πειραματικών διαδικασιών

Αντιστροφή φύλου των ομάδων A3 & A3 b

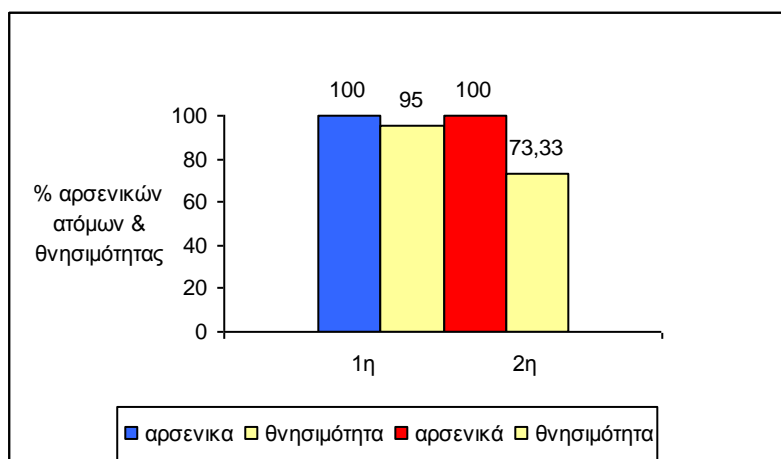
Στις ομάδες που χορηγήθηκε ορμόνη σε συγκέντρωση $3\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ (A3 & A3 b) παρουσίασαν αντιστροφή φύλου 100%, ενώ, η θνησιμότητα ήταν 96,25% στην Ομάδα A3 & 78,88% στην Ομάδα A3 b.



Διάγραμμα 23. Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A3 & A3b των δυο πειραματικών διαδικασιών

Αντιστροφή φύλου των ομάδων A4 & A4 b

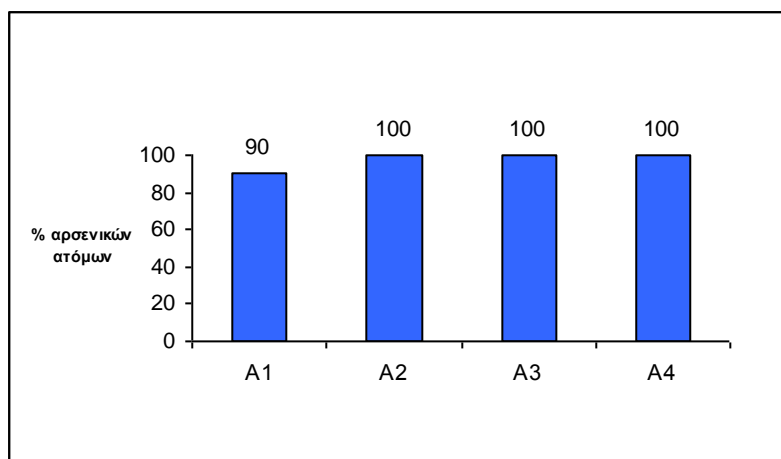
Στις ομάδες που χορηγήθηκε ορμόνη σε συγκέντρωση $4\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ (A4 & A4 b) παρουσίασαν αντιστροφή φύλου 100%, ενώ, η θνησιμότητα στις δύο ομάδες ήταν 95% & 73,33% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 24. Ποσοστά αντιστροφής φύλου και θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων A4 & A4b των δυο πειραματικών διαδικασιών

Αντιστροφή φύλου των ομάδων της 1ης πειραματικής διαδικασίας

Στο Διάγραμμα 25 παρουσιάζονται συγκριτικά τα ποσοστά αντιστροφής φύλου των ομάδων της 1ης πειραματικής διαδικασίας.

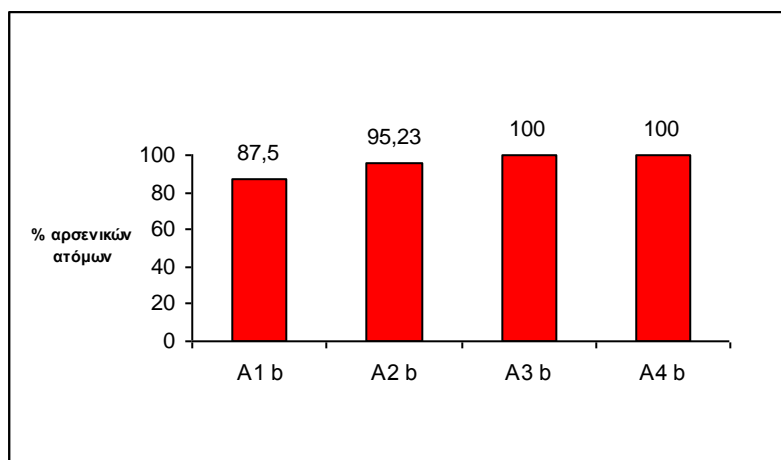


Διάγραμμα 25. Ποσοστά αντιστροφής φύλου των ομάδων της 1ης πειραματικής διαδικασίας

Όπως διακρίνεται στο παραπάνω Διάγραμμα οι ομάδες A2, A3 & A4 της 1ης πειραματικής διαδικασίας εμφάνισαν αντιστροφή φύλου 100%.

Αντιστροφή φύλου των ομάδων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Στο Διάγραμμα 26 παρουσιάζονται συγκριτικά τα ποσοστά αντιστροφής φύλου των ομάδων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας.



Διάγραμμα 26. Ποσοστά αντιστροφής φύλου των ομάδων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Όπως διακρίνεται στο παραπάνω Διάγραμμα οι ομάδες A3b & A4b της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας εμφάνισαν αντιστροφή φύλου 100%, ενώ η αναλογία μεταξύ των δύο φύλων στις ομάδες του “μάρτυρα” ήταν ~60/40% (m/f) και στις δύο πειραματικές διαδικασίες.

Στις Εικόνες 22-24 που ακολουθούν παρουσιάζονται ανδροποιημένοι μονομάχοι ηλικίας 8 εβδομάδων.



Εικόνα 22. Ανδροποιημένοι μονομάχοι



Εικόνα 23. Ανδροποιημένοι μονομάχοι (Φωτ. από στερεοσκόπιο)



Εικόνα 24. Ανδροποιημένος μονομάχος (Φωτ. από στερεοσκόπιο)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι είναι δυνατή η αντιστροφή φύλου των μονομάχων σε ποσοστό 100% μετά από χορήγηση 17 AMT μέσω της τροφής για διάστημα 8 εβδομάδων σε συγκεντρώσεις 1, 2, 3 & 4 mg kg⁻¹. Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί μόνο μία περίπτωση αντιστροφής φύλου μονομάχων με την ίδια μέθοδο (Kanumpurath & Pandian, 1994b) με την διαφορά ότι η χορήγηση της ορμόνης εξασφάλισε 100% αντιστροφή σε συγκεντρώσεις ορμόνης >15mg kg⁻¹ (15, 20 & 50 mg kg⁻¹).

Κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε υψηλή θνησιμότητα (μ.ο. 92,18%) ενώ παρόμοια ποσοστά παρατηρήθηκαν και στον μάρτυρα. Με τη χορήγηση όμως ζωντανής τροφής για 4 επιπλέον ημέρες επιτεύχθηκε μείωση της θνησιμότητας κατά 18%.

