



# Αύξηση της ανταγωνιστικότητας της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας μέσω καινοτόμου προγράμματος γενετικής επιλογής στο λαβράκι



**T**ην Παρασκευή 25 Σεπτεμβρίου 2015, το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης διοργάνωσε ημερίδα για τη διάδοση των αποτελεσμάτων του έργου με τίτλο «Αύξηση της ανταγωνιστικότητας της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας μέσω καινοτόμου προγράμματος γενετικής επιλογής στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)». Στην ημερίδα συμμετείχαν εκπρόσωποι της Διαχειριστικής Αρχής, στελέχη Δημοσίων Φορέων και Οργανισμών, εκπρόσωποι Παραγωγικών Φορέων, στελέχη Μονάδων Ιχθυοκαλλιεργειών, καθώς και μέλη της Επιστημονικής Κοινότητας.

Το έργο χρηματοδοτείται από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος Αλιείας 2007 - 2013, Πιλοτικά Σχέδια, Άξονας Προτεραιότητας 3 «Μέτρα Κοινού Ενδιαφέροντος». Το συντονισμό του έργου έχει το Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας με Επιστημονικό Υπεύθυνο τον Αν. Καθηγητή Μιχάλη Παυλίδη. Στην υλοποίηση συμμετέχουν η εταιρεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε., με υπεύθυνο έργου τον κ. Λεωνίδα Παπαχαρίση, το Ελληνικό Κέντρο θαλασσιών Ερευνών - Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, με υπεύθυνο έργου το Δρ. Κώστα Τσιγγινόπουλο και το Αλεξάνδρειο Τεχνο-



λογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης – Τμήμα Τεχνολογίας Γεωπονίας, με υπεύθυνο έργου το Δρ. Δημήτρη Χατζηηπλή.

Στην ημερίδα παρουσιάστηκε από τον κ. Κώστα Τσιγγενόπουλο η επιστημονική βάση των προγραμμάτων γενετικής επιλογής σε διεθνές επίπεδο, καθώς και τα αποτελέσματα της εφαρμογής τους σε διάφορα είδη ψαριών. Τονίστηκε ότι οι δυο χαρακτήρες που υπεισέρχονται σε όλα τα προγράμματα γενετικής επιλογής είναι ο αυξητικός ρυθμός και η ανθεκτικότητα σε ασθένειες. Η εφαρμογή τέτοιων πρωτοκόλλων στο σολομό του Ατλαντικού, *Salmo salar*, οδήγησε μέσα σε περίπου 40 χρόνια σε θεαματικά αποτελέσματα και συγκεκριμένα στη μείωση κατά το μισό του χρόνου που χρειάζονται τα ψάρια να φτάσουν το εμπορικό μέγεθος των 4 κιλών, μείωση σχεδόν στο 1/3 της εμπορικής τροφής που παρέχεται για την παραγωγή ενός κιλού βάρους ψαριού, αύξηση 13 - 15% ανά γενιά του γενετικού κέρδους για σωματική αύξηση και αύξηση 20% της ικανότητας μετατροπής της τροφής. Επίσης, παρουσιάστηκαν τα σύγχρονα μοριακά εργαλεία τα οποία κάνουν εφικτή την εισαγωγή νέων μεθοδολογιών στην εκτίμηση των κληρονομικών αξιών και την αξιοποίησή τους στα σχήματα

γενετικής επιλογής των παραγωγικών ζώων.

Η διεθνής εμπειρία έχει δείξει ότι πολλές φορές η επιλογή ορισμένων χαρακτηριστικών μπορεί να συνοδεύεται και από την επιλογή άλλων λιγότερο επιθυμητών, όπως η ευαισθησία στην καταπόνηση (stress), η επιθετική συμπεριφορά και η χαμηλή ανθεκτικότητα σε ασθένειες. Εξάλλου είναι γνωστό ότι η ευαισθησία στην καταπόνηση συνδέεται με ανοσολογικές, αναπαραγωγικές και ηθολογικές διαταραχές καθώς και με μειωμένη απόδοση και ευρωστία. Κατά συνέπεια η παράμετρος αυτή θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στα σύγχρονα προγράμματα γενετικής επιλογής.

