

Fonksiyonel Erkekleştirilmiş Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Üretimi

Tülin ARSLAN *✍ Fatime ERDOĞAN ** Mete ERDOĞAN **

* Mugla University, Faculty of Fisheries, Department of Aquaculture, TR-48000 Mugla - TURKEY

** Mugla University, Ortaca Vocational School, Department of Fisheries, TR-48600 Mugla - TURKEY

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-5338

Özet

Bu çalışmada, sperm kanalları olan, abdominal masaj yoluyla gamet toplanabilen, fonksiyonel olarak erkekleştirilmiş gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) anacı üretimi için uygun hormonal cinsiyet dönüşüm prosedürü araştırılmıştır. Bu amaçla 4 grup deneme yapılmıştır. Oral uygulama grubunda, serbest yüzmeye başlayan post larvalar ilk yem alma aşamasından itibaren 600 derece-gün süresince kilogramında 1.0-3.0 mg 17 α -metilttestosteron içeren yemlerle beslenilmiştir. Banyo uygulama gruplarında ise, 0.5-1.0 mg l⁻¹ 17 α -metilttestosteron, 11 β -hidroksiandrostenedion ya da 17 α -metildihidrotestosteron keseli larval dönem boyunca (döllenenmeden itibaren 370-560 derece-gün) kısa süreli (2 saatlik) tek, 48 saat aralı 2-3 ya da 1 hafta aralı çift banyo şeklinde verilmiştir. Çalışma sonuçları, gökkuşığı alabalığında fonksiyonel erkekleştirilmiş dişi anaç üretimi için en uygun hormon prosedürünün döllenmeden sonraki 470-800 derece-gün'leri kapsayan, periyodik banyolar veya periyodik banyolar ve düşük dozda oral uygulamalar şeklinde bir prosedür olabileceğini, androjen banyolarının fonksiyonel erkekleştirilmiş dişi anaçlar üretmekte daha etkili olduğunu, düşük konsantrasyonlarda (≤ 1 mg kg⁻¹ yem) verildiğinde oral 17 α -metilttestosteron uygulamalarının da yüksek oranda fonksiyonel erkek birey üretebileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Oncorhynchus mykiss*, 17 α -metilttestosteron, 17 α -metildihidrotestosteron, 11 β -hidroksiandrostenedion, Fonksiyonel hormonal cinsiyet değişimi

The Production of Functional Sex-Reversed Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Summary

In this study, appropriate hormonal sex reversal procedure for the production of functional sex-reversed male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brooders with intact sperm ducts was investigated. For this purpose, 4 groups of experiment were conducted. In oral administration group, free swimming larvae starting from the first feeding were fed 1.0-3.0 mg 17 α -methyltestosterone kg⁻¹ diets for 600 degree-days. In the remaining experimental groups, 0.5-1.0 mg l⁻¹ 17 α -methyltestosterone, 11 β -hydroxyandrostenedione or 17 α -methyl-dihydrotestosterone were administered throughout the sac fry stage (370-560 degree-days post fertilization) as short (2 h) single, 48 h apart 2-3 or 1 week apart double baths. Results of the study demonstrated that appropriate androgen procedure for the production of functionally masculinized rainbow trout females should be covering the 470-800 degree-days post fertilization, but it could be periodic baths or periodic baths and oral administration of low concentrations, at low concentrations (≤ 1 mg kg⁻¹ feed) oral administration of 17 α -methyltestosterone could yield high ratios of functional sex reversed males.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, 17 α -methyltestosterone, 17 α -methyl-dihydrotestosterone, 11 β -hydroxyandrostenedione, Functional hormonal sex reversal

GİRİŞ

Ülkemizde entegre kültürü yapılan tek tatlı su balığı olan gökkuşığı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792, yetiştiriciliğinde çoğu ülke verimi artırmak amacıyla

üretimde tamamı dişi populasyonlar kullanılmaktadır¹⁻³. Çünkü gökkuşığı alabalığı erkekleri birinci yaşları içerisinde seksüel olgunluğa erişmeye başlarlar. Erginleşmeyle



İletişim (Correspondence)



+90 252 2111893



atulin@mu.edu.tr, arslatu@yahoo.com

birlikte yemle alınan enerjinin büyük bir kısmı gonad gelişimine yönlendirildiğinden, erkeklerde büyüme yavaşlamakta, kaslarda depolanan protein ve lipit miktarlarındaki düşümlere ve kas pigmentasyonunda değişime bağlı olarak et kalitesi de düşmektedir^{1,3}.