Οι κυρίαρχοι παράγοντες στους οποίους πιθανό να οφείλεται η υψηλή θνησιμότητα ήταν: ηθολογικοί, διατροφικοί, τεχνικοί, καθώς και η ηλικία γεννητόρων, ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά προβλήματα. Επίσης οι φυσικοχημικοί παράγοντες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος κυμάνθηκαν σε αποδεκτά επίπεδα για την εκτροφή του είδους ενώ η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή στους 28° C.

Το pH κυμαινόταν εντός των ορίων αντοχής των μονομάχων (Griffin, 2009), ενώ οι διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων μετρήσεων πιθανό να οφείλονται στο παρεχόμενο νερό, όπως επίσης η σκληρότητα (gH) που κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με το περιβάλλον που ζουν οι μονομάχοι (Andrews *et al.*, 1998).

Οι νύμφες μπήκαν σε ενεργοποιημένο κύκλωμα (ενός μήνα) και τα επίπεδα των νιτρικών (NO₂) παρουσίασαν παρόμοια διακύμανση μεταξύ των πειραματικών διαδικασιών, ενώ δεν επηρέασαν τις προνύμφες διότι κυμάνθηκαν μεταξύ 0 & 1 mg/l. Η αντίστοιχη τιμή της αμμωνίας ήταν σε χαμηλά επίπεδα ένδειξη της σωστής λειτουργίας του βιολογικού φίλτρου και της ανανέωσης νερού (5% ημερησίως, και μεγαλύτερη όταν κρινόταν σκόπιμο).

Τα νιτρικά (NO_3) παρουσίασαν παρόμοια διακύμανση μεταξύ των πειραματικών διαδικασιών, ενώ δεν φαίνεται να επηρέασαν τις προνύμφες καθώς η αύξηση που σημειώθηκε την τελευταία εβδομάδα των μετρήσεων δεν επηρέασε τη θνησιμότητα. Η αύξηση των νιτρικών σημειώθηκε κατά την 5^η εβδομάδα και η κορύφωση της κατά την 8^η εβδομάδα (γ' φάση του N), κάτι που ενδεχομένως να οφείλεται στο μέγεθος των ψαριών και την τροφή.

Η αμμωνία (NH_3) μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά και σε καμία μέτρηση δεν πέρασε το 1 mg/l και δεν επηρέασε τη θνησιμότητα των προνυμφών.

Το χρησιμοποιούμενο νερό ήταν φτωχό σε χλώριο και δεν αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις μετρήσεις δεν προέκυψε αρνητική επίδραση των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού στην επιβίωση των προνυμφών, ενώ ορισμένες αυξομειώσεις μεταξύ των μετρήσεων πιθανό να οφείλονται στην ποσότητα της παρεχόμενης τροφής.

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την βιωσιμότητας του γόνου ήταν ίσως η ηλικία των γεννητόρων η οποία πιθανό να σχετίζεται με την αυξημένη θνησιμότητα που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύμφωνα με τους Pandian & Sheela (1999) το αποτέλεσμα αντιστροφής φύλου μπορεί να επηρεαστεί όταν υπάρχει μειωμένη αναπαραγωγική απόδοση των γεννητόρων που χρησιμοποιούνται για πρώτη φορά.

Ένας άλλος παράγοντας στον οποίο οφειλόταν η υψηλή θνησιμότητα ήταν η αυξημένη επιθετικότητα των νυμφών μετά την 4^η εβδομάδα και η έντονη ανάγκη για περισσότερο ζωτικό χώρο η οποία εμφανίστηκε και στις τέσσερις ομάδες (καθώς και στην ομάδα του μάρτυρα). Το ίδιο διάστημα παρατηρήθηκε κανιβαλισμός και αφορούσε κυρίως την ουρά και τα πτερύγια.

Εκτός αυτού, η διατροφή των μικρών και “εύθραυστων” προνυμφών αποτέλεσε μια διαδικασία που απαιτεί λεπτούς χειρισμούς με βασικότερο κοινό πρόβλημα την προσαρμογή τους στην τροφή. Κατά την 2^η πειραματική διαδικασία έγινε εμπλουτισμός της artemia με Red Pepper της εταιρίας Bernaqua καθώς η σημασία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (HUFA)

αποδεικνύεται πολύτιμη για την όραση, τη χρώση και την ανάπτυξη των ιχθυονυμφών (Kanazawa, 2003) καθώς τα οπτικά και χημικά ερεθίσματα δραστηριοποιούν τις προνύμφες για την σύλληψη της τροφής (Kolkonsci *et al*, 1997). Η χορήγηση εμπλουτισμένης ζωντανής τροφής μέχρι και την 9^η ημέρα βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των προνυμφών και συντέλεσε στην ανάπτυξη τους.

Συμπερασματικά αναφέρουμε ότι ο ρόλος της διατροφής των γεννητόρων και των ιχθυονυμφών ίσως να ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας για την επιτυχή εξέλιξη των μικρών ψαριών, ενώ τα λιπαρά οξέα αποτελούν ισχυρό σύμμαχο για την υγεία και την ανάπτυξη τους. Η χορήγηση επιπλέον “ζωντανής” τροφής θα βελτιώνε ακόμη περισσότερο το ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών, όμως δεν μπορεί να εκτιμηθεί με ακρίβεια σε μια τέτοια περίπτωση ποιο θα ήταν το ποσοστό αντιστροφής φύλου.

Η κινητικότητα των νυμφών παρατηρήθηκε με φυσική παρουσία αλλά και τη χρήση κάμερας και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η επιθετικότητα πέρα από ηθολογικούς λόγους πιθανό να ήταν αποτέλεσμα του συνωστισμού των νυμφών στην επιφάνεια του νερού. Έτσι, ένας ιχθυοκλωβός μεγαλύτερης διαμέτρου ενδεχομένως να βελτιώνει την συμπεριφορά των μονομάχων αλλά και της επιβίωσης τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει δεν υπάρχει αρνητική επίδραση στην επιβίωση των προνυμφών από την χρήση τεστοστερόνης. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από τις αναλύσεις και των δύο πειραματικών διαδικασιών. Η τεστοστερόνη μεταβολίζεται γρήγορα και εκκρίνεται (Rinchard *et al.*, 1999), ενώ η χρήση αυτής της μεθόδου χορήγησης (μέσω της τροφής) προτείνεται από τον F.D.A. καθώς παρουσιάζει παρόμοια επιβίωση με εκείνη του “μάρτυρα” (Yanong *et al.*, 2006).