### **Σκοπός του προγράμματος**

Ο κ. Μιχάλης Παυλίδης παρουσίασε το στόχο και τα αντικείμενα του έργου. Αναφέρθηκε ότι ο κύριος σκοπός του έργου είναι η ανάπτυξη τεχνογνωσίας επιλογής γεννητόρων λαβρακιού με βάση την απόκριση που δείχνουν σε έντονες και ιδιαίτερες συνθήκες εντατικής εκτροφής, σε συνδυασμό με τη βελτίωση της ανθεκτικότητας σε ασθένειες, αλλά και με εμπορικά χαρακτηριστικά, όπως ο ταχύτερος αυξητικός ρυθμός. Επίσης, ο συνδυασμός των χαρακτηριστικών



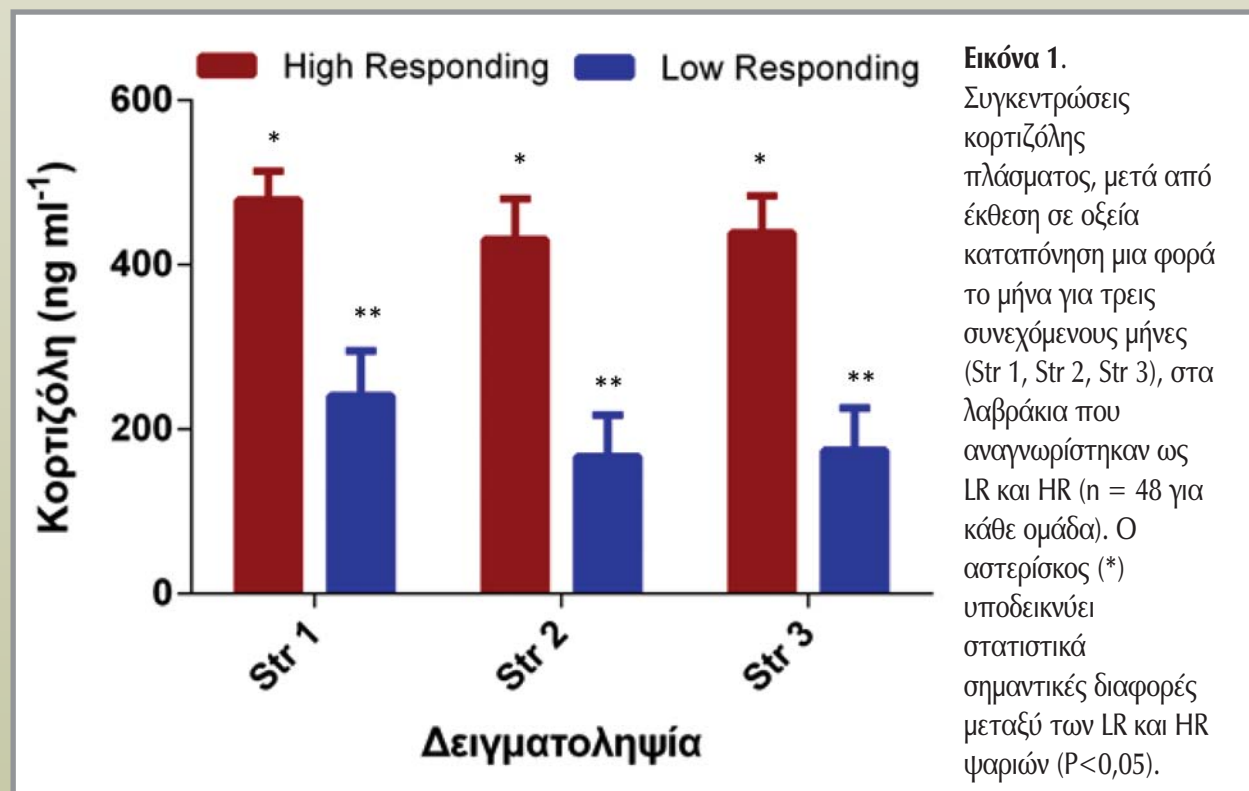
αυτών με γενετικούς τόπους ποσοτικών ιδιοτήτων (Quantitative Trait Loci (QTL)) έτσι ώστε να είναι δυνατή η επιλογή γεννητόρων λαβρακιού για τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, με βάση την παρουσία-απουσία συγκεκριμένων αλληλομόρφων. Η ανάπτυξη των γενετικών δεικτών και η χρήση τους σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης (Marker Assisted Selection) αυξάνει την ακρίβεια επιλογής γεννητόρων και επιταχύνει την γενετική πρόοδο ενός επιλεγόμενου πληθυσμού, με χαμηλότερο κόστος σε ιδιότητες που είναι δύσκολο ή/και κοστοβόρο να μετρηθούν (π.χ. απόκριση στο στρες, ανθεκτικότητα σε ασθένειες).