Tek cinsiyetli balık popülasyonlarının üretiminde ekonomik olması, yüksek teknoloji ve uzmanlık gerektirmemesi ve homozigotluk oranının artması gibi istenmeyen genetik yan etkilerinin olmaması dolayısıyla en çok tercih edilen üretim tekniği, hormonal cinsiyet dönüşüm metodudur^{2,4-6}. Pazara sunulan son ürün üzerinde hormon kullanılmasını gerektirmediğinden sofralık balık üretiminde bu metodolaylı olarak uygulanır^{2,4,7}. Dolaylı hormonal cinsiyet dönüşüm uygulamasında, hormonlarla cinsiyeti değiştirilmiş bireyler (genotipik ve fenotipik cinsiyeti farklı bireyler) anaç olarak kullanılarak çaprazlama yoluyla tek cinsiyetli popülasyonlar üretilir^{2,4,7}. Gökkuşluğu alabalığında çaprazlama yoluyla tamamı diş popülasyonlar üretmekte kullanılan erkekleştirilmiş diş anaçlar yavruların ilk yemleme aşamasından itibaren 60-90 gün süreyle kilogramında 0.5-3 mg 17 α -metilttestosteron içeren yemlerle beslenmesiyle üretilmektedir^{1,5,8,9}. Bu metod gonadal cinsiyeti başarılı bir şekilde değiştirmekle birlikte, üretilen erkeklerde sperm kanalları oluşmamaktadır^{1,10,11}. Sperm kanalları olmayan erkekleştirilmiş dişilerden gamet elde etmek ancak gonadların ameliyatla vücut dışına çıkarılmasıyla mümkündür. Bu yüzden geç erginleşen ve 2-3 yılda büyütülen bu anaçlar ancak bir defa kullanılabilir. Ayrıca normal (genotipik) erkekler gibi abdomene uygulanan yumuşak bir basınçla sperm bırakmadıklarından gonadal olgunluklarının önceden kontrol edilmesi de mümkün değildir. Vücut renginin koyulaşması, alt çenenin uzaması gibi karakterler genotipik erkeklerde olduğu gibi gonad olgunluğu hakkında bilgilendirici olmakla birlikte, ikincil cinsiyet karakterleri iyi gelişmiş erkekleştirilmiş dişilerin sperm kalitesi her zaman aynı derecede iyi olmayabilmektedir¹². Bunun sebebi olarak sperm kanalı olmayan bu erkeklerde, spermin son olgunlaşma aşamasını kanaldaki seminal plazma ortamında tamamlayamaması gösterilmektedir¹². Bu nedenle, erkekleştirilmiş diş anaçlardan elde edilen sperm kullanılmadan önce bir süre olgunlaştırma solüsyonlarında bekletilir. Aksi halde olgunlaşmasını tamamlayamamış spermin yumurtaları dölleme kapasitesi çok düşük olabilmekte ve bu durum önemli ekonomik kayıplar yaşanmasına yol açmaktadır¹².

Gökkuşluğu alabalığında ilk yemleme sırasında gonadların somatik gelişimi zaten başlamıştır¹³⁻¹⁵. Sitolojik değişim (primordial üreme hücrelerinin oogonia veya spermatogonia'a dönüşümü) veya ilk mayoz (primer oositlerin oluşumu) ise ilk yemlemeden sonra olmaktadır¹³⁻¹⁵. Dolayısıyla, ilk yemlemeyle başlatılan hormon uygulamalarından elde edilen erkekleştirilmiş dişilerde sperm kanallarının oluşmaması uygulamanın zamanlaması ile ilgili bir sorun olabilir. Fonksiyonel, sperm kanalları olan erkek-

leştirilmiş diş anaçlar üretmek için hormon uygulamalarının gonadların somatik değişimi sırasında, keseli larval dönemde başlatılması gerekebilir. İşte bu öngörü doğrultusunda gerçekleştirilen araştırmamızın amacı fonksiyonel, sperm kanalları olan ve abdominal masaj yoluyla sperm bırakabilen erkekleştirilmiş diş gökkuşluğu alabalığı anaç üretimi için uygun hormonal cinsiyet dönüşüm metodünü araştırmaktır.