Οι μονομάχοι αποτελούν ένα εξαιρετικά δημοφιλές διακοσμητικό είδος του γλυκού νερού (Raja, 2009) με εξαιρετικό ενδιαφέρον και ανήκουν στα είδη του ζωικού βασιλείου που η συμπεριφορά τους σε όλα τα στάδια είναι αποτέλεσμα ευμετάβλητης κοινωνικής στρατηγικής (Bronstein, 1985). Η

τιμή τους καθώς και η ζήτηση νέων τύπων αυξάνονται συνεχώς ενώ λόγω της συνεχούς υποβάθμισης και επιδείνωσης των βιοτόπων στην Ταϊλάνδη (Monvises *et al.*, 2009) και σε άλλες χώρες της Ν.Α. Ασίας. Έτσι δημιουργείται ένα συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα συμπίεσης των ενδημικών διακοσμητικών ειδών και όχι μόνο. Είναι εύκολα κατανοητό πως απαιτείται ορθολογικότερη χρήση των εσωτερικών υδάτων αλλά και μεγαλύτερη στροφή προς την εκτροφή των εν λόγω ψαριών. Εδώ παρουσιάζεται μία μεγάλη πρόκληση για την Ελληνική αλλά και την Κοινοτική αγορά μιας και η καλλιέργεια διακοσμητικών ειδών εντός της Ε.Ε. οδηγεί σαφέστατα στην εκροή συναλλάγματος προς τρίτες χώρες τονώνοντας παράλληλα την εσωτερική αγορά. Η παραγωγή διακοσμητικών ειδών με προορισμό τους χομπίστες ενυδρείων αποτελεί παγκοσμίως έναν δυναμικό κλάδο της υδατοκαλλιέργειας. Σήμερα, το 90% των διακοσμητικών ειδών γλυκού νερού που κυκλοφορούν στο εμπόριο προέρχονται από εκτροφή ενώ όσον αφορά τα διακοσμητικά είδη θαλασσινού νερού το ποσοστό είναι σχεδόν αντίστροφο (Plusty, 2002).

Από οικονομική άποψη, η αγορά των διακοσμητικών ειδών παρουσιάζει μεγάλη άνθηση ακόμη και σε περιόδους οικονομικής κρίσης με θεαματικά αποτελέσματα. Η Σιγκαπούρη αποτελεί την μεγαλύτερη χώρα παραγωγής διακοσμητικών ψαριών στον κόσμο με εξαγωγές 500 ποικιλιών και ειδών σε 60 χώρες (Piferrer & Chuan Lim, 1997). Στην Ταϊλάνδη οι μονομάχοι είναι το 2^ο σε εξαγωγές διακοσμητικό ψάρι της χώρας (Monvises *et al.*, 2009).

Η τιμή (χονδρικής) των αρσενικών μονομάχων έναντι των θηλυκών είναι ~3 φορές μεγαλύτερη (Piferrer & Chuan Lim, 1997). Στους μονομάχους όπως και σε άλλα διακοσμητικά είδη τα αρσενικά άτομα εμφανίζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στην αγορά. Για να κεφαλαιοποιηθεί όμως αυτό το οικονομικό πλεονέκτημα όπως αναφέρουν οι Kanumpurath & Pandian, (1994b) χρειάζονται αποτελεσματικές μέθοδοι για την εξέλιξη και τυποποίηση ολοαρσενικών απογόνων. Η ανάγκη για τον έλεγχο της αναλογίας των φύλων προκύπτει από το γεγονός ότι τα δυο φύλα των μονομάχων

παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο πράγμα που τα διαφοροποιεί σημαντικά αναφορικά με την εμπορική τους αξία (Piferrer & Chuan Lim, 1997). Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί παρουσιάζεται η απόκλιση τιμών ανάμεσα στα δύο φύλα σε 8 (οχτώ) είδη διακοσμητικών ψαριών του γλυκού νερού όπως αναφέρουν οι Piferrer & Chuan Lim, 1997. Στην τρίτη και τέταρτη γραμμή διακρίνεται η διαφορά της εμπορικής αξίας των μονομάχων μεταξύ των δύο φύλων.

Πίνακας 4. Απόκλιση τιμών ανάμεσα σε αρσενικά & θηλυκά άτομα οχτώ ειδών διακοσμητικών ψαριών του γλυκού νερού

Είδη	Τιμή εξαγωγής (παραγωγού) σε δολάρια		Αναλογία τιμής αρσενικού/θηλυκού
	Αρσενικό	Θηλυκό	
Dwarf gourami, <i>Colisa lalia</i>	0,39 - 1,14	0,11 - 0,29	3,5 - 3,9
Fighting fish, <i>Betta splendens</i>			
Short fin variety	0,50	0,18	2,8
Long fin variety	0,57	0,18	3,2
Rosy barb, <i>Barbus conchoniuis</i>	0,25	0,14	1,8
Red Australian rainbow, <i>Glosselepis incisus</i>	2,14	0,93	2,3
Guppy, <i>Poecilia reticulata</i>	0,18 - 0,54	0,05 - 0,18	3,0 - 3,6
Balloon molly, <i>Poecilia latipinna</i>	0,43 - 2,14	0,14 - 0,57	3,1 - 3,8
Sailfin molly, <i>Poecilia velifera</i>	0,43 - 2,14	0,14 - 0,57	3,1 - 3,8
Sunset platy, <i>Xiphophorus variatus</i>	0,64	0,29	2,2

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Μικρή ποσότητα ορμόνης (3 & 4mg kg⁻¹) ήταν ικανή να προκαλέσει την αντιστροφή φύλου 100% σε μονομάχους.
2. Η ορμόνη που χρησιμοποιήθηκε δεν επηρέασε την θνησιμότητα των μονομάχων.
3. Η χρήση ζωντανής τροφής αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση των προνυμφών, ενώ η χρήση εμπλουτιστικού βελτιώνει το ποσοστό της επιβίωσης.
4. Το μεγαλύτερο διάστημα μικτής διατροφής κατά το στάδιο της “αποκοπής” κατά την 2^η πειραματική διαδικασία οδήγησε σε μείωση της θνησιμότητας χωρίς να επηρεάζει το αποτέλεσμα της αντιστροφής φύλου.
5. Η ηλικία των γεννητόρων και ο κανιβαλισμός ευθυνόταν σε μεγάλο βαθμό για τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ABATE M., 2005. Using a popular pet fish species to study territorial behaviour. *Journal of Biological Education* 39 (2): 81-86

ABRAHAMS M., ROBB T. & HARE J., 2005. Effect of hypoxia on opercular displays: evidence for an honest signal? *Animal Behaviour*, 70(2): 427-432

AMIRI - MOGHADDAM J., MANIEI F., MAHBOOBI - SOOFIANI N., ASADOLLAH S., 2010. Use of 17-a-methyltestosterone for production of male secondary sexual characteristics in the adult female green swordail (*Xiphophorus helleri*) *AAFL Bioblux* 3(1): 1-8

ANDREWS C, EXELL A. & CARRINGTON N., 1998. The interpet manual of Fish health, σελ 208

BADURA L. & FRIEDMAN H., 1998. Sex reversal in female *Betta splendens* as a function testosterone manipulation and social influence. *Journal of Comparative Psychology*, 102(03): 262-268

BALASUBRAMANI A. & PANDIAN T., 2008. Norethindrone ensures masculinization, normal growth and secondary sexual characteristics in the fighting fish, *Betta splendens*. *Current Science*, 95(10): 1446-1453

BENNINGTON N., 1937. Germ cell origin and spermatogenesis in Siamese Fighting fish, *Betta Splendens*. *Journal of Morphology*, 60(1): 103-125

BISAZZA A. & de SANTI A., 2003. Lateralization of aggression in fish. *Behavioural Brain Research*, 141(2): 131-136

BLAKESLEE C., Mc ROBERT SP., BROWN AC & CLOTFELTER ED., 2009. The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 80(2): 157-161

BOEUF G. & YVES LE BAIL P., July 1999. Does light have an anfluence on fish growth. *Aquaculture*, 177(1-4): 129-152