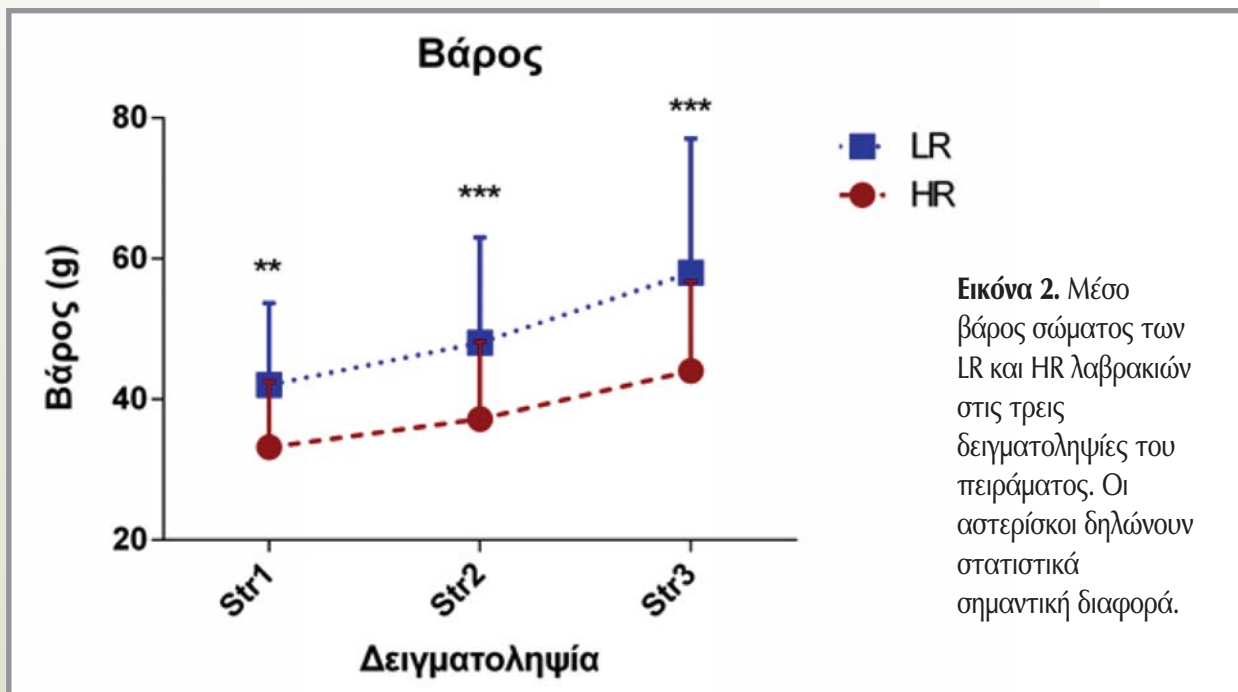
Κατά συνέπεια η βασική ιδέα της πρότασης είναι η εφαρμογή ολιστικής προσέγγισης στην αξιολόγηση υποψήφιων γεννητόρων αλλά και ιχθυδίων προς εκτροφή, η επιλογή των οποίων δε θα περιορίζεται στις κλασικές -και υπαρκτές ήδη- διαφορές στον αυξητικό ρυθμό, αλλά και στην εκτίμηση της ευρωστίας τους. Αυτή η προσέγγιση πιστεύεται ότι θα οδηγήσει σε ανάπτυξη τεχνογνωσίας σε εθνικό επί-