MATERYAL ve METOT

Bu araştırmamızın saha çalışmaları Muğla ili, Fethiye ilçesinde yıl boyu sabit sıcaklıkta (8.7 \pm 0.1°C) kaynak suyu ile üretim yapan ticari bir gökkuşluğu alabalığı kuluçkahane işletmesinde gerçekleştirilmiştir. Saha çalışmalarına 2005 yılı Aralık ayı sonlarında, gökkuşluğu alabalığının bölgedeki doğal üreme sezonu (Kasım-Ocak) içerisinde başlanılmıştır. Çalışmada, işletmede üretilen değişik yaşlardaki besin keseli ve besin kesesini tüketmiş larvalara doğal veya sentetik androjenler (11 β -hidroksiandrostenedion (OHA, Sigma A3009), 17 α -metilttestosteron (MT, Sigma M7252), 17 α -metildihidrotestosteron (MDHT, Sigma M5626)) oral ya da banyo yolu ile verilmiştir.

Oral veya banyo yolu ile hormon uygulamaları için gerekli miktardaki androjen hassas terazide tartıldıktan sonra %96'lık etanol içerisinde çözdürülmüş ve 1 mg androjen ml⁻¹ konsantrasyonunda stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok solüsyonlar denemelerde kullanılan konsantrasyonlara seyreltilerek hormonlu yemlerin hazırlanmasında ve banyo uygulamalarında kullanılmıştır. Hormonlu yemler Arslan ve ark.'nın çalışmasında⁴ tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır. Hormon banyoları larvalara 40 L hacimli plastik küvetlerde verilmiştir. Küvetler banyo uygulamalarından hemen önce taze su ile doldurulmuş, planlanan konsantrasyonda androjen içeren stok solüsyonlar banyo suyuna eklenerek kuvvetli bir havalandırma ile tüm suya homojen bir şekilde karışmaları sağlanmıştır. Hormon banyoları sırasında, keseli larvalar işletmedeki dikey inkubatörlerden gözenekli tepsilerle birlikte alınarak, banyo küvetlerine yerleştirilmiştir. İki saatlik banyo süresi boyunca, küvetlerdeki su oksijen tüpüne bağlı hava taşı vasıtasıyla, büyük hava kabarcıkları oluşmasına müsaade etmeden hafifçe havalandırılmıştır. Banyo süresinin sonunda, larvalar yine tepsiler içerisinde hormon banyosu küvetlerinden çıkarılarak, temiz su ile birkaç sefer yıkanmış ve dikey inkubatörlerine geri yerleştirilmiştir. Dikey inkubatörlerde besin kesesini tüketen larvaların bakımında ve oral yolla hormon uygulamaları sırasında 80x240 cm² boyutlarında kapalı alan, fiberglas yapay yeme alıştırtma tankları kullanılmıştır. Bu tanklarda 1-2 g'a ulaşan deneme balıkları gonad gelişimlerinin değerlendirildiği büyüklüklere ulaşıncaya kadar değişik boyutlarda, açık alan beton havuzlarda bakılmışlardır. Beton havuzlarda büyütme sürecinde deneme balıklarına hiç boylama yapılmamış, stoklama yoğunlukları düşük (<5 kg/m³) tutulmuştur. Çalışma süresince deneme balıkları

büyükliklerine bağlı olarak doyana kadar günde 1-8 defa, ağız açıklıklarına uygun büyüklükte %45-57 oranlarında ham protein içeren alabalık yemleriyle (Trouw Nutrition TR) beslenilmiştir.