BOLS RJ., 1977. Display reinforcement in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*: aggressive motivation or curiosity? *Journal of comparative and physiological psychology*, 91(2): 233-244

BRONSTEIN PM., 1985. Predictors of dominance in male *Betta splendens*. *Journal of comparative psychology*, 99(1): 47-55

BRAUD W. & WEIBEL J., 1969. Acquired stimulus control of drug-induced changes in aggressive display in *Betta splendens*. *Journal of the Experimental Analysis Behavior*, 12(5): 773-777

CANTALUPO C., BISAZZA A., VALLORTIGARA G., July 1996. Lateralization of displays during aggressive and courtship behaviour in the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Physiology & Behavior*, 60(1): Pages 249-252

CASTRO N., ALBERT R., KLAUS B. & OLIVEIRA R., 2006. Metabolic costs of aggressive behaviour in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aggressive Behavior*, 32(5): 474-480

CAVALCANTI LP, PONTES RJ, REGAZZI AC, de PAULA JUNIOR FJ, FRUTUOSO RL, SOUSA EP, DANTAS FILHO FF, LIMA JW., 2007. Efficacy of fish as predators of *Aedes aegypti* larvae, under laboratory conditions. *Revista de saude publica*, 41(4): 638-644

CHANTZAROPOULOS A., NATHANAILIDES C., TZOUMANI M., GOUVA E., PERDIKARIS C. & I. PASCHOS 2007. A protocol with minimum technical requirements for the first production of sex reversed XX male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) in Greece and their sperm cryopreservation for all-female culture. PESCA 2007, Ciudad de la Habana, Cuba, March 5-9, 2007, p. 15-16.

CHEN G. & ZHANG B., 2001. Technique of implanting 17 alpha-methyltestosterone to induce the sex reversal of *Epinephelus malabaricus*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 12(2): 296-298

CLOTFELTER E., CURREN L., MURPHY C., 2006. Mate Choice and Spawning Success in the Fighting Fish *Betta splendens*: the Importance of Body Size, Display Behavior and Next Size. *Ethology*, 112(12): 1170-1178

COLLINS C., July 2008. Siamese fighting fish (*Betta splendens*) show self-control for access to a mirror (Master Thesis). *Experimental Psychology*

CRAFT B., VELKEY A. & SZALDA-PETREE A., 2003. Instrumental conditioning of choice behavior in male Siameze fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 63(3): 171-175

DEVLIN R. & NAGAHAMA Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4) 191-364

DOUTRELANT C, MCGREGOR P & OLIVEIRA R., 2001. The effect of an audience on intrasexual communication in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Behavioral Ecology*, 12(3): 283-286

DZIEWECZYNSKI T, EARLEY R, GREEN T. & ROWLAND W., 2005. Audience effect is context dependent in Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Behavioral Ecology*, 16(6): 1025-1030

DZIEWECZYNSKI T., EKLUND A. & ROWLAND W., 2006 a. Male 11-ketotestosterone levels change as a result of being watched in Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *General and Comparative Endocrinology*, 147(2): 184-189

DZIEWECZYNSKI T., BESSLER A., SHELTON D. & ROWLAND W., 2006 b. Effect of a Dummy Audience on Male-Male Interactions in Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Ethology*, 112(2): 127-133

ESTHER VERHOEF - VERHALLEN - Εγκυκλοπαίδεια του ενυδρείου, Εκδόσεις Καρακώτσογλου, 2003, σελ 255

FOBERG A., 2003. The Siamese fighting fish (*Betta splendens*) - An alternative fish species to use in evaluating the impact of endocrine disrupting chemicals with focus on aggressive performance. (Master Thesis). Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences.

FRISCH A., 2004. Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14(4): 481-499

GALIZIO M., WOODARD RL, KEITH J., 1985. Effects of ethanol and naltrexone on aggressive display in the fighting fish, *Betta splendens*. *Alcohol*, 2(5): 637-640

GINGER H., 2000. *Betta splendens* (Siamese fighting fish). - Ichthyology - Zoo 334c. University at Austin at Texas, Student project report

GOLDSTEIN R, 2001 - Bettas, Copyrighted Material, Barron's, σελ 95

GOLDSTEIN R, 2004 - The Betta Handbook, Copyrighted Material, Barron's, σελ 163

GONZALEZ S., MATSUDO V., CARLINI E., 1971. Effects of Marijuana compounds on the fighting behavior of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Pharmacology*, 6(3): 186-190

GOUVEIA A., de OLIVEIRA CM., ROMAO CF., de BRITO TM. & VENTURA DF., 2007. Effects of trophic poisoning with methylmercury on the appetitive elements of the agonistic sequence in fighting-fish (*Betta splendens*). *The Spanish Journal of Psychology*, 10(2): 436-448

GRIFFIN G., 2009. Bettas in Peril: The Mahachai Situation, IBC SMP, Species Complex Management Program.

HALPERIN JRP., GIRI T., ELLIOTT J. & DUNHAM DW., 1998. Consequences of hyper-aggressiveness in Siamese fighting fish: cheaters seldom prospered. *Animal Behaviour*, 55(1): 87-96

HANIFFA M. A., SRIDHAR S. & NAGARAJAN M., 2004. Hormonal manipulation of sex in stinging catfish *Heteropheustes fossilis* (Bloch). *Current Science*, 86(7): 1012-1017

HERB B., BIRON S. & KIDD M., 2003. Courtship by subordinate male Siamese fighting fish, *Betta splendens*: Their response to eavesdropping and naïve females. *Behaviour*, 140(1): 71-78

JAROENSUTASINEE M. & JAROENSUTASINEE K., 2003. Type of intruder and reproductive phase influence male territorial defence in wild-caught Siamese fighting fish. *Behavioural Processes*, 64(1): 23-29

JAROENSUTASINEE M. & JAROENSUTASINEE K., 2005. Sexual size dimorphism and male contest in wild Siamese fighting fish. *Journal of Fish Biology*, 59(6): 1614-1621

KANAZAWA A., 2003. Nutrition of Marine Fish Larvae. *Journal of Applied Aquaculture*, 13(1/2): 103 - 143

KAVUMPURATH S. & PANDIAN T., 1992. The development of all-male sterile triploid fighting fish (*Betta splendens*, Regan 1910) by integrating hormonal sex reversal of broodstock and chromosome-set manipulation. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 44(4): 111-119

KAVUMPURATH S. & PANDIAN T., 1993. Determination of labile period and critical dose for sex reversal by oral administration of estrogens in *Betta splendens* (Regan). *Indian Journal of Experimental Biology*, 31(1): 16-20

KAVUMPURATH S. & PANDIAN T., 1994 a. Induction of heterozygous and homozygous diploid gynogenesis in *Betta splendens* (Regan) using hydrostatic pressure. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25(2): 133-142

KAVUMPURATH S. & PANDIAN T., 1994 b. Masculinization of fighting fish, *Betta splendens* Regan, using synthetic or natural androgens. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25(4): 373-381

KIRANKUMAR S. & PANDIAN T., 2002. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. *Journal of Experimental Zoology*, 293(6): 606-616

KOLKOVSKI S., ARIELI A. & TANDLER A., 1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquaculture International* 5(6): 527-536

ΚΩΛΕΤΤΑΣ Ε., Ηγουμενίτσα, 1998. Διατροφή ψαριών στην υδατοκαλλιέργεια, Σημειώσεις Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, Τμήματος Ιχθυοκομίας – Αλείας