πεδο και θα συμβάλει στην αύξηση της ανταγωνιστικότητας της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας σε διεθνές επίπεδο. Τα κύρια αντικείμενα του έργου είναι:

1 Ο μαζικός έλεγχος για την παρουσία ατόμων με σταθερή απόκριση κορτιζόλης σε επαναλαμβανόμενο στρες πραγματοποιήθηκε σε 96 οικογένειες και 960 ομοθαλή και ετεροθαλή αδελφία λαβρακιού (υποψήφιοι γεννήτορες).

- Ο γενετικός χαρακτηρισμός των ατόμων και ο προσδιορισμός γενετικών δεικτών που συνδέονται με την απόκριση στην καταπόνηση.
- Η συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης στην καταπόνηση και άλλων προς επιλογή χαρακτηριστικών, όπως ο αυξητικός ρυθμός, ο μεταβολικός ρυθμός και η αντοχή στην ασθένεια που προκαλείται από το *Vibrio (Listonella) anguillarum*.
- Η ανάπτυξη αξιόπιστων μοριακών δεικτών εκτίμησης της απόκρισης στην καταπόνηση ή/και της ορθής μεταχείρισης (welfare) των ψαριών σε συν-





**Εικόνα 2.** Μέσο βάρος σώματος των LR και HR λαβρακιών στις τρεις δειγματοληψίες του πειράματος. Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

θήκες εντατικής εκτροφής.

Στη συνέχεια ακολούθησε η παρουσίαση των πρώτων αποτελεσμάτων.

#### Χαρακτηρισμός ατόμων και οικογενειών με βάση την απόκριση στην καταπόνηση

Ο κ. Θανάσης Σαμαράς (Παν/μιο Κρήτης) παρουσίασε τη μεθοδολογία για το χαρακτηρισμό των ατό-

μων λαβρακιού με βάση την απόκριση τους σε επαναλαμβανόμενο οξύ στρες. Για την εκτίμηση αυτή χρησιμοποιήθηκαν ορμονικοί (κορτιζόλη πλάσματος), βιοχημικοί (γλυκόζη, ωσμωτική συγκέντρωση) και ανοσολογικοί (λυσοζύμη) δείκτες καταπόνησης. Για πρώτη φορά πιστοποιήθηκε στο λαβράκι η παρουσία ατόμων με σταθερά υψηλές (HR: High Responding) ή σταθερά χαμηλές (LR: Low Responding) συγκεντρώ-