Saha çalışmalarının ilk yılında, sonraki yıllarda anaç olarak kullanmak ve denemeleri tamamı dişi populasyonlar üzerinde yapabilmek amacıyla, mevcut hormonal cinsiyet değişim prosedürü kullanılarak erkekleştirilmiş dişi populasyonlar üretilmiştir. Bu amaçla, besin kesesini tüketip, serbest yüzmeye başlayan on biner adet post larva iki tekrarlı olarak ilk yemlemeden itibaren kilogramında 3 mg MT içeren yemle 600 derece-gün süresince beslenilmiştir.

Saha çalışmalarının ilk yılında ve takip eden 2 yılın üreme sezonlarında, birbiriyle bağlantılı 3 grup banyo yoluyla hormon uygulama denemesi yapılmıştır. Bu denemelerde, eksternal hormonlara en duyarlı gelişim dönemi olarak rapor edilen ^{8,16} yumurtaların açılmasından-dış beslenmeye geçiş dönemi içerisindeki dört biner keseli larvaya yumurta açılmasının tamamlandığı 43. günden (döllenenmeden itibaren 370 derece-gün) başlanarak haftalık periyotlarda 0.5 mg l⁻¹ OHA, MT ya da 0.5-1 mg l⁻¹ MDHT içeren tek veya iki farklı sıklıkta 2-3 hormon banyosu verilmiştir (Tablo 1). Kontrol grupları hormon banyoları ile eş zamanlı olacak şekilde ve hormon banyolarıyla aynı miktarda etanol içeren alkol banyolarına tabi tutulmuştur. Çalışma boyunca yapılan tüm denemeler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Sadece son yıldaki banyo denemelerinde 4 tekrarlı bir kontrol grubu kullanılmıştır.

Çalışmanın oral hormon uygulaması üzerine yapılan

son grup denemesinde, mevcut hormonal cinsiyet değişim prosedürüne göre yeme katılan MT dozunun gökkuşağı alabalığının gonad gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu denemede, besin kesesini tüketip serbest yüzmeye başlayan on biner adet post larva iki tekrarlı olarak ilk yemlemeden itibaren kilogramında 1, 2 ya da 3 mg MT bulunduran yemler ile 600 derece-gün süresince beslenilmiştir.

Hormon uygulamalarından bir sonraki üreme sezonunda, gonad gelişiminin tamamlandığı bilinen 7-8. ay sonrasında, 100 g ve üzerine ulaşan deneme balıkları hormon uygulamalarının gonad gelişimi üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere örneklenmiştir. Örneklemelerde, uygulamaların her bir tekrarından rastgele olarak 100-110 adet balık alınmıştır. Örneklenen balıklar aşırı dozda anestetik (2-fenoksi etanol) ile öldürüldükten sonra bir bistüri yardımıyla abdomenleri açılmış ve gonad morfolojileri önce makroskobik olarak incelenmiştir. Makroskobik incelemeler sonrası, bütün halde ve hava kesesine yapışık olarak çıkarılan gonadlar %10'luk nötralize-formalin içerisinde fikse edilmiştir. Fikse edilen gonad örneklerinden fast green boyası ve gonadal-ezme metodu kullanılarak yaş preparatlar hazırlanmıştır ¹⁷. Ayrıca gonadal dokunun detaylı incelenebilmesi için her bir hormon uygulamasından 5-10 balığın gonadları kullanılarak Harris-hematoksilen ve eosin ile boyanmış kalıcı preparatlar hazırlanmıştır. Yaş ve kalıcı preparatların mikroskobik incelemesiyle gonadlar gözlemlenen hücre tiplerine ve iç morfolojik özelliklerine göre dişi, erkek veya interseks olarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 1. Gökkuşağı alabalığında fenotipik cinsiyeti değiştirmede kullanılan 11 β -hidroksiandrostenedion (OHA), 17 α -metilttestosteron (MT) ve 17 α -metildihidrotestosteron (MDHT) banyolarının zamanları, uygulama yoğunlukları ve dozajları