LOWE T. & LARKIN J., 1975. Sex reversal in *Betta splendens*, Regan, with emphasis on the problem of sex determination. *Journal of Experimental Zoology*, 191(1): 25-32

LYNN S., EGAR J., WALKER B., SPERRY T. & RAMENOFISKY M., 2007. Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Advances in Physiology Education*, 31(4): 358-363

MANOSROI J., PETCHJUL K. & MANOSROI A., 2004. Effect of Fluoxymesterone Fish Feed Granule of Sex Reversal of the Hybrid, Thai Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn. x *Oreochromis mossambicus* Linn). *Asian Fisheries Science*, 17(3-4) 323-331

MATOS R., PEAKE T. & McGregor P., 2003. Timing of presentation of an audience: aggressive priming and audience effects in male displays of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 63(1): 53-61

MILLER L., May, 2008. Siamese Fighting Fish Manuel: Caring for a Betta. Instruction manual, σελ 10

MONVISES A., NUANGSAENG B., SRIWATTANAROTHAI N. & PANIJPAN B., 2009. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *ScienceAsia*, 35: 8-16

NA-NAKORM UTHAIRAT, 1995. Comparison of cold and heat shocks to induce diploid gynogenesis in Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) and performances of gynogens. *Aquatic Living Resource*, 8: 333-341

OLIVEIRA R., 2009. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. *Integrative and Comparative Biology*, 49(4): 423-440

PAMPLOMA L de G. C., ALENCAR CH, LIMA JW, HEUKELBACH J., 2009. Reduced oviposition of *Aedes aegypti* gravid females in domestic containers with predatory fish. *Tropical medicine & International Health*, 14(11): 1347-50

PANDIAN T. & KOTEESWARAN R., 1999. Lability of sex differentiation in fish. *Current Science Association, Bangalore*, 76(4): 580-583

PANDIAN T. & SHEELA S., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138(1): 1-22

ΠΑΠΟΥΤΣΟΓΛΟΥ Σ., Αθήνα 1998 - Ενδοκρινολογία Ιχθύων, Εκδόσεις Σταμούλη, σελ 600

ΠΑΣΧΟΣ Γ. Ιωάννινα 2004, - Ιχθυοκαλλιέργειες Εσωτερικών Υδάτων, σελ 293

PIFERRER F. & CHUAN LIM L., 1997. Application of sex reversal technology in ornamental fish culture. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1(2): 113-118

PIFERRER F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of the teleost fish. *Aquaculture*, 197 (2001) 229-281

RAJA J., 2009. Temporal Costs of Feeding and Predation Rates in *Betta splendens* (Regan) in Relation to Body Weight, Feed Type and Sex. *Tropical Life Sciences Research*, 20(1): 7-16

RINCHARD J., DABROWSKI K., GARCIA-ABIANO M.A. & OTTOBRE J., 1999. Uptake and depletion of plasma 17 α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: effect on plasma steroids and sex reversal. *Steroids*, 64(8): 518-525

RUBER L., BRITZ R., HUI TAN H., NG P., ZARDOYA R. 2004. Evolution of mouthbrooding and life-story correlates in the Fighting fish Genus *Betta*. *Evolution*, 58(4) 799-813

RUBER L., BRITZ R. & ZARDOYA R. 2006. Molecular Phylogenetics and Evolutionary Diversification of Labyrinth Fishes (Perciformes: Anabantoidei). *Systematic Biology*, 55(3): 374-397

SNEKSER J., McROBERT S., CLOTFELTER E., 2006. Social partner presences of male and female fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioral Processes*, 72(1): 38-41

TLUSTY M., March 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 205(3-4): 203-219

TULLOCK J. - *Betta*, 2nd Edition, Howell Book House, 2006, σελ 128

VAN CANTFORT T. & BINGHAM L., 2002. The effects of forebrain ablation on aggressive display in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Paper presented at the first Annual Sandhills Regional Psychology Conference, Fayetteville, NC. 23 March.

VERBEEK P., IWAMOTO T. & MURAKAMI N., 2008. Variable stress-responsiveness in wild type and domesticated fighting fish. *Physiology and behaviour*, 93(1-2): 83-88

WEISS C. & COUGHLIN J., 1979. Maintained aggressive behavior in gonadectomized male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Journal Physiology & Behavior*, 23(1): 173-177

WIKERLING K. - Ενυδρεία, Εκδόσεις Ψύχαλος, 1990

YAMADA S., KAWASHIMA K., BABA K., OKU T. & ANDO S., 2009. Occurrence of a novel acetylated amino acid, N (alpha)-acetylhistidine, in skeletal muscle of freshwater fish and other ectothermic vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and molecular biology*, 152(3): 282-286

YANONG R., JEFFREY H., DANIELS C. & WATSON C., 2006. Efficacy of 17-alpha-methyltestosterone for Expression of Male Secondary Sexual Characteristics in the Green Swordtail. *North American Journal of Aquaculture*, 68(3): 224-229

Βιβλιογραφικές πηγές μέσω διαδικτύου

AC TROPICAL FISH (AQUATIC COMMUNITY TROPICAL FISH)
www.aquaticcommunity.com/betta/splendens.php (online) 01/2009.

AQ.P.A. {AQUARIUM (& PONDS) ANSWERS}, 2009. Fish baths.
(online) 14/07/2009
<http://swishfish.com/anatomy.shtml>

BETTA FISH CENTER, 2009.
www.bettafishcenter.com/Articles-1.shtml version (04/2009)
www.bettafishcenter.com/Betta-Diseases.shtm

FROESE R. & PAULY D., editors. (2009) FishBase World Wide Web electronic publication www.fishbase.org version (10/2009)

I.B.C. (International Betta Congress)
www.ibcbettas.org version (2010)

I.T.I.S. (Integrated Taxonomic Information System)
www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=172610
version (2009)

MYERS P., ESPINOSA R., PARR C., JONES T., HAMMOND G. & DEWEY T., 2008.
U.M.M.Z. (University of Michigan Museum of Zoology), The Animal Diversity Web
<http://animaldiversity.org>, (online) 16/01/2010.

O.F.I. (ORNAMENTAL FISH INTERNATIONAL). Description of the supply chain.
(upload) 20/08/2007 (online) 16/01/2010.

STAFFORD V., 2005. Betta anatomy.
<http://swishfish.com/anatomy.shtml> (online) 04/2009.

Ηλεκτρονική πηγή 1
www.fightingfish.com.au/articles.php (online) 04/2009.

Ηλεκτρονική πηγή 2
www.bettatalk.com/betta_anatomy.htm (online) 01/2009.