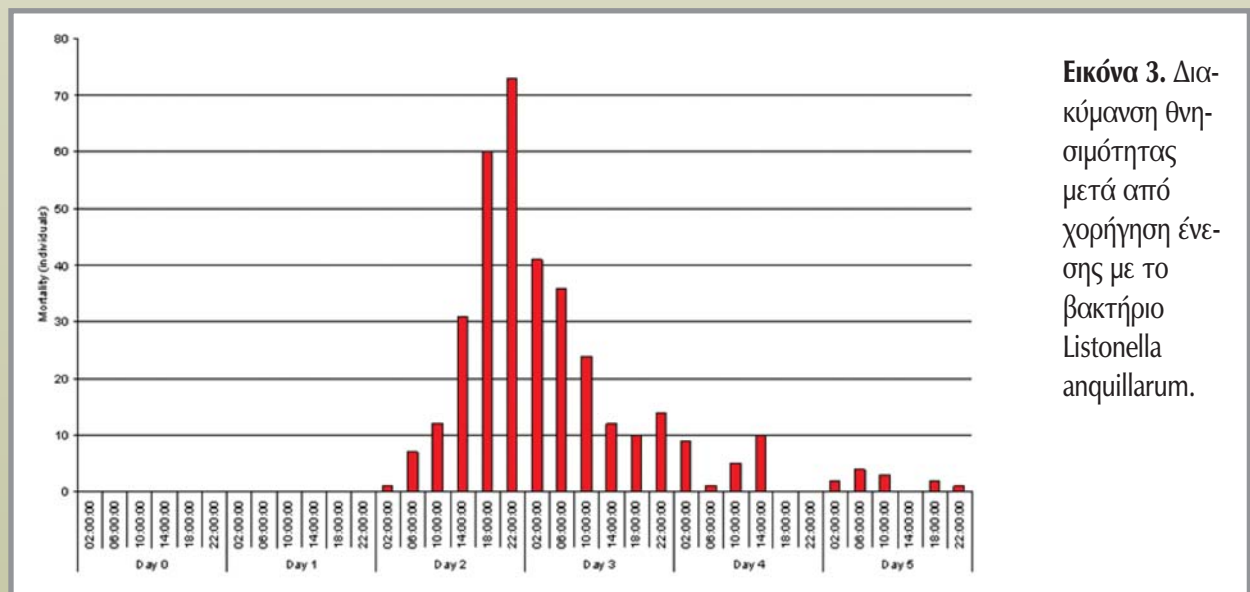




σεις κορτιζόλης πλάσματος μετά από έκθεση σε στρες (Εικόνα 1). Επίσης, φάνηκε ότι τα LR άτομα είχαν μεγαλύτερο βάρος σώματος από τα HR καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 2). Τέλος, καταδείχτηκε ότι η απόκριση της κορτιζόλης στην καταπόνηση αποτελεί ένα επαναλήψιμο χαρακτηριστικό ( $r = 0.50$ ,  $P < 0.001$ ).

Σε επίπεδο οικογένειας παρουσιάστηκαν τα εξής

πρότυπα απόκρισης: το πρότυπο της «Σταθερότητας», στο οποίο ανήκουν 27 οικογένειες (ποσοστό 28.1%). Οι ομάδες αυτές εμφανίζουν «Σταθερά υψηλές» (HR), «Σταθερά χαμηλές» (LR) ή «Σταθερά ενδιάμεσες» (IR) συγκεντρώσεις κορτιζόλης. Στο δεύτερο πρότυπο της «Προσαρμογής» αντιστοιχούν 59 οικογένειες (ποσοστό 61.5%), στις οποίες εμφανίζεται «Σταδιακή μείωση-προσαρμογή», «Ταχεία μείωση-προσαρμογή» ή «Αργή προσαρμογή» των μέσων



**Εικόνα 3.** Διακύμανση θνησιμότητας μετά από χορήγηση ένεσης με το βακτήριο *Listonella anquillarum*.



συγκεντρώσεων κορτιζόλης από μήνα σε μήνα. Τέλος, σε 10 οικογένειες (ποσοστό 10.4%) η συκέντρωση της κορτιζόλης δεν ακολούθησε κάποιο εμφανές πρότυπο.

#### **Δοκιμή ανοχής στην δονακίωση**

Η δονακίωση (Vibriosis) είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσήματα των ψαριών, με υψηλής συχνότητας εμφάνιση και υψηλή θνησιμότητα στην εκτροφή λαβρακιού σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς. Ο κ. Λεωνίδας Παπαχαρίσης (ΝΗΡΕΑΣ Α.Ε.) παρουσίασε τα αποτε-

λέσματα της ανθεκτικότητας των προς εξέταση οικογενειών στο βακτήριο *Listonell anquillarum*, serotype I. Στην αρχή έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές για την επιλογή της απαιτούμενης δόσης. Η πλήρης δοκιμή εφαρμόστηκε σε 6 έως 7 άτομα της κάθε μας από τις 96 οικογένειες που λάμβαναν μέρος στο πρόγραμμα. Η θνησιμότητα άρχισε να εμφανίζεται 2 ημέρες από την εφαρμογή και για την καλύτερη αποτίμηση του αποτελέσματος τα νεκρά ψάρια συγκεντρώνονταν και καταγράφονταν ανά 4 ώρες. Η συνολική θνησιμότητα ανήλθε στο 56,51% κατα-





**Εικόνα 4.** Σύστημα προσδιορισμού του μεταβολικού ρυθμού ψαριών σε επίπεδο ατόμων.

γράφοντας 360 νεκρά ιχθύδια σε συνολική διάρκεια 6 ημερών (Εικόνα 3).