Table 1. Timing, intensities and dosages of 11 β -hydroxyandrostenedione (OHA), 17 α -methyltestosterone (MT) and 17 α -methyl-dihydrotestosterone (MDHT) immersions used for changing the direction of phenotypic sex in rainbow trout

Uygulama Başındaki Larval Gelişim Aşaması	Uygulama Yoğunluğu	Androjen (Doz)
%100 yumurta açılması (Döllenenmeden itibaren 370 derece-gün)	48 saat aralı 2 banyo	Kontrol OHA (0.5 mg l ⁻¹) MT (0.5 mg l ⁻¹)
	48 saat aralı 3 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)
%100 yumurta açılmasından 1 hafta sonra (Döllenenmeden itibaren 420-450 derece-gün)	Tek banyo	Kontrol MDHT (0.5 mg l ⁻¹) MDHT (1 mg l ⁻¹)
	48 saat aralı 2 banyo	OHA (0.5 mg l ⁻¹) MT (0.5 mg l ⁻¹)
	48 saat aralı 3 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)
	1 hafta aralı 2 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹) MDHT (0.5 mg l ⁻¹)
%100 yumurta açılmasından 2 hafta sonra (Döllenenmeden itibaren 470-490 derece-gün)	Tek banyo	Kontrol MDHT (0.5 mg l ⁻¹)
	48 saat aralı 2 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)
	1 hafta aralı 2 banyo	MDHT (0.5 mg l ⁻¹)
%100 yumurta açılmasından 3 hafta sonra (Döllenenmeden itibaren 560 derece-gün)	Tek banyo	MDHT (0.5 mg l ⁻¹)

Başarılı sayılabilecek hormon uygulamalarında, örneklemelerden arta kalan balıklar sperm kanalı gelişimi ve cinsiyet dönüşümünün işlevselselliğinin tam olarak değerlendirilebilmesi için seksüel olgunluğa eriştikleri 2. yaşlarına kadar açık alan beton havuzlarda büyütülmüştür. Bu balıklarda sperm kanalı gelişimi ikinci yaşlarındaki üreme sezonunda kontrol edilmiş ve abdominal masaj yoluyla sperm veren kanallı (fonksiyonel) erkeklerin oranı tespit edilmiştir. Abdominal masajla yoluyla gamet toplanamayan bireyler aşırı dozda anestetik ile öldürüldükten sonra bir bisturi yardımıyla abdomenleri açılmış ve gonad morfolojileri makroskobik olarak incelenmiştir. Makroskobik incelemeler sonrası, bütün halde, hava kesesine yapışık olarak çıkarılan gonadlar %10'luk nötralize-formalin içerisinde fikse edildikten sonra gonadal-ezme metodu kullanılarak mikroskobik olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirilmelerde grimsi veya süt beyaz renkte gonadları olgun ve/veya olgunlaşmakta olan sperm hücreleri içeren bireyler erkek, ipliksi pembe renkte gonadları yoğun bağ doku ve az sayıda değişime uğramış hücre içeren bireyler steril (kısır) olarak sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma gruplarındaki balık sayıları yüz ile çarpıldıktan sonra incelenen deneme tekrarındaki toplam balık sayısına bölünerek yüzde erkek, dişi, interseks ve steril birey oranları tespit edilmiştir.

Veriler SAS (Statistical Analysis System, SAS Instute Inc., Carry, NC, ABD) yazılımının 8.2 sürümü kullanılarak analiz edilmiştir. Yüzde erkek ve interseks oranları analizler öncesi arcsin karekök transformasyonuna tabi tutulmuştur. Deneme gruplarının cinsiyet oranları arasında fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (one way-ANOVA) ile saptanmıştır. ANOVA testinin $\alpha = 0.05$ önem derecesinde istatistiki belirgin fark işaret ettiği durumlarda, hormon uygulamalarının ortalamaları önce Dunnett t-testi kullanılarak ilgili kontrol grubu ortalamaları ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra uygun durumlarda, Duncan çoğul aralık testi kullanılarak, ortalamalar kendi deneme grupları içerisinde etki derecelerine göre sınıflandırılmıştır.