Οι μετατροπές των μονάδων μέτρησης έγιναν μέσω της ιστοσελίδας:
www.convertworld.com/el

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ





Πίνακας Π.1. Κωδικοποίηση των γεννητόρων της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Γεννήτορες 1 ^ο πειράματος			
Αρσενικοί γεννήτορες		Θηλυκοί γεννήτορες	
Κωδικός	Χρώμα - Τύπος μονομάχου	Κωδικός	Χρώμα - Τύπος μονομάχου
BM 1	Κόκκινο Crowntail (CT)	BF 1	Πράσινο-γκρι
BM 2	Κόκκινο Veiltail (VT)	BF 2	Άσπρο-κόκκινο
BM 3	Άσπρο-κόκκινο-πράσινο Crowntail (CT)	BF 3	Μπλε-κόκκινο ανοιχτό
BM 4	Πράσινο Veiltail (VT)	BF 4	Μπλε-κόκκινο σκούρο
BM 5	Μπλε-μαύρο Spade tail (SPT)	BF 5	Πράσινο-κόκκινο
		BF 6	Γαλάζιο-πράσινο

Πίνακας Π.2.. Κωδικοποίηση των γεννητόρων της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Γεννήτορες 2 ^ο πειράματος			
Αρσενικοί γεννήτορες		Θηλυκοί γεννήτορες	
Κωδικός	Χρώμα - Τύπος μονομάχου	Κωδικός	Χρώμα - Τύπος μονομάχου
GM 1	Μαύρο-μπλε Crowntail (CT)	GF 1	Κοκκινο-μπλέ Crowntail (CT)
GM 2	Γαλάζιο-ροζ Veiltail (VT)	GF 2	Πράσινο-κόκκινο
GM 3	Γαλάζιο-κόκκινο Veiltail (VT)	GF 3	Κόκκινο
GM 4	Μπλε-κόκκινο (VT)	GF 4	Άσπρο-κόκκινο Crowntail (CT)
GM 5	Μπλε-μαύρο-κόκκινο Spade tail (SPT)	GF 5	Πράσινο-γκρι
		GF 6	Άσπρο-κόκκινο
		GF 7	Κόκκινο-μπλε

Πίνακας Π.3.. Διατροφικά στοιχεία των χορηγούμενων τροφών των γεννητόρων

	Τροφή F1	Τροφή F2	Τροφή F3	Τροφή F4
Είδος				
	Ocean nutrition Atison's Betta PRO	Tetra Betta	Sera Bloodworms	JBV Tubifex
Τύπος	Πέλλετς (Pellets)	Φυλλαράκια (flakes + shrimps & krill)	Αποξηραμένα bloodworms (Freeze - dried)	Αποξηραμένα tubifex (Freeze - dried)
Σύσταση:				
Πρωτεΐνες (Crude protein)	39,9 % (min)	48 %		60 %
Λιπαρά (Crude fat)	8,6 % (min)	8 %		12 %
Ινες (Crude fiber)	4,4 (max)	1,5 %		2 %
Υγρασία (Moisture)	7,7 % (max)	7 %		
Τέφρα (Ash)	7,6 % (min)	11 %		8 %
Προστιθέμενες βιταμίνες		L-ascorbyl-2- polyphosphate 122mg/kg		
Βιταμίνη Α	✓			
Βιταμίνη Β1	✓			
Βιταμίνη Β2	✓			
Βιταμίνη Β3	✓			
Βιταμίνη Β6	✓			
Βιταμίνη Β12	✓			
Βιταμίνη C	✓			
Βιταμίνη D3	✓			
Βιταμίνη E	✓			
Βιταμίνη Κ3	✓			
Βιοτίνη	✓			
Φολικό οξύ	✓			
calcium pantothenate	✓			
menadione sodium bisulfite complex	✓			
<i>Artemia salina</i>		3,3 %		
<i>Euphausia pacifica</i>		3,3 %		

Πίνακας Π.4. Σύσταση των χορηγούμενων τροφών των γεννητόρων

	Τροφή F1	Τροφή F2	Τροφή F3	Τροφή F4
Είδος				
	Ocean nutrition Atison's Betta PRO	Tetra Betta	Sera Bloodworms	JbV Tubifex
Συστατικά (ingredients)	Γαριδάλευρο, αλεύρι σίτου, βιταμίνες & ιχνοστοιχεία	Ιχθυάλευρο, δημητριακά, λαχανικά, μαλάκια & καρκινοειδή, λίπη & έλαια, ζύμες, εκχύλισμα πρωτεϊνών, σάκχαρα, άλγη, λεκιθίνη.	Αποξηραμένα σκουλήκια bloodworms.	Αποξηραμένα σκουλήκια tubifex.

Πίνακας Π 5. Διατροφικά στοιχεία των χορηγούμενων τροφών των προνυμφών

	Τροφή S1	Τροφή S2
Είδος	CLASSIC AAF-F	INITIAL FISH FEED LUCKY STAR 2
Τύπος	(σκόνη)	
Σύσταση:		
Πρωτεΐνες (Crude protein)	48 %	56 %
Λιπαρά (Crude fat)	11 %	8 %
Ίνες (Crude fiber)	1,0 %	1,4 %
Υγρασία (Moisture)		10 %
Τέφρα (Ash)	9,5 %	13 %
Φώσφορος	1,2 %	
Βιταμίνες, ιχνοστοιχεία	Βιταμίνες, ιχνοστοιχεία / Kg <ul style="list-style-type: none"> ⊗ Βιταμίνη A: 10.000 U.I. ⊗ Βιταμίνη D3: 1.500 U.I. ⊗ Βιταμίνη E: 150 mg ⊗ Χαλκός: 4 mg ⊗ Περιέχει σταθερή βιταμίνη C. 	5 %
Συστατικά (ingredients)		Ιχθυάλευρο 45 %, δημητριακά 15 %, άλευρο από καλαμάρι 20 %, krill meal 10 %, ζύμες 5 %.

Πρόγραμμα διατροφής γεννητόρων 1^ο πειράματος

Ημερολόγιο διατροφής γεννητόρων

Ημερολόγιο διατροφής Ιανουαρίου

Ιανουάριος			
Ημερομηνία		Είδος τροφής	Τύπος τροφής
Πέμπτη	1	F2	flakes
Παρασκευή	2	F3	bloodworms
Σάββατο	3	F3	bloodworms
Κυριακή	4	F4	tubifex
Δευτέρα	5	F1	pellets
Τρίτη	6	F1	pellets
Τετάρτη	7	F2	flakes
Πέμπτη	8	F2	flakes
Παρασκευή	9	F3	bloodworms
Σάββατο	10	F3	bloodworms
Κυριακή	11	F4	tubifex
Δευτέρα	12	F1	pellets
Τρίτη	13	F1	pellets
Τετάρτη	14	F2	flakes
Πέμπτη	15	F2	flakes
Παρασκευή	16	F3	bloodworms
Σάββατο	17	F3	bloodworms
Κυριακή	18	F4	tubifex
Δευτέρα	19	F1	pellets
Τρίτη	20	F1	pellets
Τετάρτη	21	F2	flakes
Πέμπτη	22	F2	flakes
Παρασκευή	23	F3	bloodworms
Σάββατο	24	F3	bloodworms
Κυριακή	25	F4	tubifex
Δευτέρα	26	F1	pellets
Τρίτη	27	F1	pellets
Τετάρτη	28	F2	flakes
Πέμπτη	29	F2	flakes
Παρασκευή	30	F3	bloodworms
Σάββατο	31	F3	bloodworms