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την τρέχουσα δοκιμή όσο και προηγούμενα αποτελέσματα, υπάρχει σημαντική κληρονομησιμότητα της συγκεκριμένης ιδιότητας. Η γενετική ταυτοποίηση των ανθεκτικών ατόμων και η πιθανή σύνδεσή τους με την απόκριση στην καταπόνηση και τον αυξητικό ρυθμό είναι σε εξέλιξη.

### **Μεταβολικός ρυθμός**

Οι βιολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση του αυξητικού ρυθμού και της αξιοποίησης της τροφής δεν είναι πλήρως γνωστοί. Πιο συγκεκριμένα, δεν είναι κατανοητό γιατί κάποια άτομα εμφανίζουν ταχύτερο αυξητικό ρυθμό από κάποια άλλα ή γιατί κάποια άτομα με παρόμοιο αυξητικό ρυθμό και σωματικό βάρος εμφανίζουν διαφορετικούς δείκτες μετατρεψιμότητας της τροφής. Τα κύρια αντικείμενα της εργασίας αυτής ήταν (α) ο προσδιορισμός του μεταβολικού ρυθμού ηρεμίας σε επιλεγμένα άτομα λαβρακιού, και (β) η διερεύνηση

πιθανής σύνδεσης με την απόκριση στο στρες (LR & HR άτομα).

Για πρώτη φορά στη χώρα μας έγινε εφικτός ο προσδιορισμός του μεταβολικού ρυθμού με τη χρήση μεταβολικών θαλάμων (Loligo® Systems, Δανία) και την εφαρμογή της τεχνολογίας Intermittent-flow Respirometry (Εικόνα 4). Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό του μεταβολικού ρυθμού ηρεμίας (Resting Metabolic Rate), αλλά και παρέχει μια πρώτη ένδειξη για το μεταβολικό ρυθμό κάτω από μέγιστη προσπάθεια (Active Metabolic Rate) σε κάθε άτομο ξεχωριστά.

Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα LR άτομα έχουν υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό ηρεμίας από τα HR λαβράκια, ενώ δε διαφέρουν ως προς το μεταβολικό ρυθμό κάτω από μέγιστη προσπάθεια.

### **Αυξητικός ρυθμός**

Η κ. Κωνσταντία Λύκα (Αν. Καθηγήτρια του Παν/μίου Κρήτης) παρουσίασε τα αποτελέσματα σχετικά με τον προσδιορισμό του αυξητικού ρυθμού των προς εξέταση οικογενειών τόσο κατά τη διάρκεια



της πρώτης φάσης του πειράματος (τρεις συνεχείς μηνιαίες δειγματοληψίες), όσο και στα αδελφία τους σε ιχθυοκλωβούς μέχρι το εμπορεύσιμο μέγεθος. Τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεταβλητότητα των μέσων βαρών των οικογενειών δεν αλλάζει σημαντικά στο χρόνο. Συγκεκριμένα στην πρώτη δειγματοληψία (ηλεκτρονική σήμανση των ατόμων, περίπου 185 ημέρες μετά την εκκόλαψη), η μεταβλητότητα των μέσων βαρών των οικογενειών ήταν 15.4%, ενώ στο τέλος των μετρήσεων (428 ημέρες μετά την εκκόλαψη) ήταν 13.5%. Η μεταβλητότητα στο βάρος σώματος ήταν μεγαλύτερη μεταξύ των διαφορετικών ατόμων μέσα στην ίδια οικογένεια, παρά μεταξύ των διαφορετικών οικογενειών. Σχηματικά θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει ότι το 34.1% της συνολικής μεταβλητότητας αποδίδεται κυρίως σε γενετικούς παράγοντες, ενώ το 65.9% σε περιβαλλοντικούς. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στο γεγονός ότι κάποιες από τις οικογένειες που είχαν το μεγαλύτερο ή μικρότερο μέσο βάρος στην αρχή των μετρήσεων δεν είχαν και το μεγαλύτερο ή μικρότερο αντίστοιχα βάρος στο τελευταίο ζύγισμα. Τέλος, η κ. Λύκα παρουσίασε ένα μαθηματικό μοντέλο (Δυναμικά Μοντέλα Ενεργειακού Ισοζυγίου) πρόβλεψης του αυξητικού ρυθμού σε συνάρτηση με άλλες παραμέτρους όπως η κατανάλωση οξυγόνου, η κατανάλωση τροφής και η αναπαραγωγή με δυνατότητα εφαρμογής στην ιχθυοκαλλιέργεια.

### **Γενετικός χαρακτηρισμός και προσδιορισμός γονιδιακών δεικτών**

Στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. πραγματοποιήθηκε ο γενετικός χαρακτηρισμός των HR & LR ατόμων. Συγκεκριμένα από τις 96 οικογένειες του πειράματος επιλέχθηκαν 72 οικογένειες βάσει της ενδοοικογενειακή παραλλακτικότητα στις συγκεντρώσεις κορτιζόλης και στο βάρος των ιχθύων. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA των επιλεγμένων απογόνων και γονέων των παραπάνω οικογενειών και ακολούθησε γονοτύπηση και ανάλυση των μικροδορυφορικών

τόπων που είχαν περιγραφεί να σχετίζονται με την απόκριση στην καταπόνηση και την ανθεκτικότητα σε ασθένειες.

Ο προσδιορισμός των γενετικών δεικτών που συνδέονται με την απόκριση στην καταπόνηση, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες και το βάρος σώματος παρουσιάστηκε από τον κ. Δημήτρη Χατζηπλή. Προηγούμενες ερευνητικές μελέτες είχαν δείξει την ύπαρξη τριών στατιστικά σημαντικών QTL που επηρεάζουν την αντοχή στην καταπόνηση, στις ομάδες σύνδεσης 3, 14 και 23. Για την ανάλυση στα πλαίσια του παρόντος έργου επιλέχθηκαν 21 πληροφοριακοί μικροδορυφορικοί δείκτες που ανήκουν στις ανωτέρω ομάδες σύνδεσης. Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν υψηλούς συντελεστές κληρονομησιμότητας για την κορτιζόλη (45% - 48%) και τη λυσοζύμη (49%) και χαμηλούς για τη γλυκόζη (13% - 16%). Για την κορτιζόλη και τη λυσοζύμη ανιχνεύτηκε σύνδεση των μικροδορυφορικών δεικτών με γονιδιακούς τόπους ποσοτικών ιδιοτήτων (QTL) σε 2, ενώ για τη γλυκόζη σε 3 ομάδες σύνδεσης του γενετικού χάρτη του λαβρακιού. Η λεπτομερής χαρτογράφηση των QTL θα μπορούσε να καταστήσει δυνατή την χρήση επιλογής υποβοηθούμενης από γενετικούς δείκτες (Marker Assisted Selection (MAS)) σε ιδιότητες που είναι δύσκολο να μετρηθούν και επηρεάζουν την ανταπόκριση στο επαναλαμβανόμενο στρες και να οδηγήσει στην αύξηση της ακρίβειας επιλογής και στην επιτάχυνση της γενετικής προόδου σε συσχετιζόμενες με αυτές ιδιότητες, όπως η ταχύτητα ανάπτυξης.

Στο κλείσιμο της ημερίδας ο κ. Παυλίδης συνόψισε τα κύρια συμπεράσματα από την ανάλυση των πρώτων αποτελεσμάτων και τόνισε τη σημασία της ανάπτυξης τεχνογνωσίας στη χώρα μας σε προγράμματα γενετικής επιλογής με δυνατότητα εφαρμογής και σε άλλα είδη της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας. Ακολούθησε συζήτηση και γόνιμη ανταλλαγή απόψεων. Οι παρουσιάσεις της ημερίδας έχουν αναρτηθεί στην ιστοσελίδα του προγράμματος ([www.bassgen.eu](http://www.bassgen.eu)).