Ημερολόγιο διατροφής Φεβρουαρίου

Φεβρουάριος			
Ημερομηνία		Είδος τροφής	Τύπος τροφής
Κυριακή	1	F4	tubifex
Δευτέρα	2	F1	pellets
Τρίτη	3	F1	pellets
Τετάρτη	4	F2	flakes
Πέμπτη	5	F2	flakes
Παρασκευή	6	F3	bloodworms
Σάββατο	7	F3	bloodworms
Κυριακή	8	F4	tubifex
Δευτέρα	9	F1	pellets
Τρίτη	10	F1	pellets
Τετάρτη	11	F2	flakes
Πέμπτη	12	F2	flakes
Παρασκευή	13	F3	bloodworms
Σάββατο	14	F3	bloodworms
Κυριακή	15	F4	tubifex
Δευτέρα	16	F1	pellets
Τρίτη	17	F1	pellets
Τετάρτη	18	F2	flakes
Πέμπτη	19	F2	flakes
Παρασκευή	20	F3	bloodworms
Σάββατο	21	F3	bloodworms
Κυριακή	22	F4	tubifex
Δευτέρα	23	F1	pellets
Τρίτη	24	F1	pellets
Τετάρτη	25	F2	flakes
Πέμπτη	26	F2	flakes
Παρασκευή	27	F3	bloodworms
Σάββατο	28	F3	bloodworms

Ημερολόγιο διατροφής Μαρτίου

Μάρτιος			
Ημερομηνία		Είδος τροφής	Τύπος τροφής
Κυριακή	1	F4	tubifex
Δευτέρα	2	F1	pellets
Τρίτη	3	F1	pellets
Τετάρτη	4	F2	flakes
Πέμπτη	5	F2	flakes
Παρασκευή	6	F3	bloodworms
Σάββατο	7	F3	bloodworms
Κυριακή	8	F4	tubifex
Δευτέρα	9	F1	pellets
Τρίτη	10	F1	pellets
Τετάρτη	11	F2	flakes
Πέμπτη	12	F2	flakes
Παρασκευή	13	F3	bloodworms
Σάββατο	14	F3	bloodworms
Κυριακή	15	F4	tubifex
Δευτέρα	16	F1	pellets
Τρίτη	17	F1	pellets
Τετάρτη	18	F2	flakes
Πέμπτη	19	F2	flakes
Παρασκευή	20	F3	bloodworms
Σάββατο	21	F3	bloodworms
Κυριακή	22	F4	tubifex
Δευτέρα	23	F1	pellets
Τρίτη	24	F1	pellets
Τετάρτη	25	F2	flakes
Πέμπτη	26	F2	flakes
Παρασκευή	27	F3	bloodworms
Σάββατο	28	F3	bloodworms
Κυριακή	29	F4	tubifex
Δευτέρα	30	F1	pellets
Τρίτη	31	F1	pellets

Πρόγραμμα διατροφής γεννητόρων 2^ο πειράματος

Ημερολόγιο διατροφής γεννητόρων

Ημερολόγιο διατροφής Μαΐου

Μάιος			
Ημερομηνία		Είδος τροφής	Τύπος τροφής
Παρασκευή		F3	bloodworms
Σάββατο	2	F3	bloodworms
Κυριακή	3	F4	tubifex
Δευτέρα	4	F1	pellets
Τρίτη	5	F1	pellets
Τετάρτη	6	F2	flakes
Πέμπτη	7	F2	flakes
Παρασκευή	8	F3	bloodworms
Σάββατο	9	F3	bloodworms
Κυριακή	10	F4	tubifex
Δευτέρα	11	F1	pellets
Τρίτη	12	F1	pellets
Τετάρτη	13	F2	flakes
Πέμπτη	14	F2	flakes
Παρασκευή	15	F3	bloodworms
Σάββατο	16	F3	bloodworms
Κυριακή	17	F4	tubifex
Δευτέρα	18	F1	pellets
Τρίτη	19	F1	pellets
Τετάρτη	20	F2	flakes
Πέμπτη	21	F2	flakes
Παρασκευή	22	F3	bloodworms
Σάββατο	23	F3	bloodworms
Κυριακή	24	F4	tubifex
Δευτέρα	25	F1	pellets
Τρίτη	26	F1	pellets
Τετάρτη	27	F2	flakes
Πέμπτη	28	F2	flakes
Παρασκευή	29	F3	bloodworms
Σάββατο	30	F3	bloodworms
Κυριακή	31	F4	tubifex

Ημερολόγιο διατροφής Ιουνίου

Ιούνιος			
Ημερομηνία		Είδος τροφής	Τύπος τροφής
Δευτέρα	1	F1	pellets
Τρίτη	2	F1	pellets
Τετάρτη	3	F2	flakes
Πέμπτη	4	F2	flakes
Παρασκευή	5	F3	bloodworms
Σάββατο	6	F3	bloodworms
Κυριακή	7	F4	tubifex
Δευτέρα	8	F1	pellets
Τρίτη	9	F1	pellets
Τετάρτη	10	F2	flakes
Πέμπτη	11	F2	flakes
Παρασκευή	12	F3	bloodworms
Σάββατο	13	F3	bloodworms
Κυριακή	14	F4	tubifex
Δευτέρα	15	F1	pellets
Τρίτη	16	F1	pellets
Τετάρτη	17	F2	flakes
Πέμπτη	18	F2	flakes
Παρασκευή	19	F3	bloodworms
Σάββατο	20	F3	bloodworms
Κυριακή	21	F4	tubifex
Δευτέρα	22	F1	pellets
Τρίτη	23	F1	pellets
Τετάρτη	24	F2	flakes
Πέμπτη	25	F2	flakes
Παρασκευή	26	F3	bloodworms
Σάββατο	27	F3	bloodworms
Κυριακή	28	F4	tubifex
Δευτέρα	29	F1	pellets
Τρίτη	30	F1	pellets

Ημερολόγιο διατροφής Ιουλίου

Ιούλιος			
Ημερομηνία		Είδος τροφής	Τύπος τροφής
Τετάρτη	1	F2	flakes
Πέμπτη	2	F2	flakes
Παρασκευή	3	F3	bloodworms
Σάββατο	4	F3	bloodworms
Κυριακή	5	F4	tubifex
Δευτέρα	6	F1	pellets
Τρίτη	7	F1	pellets
Τετάρτη	8	F2	flakes
Πέμπτη	9	F2	flakes
Παρασκευή	10	F3	bloodworms
Σάββατο	11	F3	bloodworms
Κυριακή	12	F4	tubifex
Δευτέρα	13	F1	pellets
Τρίτη	14	F1	pellets
Τετάρτη	15	F2	flakes
Πέμπτη	16	F2	flakes
Παρασκευή	17	F3	bloodworms
Σάββατο	18	F3	bloodworms
Κυριακή	19	F4	tubifex
Δευτέρα	20	F1	pellets
Τρίτη	21	F1	pellets
Τετάρτη	22	F2	flakes
Πέμπτη	23	F2	flakes
Παρασκευή	24	F3	bloodworms
Σάββατο	25	F3	bloodworms
Κυριακή	26	F4	tubifex
Δευτέρα	27	F1	pellets
Τρίτη	28	F1	pellets
Τετάρτη	29	F2	flakes
Πέμπτη	30	-	-
Παρασκευή	31	-	-

Ημερολόγιο διατροφής προνυμφών 1^{οο} πειράματος

Φεβρουάριος				
			Είδος τροφής	Παρατηρήσεις
Δευτέρα	2			Αναπαραγωγή
Τρίτη	3			
Τετάρτη	4	1 ^η ημέρα		Εκκόλαψη
Πέμπτη	5	2 ^η ημέρα		
Παρασκευή	6	3 ^η ημέρα		
Σάββατο	7	4 ^η ημέρα	<i>Artemia</i>	
Κυριακή	8	5 ^η ημέρα	<i>Artemia</i>	
Δευτέρα	9	6 ^η ημέρα	<i>Artemia</i> & CLASSIC AAF-F	
Τρίτη	10	7 ^η ημέρα	CLASSIC AAF-F (17 AMT 1mg, 2mg, 3mg, 4mg & 0mg kg ⁻¹)	Έναρξη χορήγησης τροφής με 17 AMT σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις
Τετάρτη	11	8 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	12	9 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	13	10 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	14	11 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	15	12 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	16	13 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	17	14 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	18	15 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	19	16 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	20	17 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	21	18 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	22	19 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	23	20 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	24	21 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	25	22 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	26	23 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	27	24 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	28	25 ^η ημέρα	>>	



Μάρτιος				
Κυριακή	1	26 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	2	27 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	3	28 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	4	29 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	5	30 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	6	31 ^η ημέρα	CLASSIC AAF-F & LUCKY STAR 2 (17 AMT 1mg, 2mg, 3mg, 4mg & 0mg kg ⁻¹)	Παράλληλη χορήγηση CLASSIC AAF-F & LUCKY STAR 2 (*** + artemia)
Σάββατο	7	32 ^η ημέρα	LUCKY STAR 2 (17 AMT 1mg, 2mg, 3mg, 4mg & 0mg kg ⁻¹)	
Κυριακή	8	33 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	9	34 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	10	35 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	11	36 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	12	37 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	13	38 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	14	39 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	15	40 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	16	41 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	17	42 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	18	43 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	19	44 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	20	45 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	21	46 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	22	47 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	23	48 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	24	49 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	25	50 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	26	51 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	27	52 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	28	53 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	29	54 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	30	55 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	31	56 ^η ημέρα	>>	

Ημερολόγιο διατροφής προνυμφών 2^ο πειράματος

Ιούνιος				
			Είδος τροφής	Παρατηρήσεις
Δευτέρα	3			Αναπαραγωγή
Τρίτη	4			
Τετάρτη	5	1 ^η ημέρα		Εκκόλαψη
Πέμπτη	6	2 ^η ημέρα		
Παρασκευή	7	3 ^η ημέρα		
Σάββατο	8	4 ^η ημέρα	Εμπλουτισμένη <i>Artemia</i>	
Κυριακή	9	5 ^η ημέρα	Εμπλουτισμένη <i>Artemia</i>	
Δευτέρα	10	6 ^η ημέρα	Εμπλουτισμένη <i>Artemia</i> & CLASSIC AAF-F	
Τρίτη	11	7 ^η ημέρα	Εμπλουτισμένη <i>Artemia</i> & CLASSIC AAF-F (17 AMT 1mg, 2mg, 3mg, 4mg & 0mg kg ⁻¹)	Έναρξη χορήγησης τροφής με 17 AMT σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις
Τετάρτη	12	8 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	13	9 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	14	10 ^η ημέρα	CLASSIC AAF-F (17 AMT 1mg, 2mg, 3mg, 4mg & 0mg kg ⁻¹)	
Σάββατο	15	11 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	16	12 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	17	13 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	18	14 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	19	15 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	20	16 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	21	17 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	22	18 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	23	19 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	24	20 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	25	21 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	26	22 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	27	23 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	28	24 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	29	25 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	30	26 ^η ημέρα		

Ιούλιος				
Δευτέρα	1	27 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	2	28 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	3	29 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	4	30 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	5	31 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	6	32 ^η ημέρα	CLASSIC AAF-F & LUCKY STAR 2 (17 AMT 1mg, 2mg, 3mg, 4mg & 0mg kg ⁻¹)	Παράλληλη χορήγηση CLASSIC AAF-F & LUCKY STAR 2
Κυριακή	7	33 ^η ημέρα	LUCKY STAR 2 (17 AMT 1mg, 2mg, 3mg, 4mg & 0mg kg ⁻¹)	
Δευτέρα	8	34 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	9	35 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	10	36 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	11	37 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	12	38 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	13	39 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	14	40 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	15	41 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	16	42 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	17	43 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	18	44 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	19	45 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	20	46 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	21	47 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	22	48 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	23	49 ^η ημέρα	>>	
Τετάρτη	24	50 ^η ημέρα	>>	
Πέμπτη	25	51 ^η ημέρα	>>	
Παρασκευή	26	52 ^η ημέρα	>>	
Σάββατο	27	53 ^η ημέρα	>>	
Κυριακή	28	54 ^η ημέρα	>>	
Δευτέρα	29	55 ^η ημέρα	>>	
Τρίτη	30	56 ^η ημέρα	>>	

Στους Πίνακες Π.6 & Π.7 παρουσιάζονται τα εβδομαδιαία αποτελέσματα των μετρήσεων του νερού εκτροφής των προνυμφών.

Πίνακας Π.6. Αποτελέσματα μετρήσεων του νερού εκτροφής της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Ημερομηνίες μετρήσεων 1 ^{ου} πειράματος	pH	NO ₂ mg/l	NO ₃ mg/l	NH ₃ mg/l	gH
6/2	8,5	0	0	0	8
13/2	8	0	0	0	8,5
20/2	8	0	0	0	8
27/2	8	0	0	0,5	8
6/3	8	0	10	1	7
13/3	8	0,5	10	1	7,5
20/3	7,5	0,5	10	1	7
27/3	8	0,5	25	1	7

Πίνακας Π.7. Αποτελέσματα μετρήσεων του νερού εκτροφής της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας

Ημερομηνίες μετρήσεων 2 ^{ου} πειράματος	pH	NO ₂ mg/l	NO ₃ mg/l	NH ₃ mg/l	gH
7/6	8	0	0	0	8
14/6	8	0	0	0	8
21/6	8	0	0	0	7,5
28/6	7,5	0	0	0	7,5
5/7	8	0	10	0,5	8
12/7	8	0,5	10	1	7
19/7	7,5	0,5	10	0,5	7,5
26/7	8	0	25	0	8

Στον Πίνακα Π.8 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά αποτελέσματα θνησιμότητας & αντιστροφής φύλου μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών

Πίνακας Π.8. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θνησιμότητας & αντιστροφής φύλου μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών

Ομάδες	Αριθμός ατόμων	Αριθμός ατόμων που επιβίωσαν	Θνησιμότητα %	Αρσενικά	Θηλυκά	Ποσοστό αντιστροφής φύλου %
A0 (c)**	80	7	91,25			
A0 b (c)	90	22	75,55			
A1	80	10	87,50	9	1	90
A1 b	90	24	73,33	21	3	87,50
A2	80	8	90	8	0	100
A2 b	90	21	76,66	20	1	95,23
A3	80	3	96,25	3	0	100
A3 b	90	19	78,88	19	0	100
A4	80	4	95	4	0	100
A4 b	90	24	73,33	24	0	100

* Οι ομάδες της 1^{ης} πειραματικής διαδικασίας φέρουν γαλάζιο χρώμα και τους κωδικούς A0, A1, A2, A3 & A4 ενώ της 2^{ης} πειραματικής διαδικασίας φέρουν κόκκινο χρώμα και τους κωδικούς A0 b, A1 b, A2 b, A3 b & A4 b.

** (c) = control (“μάρτυρας”)