BULGULAR

Oral ya da banyo yoluyla hormon uygulamaları, kullanılan dozlarda gökkuşağı alabalığında toksisiteye sebep olmamıştır. Hormon uygulamaları boyunca ve sonunda, bütün deneme gruplarının yaşam oranlarının benzer ve çalışılan kuluçkahaneinin başarı standartları içerisinde (%70-80) olduğu gözlenmiştir.

Banyo uygulamalarının tümü erkek oranlarında artışa sebep olmuştur. Fakat OHA banyoları ve %100 yumurta açılmasında ya da 1 hafta sonra verilen 48 saat aralı 3 MT banyosunun erkek oranlarında oluşturduğu artış istatistiki olarak önemli ($P>0.05$) bulunmamıştır (Tablo 2). Farklı larval yaşlarda verilen tek ya da çift MT veya MDHT banyolarının tümü ise erkek oranlarında istatistiki belirgin ($P<0.05$) artışa sebep olmuştur (Tablo 2, 3). Erkekleşme oranları ile MT banyo uygulamalarının başlatıldığı larval yaşlar arasında belirgin bir bağlantı tespit edilemezken, MDHT banyo uygulamalarının başlatılması için en uygun larval yaşın %100 yumurta açılmasından 2 hafta (döllenenmeden itibaren 470 derece-gün) sonra olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu dönemde verilen 0.5 mg l⁻¹ çift MDHT banyosu erkek oranlarında istatistiki olarak en yüksek artışa (ortalama %57.4) sebep olmuştur. Bunlara ilaveten, banyo denemeleri gökkuşağı alabalığını erkekleştirmek için 0.5 mg l⁻¹ MDHT dozunun yeterli olduğunu, uygun larval gelişim aşamasında verildiğinde birden fazla MDHT banyosunun erkekleşme oranları üzerinde olumlu etki ettiğini ve MDHT banyolarının gökkuşağı alabalığında cinsiyet değişimini yönlendirmede MT banyolarından daha etkili olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 3). Ayrıca periyodik androjen banyo uygulamalarında 48 saat yerine, haftalık aralıklar kullanılmasının daha uygun olduğunu göstermiştir (Tablo 3).

Oral uygulamalar, ilk yemleme aşamasından itibaren 600 derece-gün süresince kilogramında 1-3 mg MT içeren yemlerle besleme, genotipik dişilerin tamamına yakınında gonadal gelişimi etkilemiş ve gonadal değişimin yönünü

Tablo 2. Farklı yaşlardaki keseli larvalara verilen 48 saat aralı 2-3 periyodik 11 β -hidroksandrostenedion (OHA) ve 17 α -metiltestosteron (MT) banyolarının gökkuşağı alabalığının cinsiyet oranları üzerine etkileri. Aynı sütunda farklı küçük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki belirgin farklar göstermektedir ($P<0.05$)

Table 2. Effects of administering 48 hours apart 2-3 periodic 11 β -hydroxyandrostenedione (OHA) and 17 α -methyltestosterone (MT) immersions at different pre-larval stages on sex ratios of rainbow trout. Means in the same column followed by different lower case letters are significantly different ($P<0.05$)

Uygulama Başındaki Larval Gelişim Aşaması	Uygulama Yoğunluğu	Androjen (Doz)	N (\pm SS)	% Ortalama Erkek (\pm SS)	% Ortalama Interseks (\pm SS)	% Toplam Etkilenen
%100 yumurta açılması	48 saat aralı 2 banyo	Kontrol OHA (0.5 mg l ⁻¹) MT (0.5 mg l ⁻¹)	91 (7) 103 (7) 87 (4)	58.0 (2.1) b 66.5 (3.5) b 76.0 (2.8) a	- - 2.5 (1.3) a	- 8.5 20.5
	48 saat aralı 3 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)	102 (5)	66.8 (2.7) b	1.0 (1.3) a	9.8
%100 yumurta açılmasından 1 hafta sonra	48 saat aralı 2 banyo	OHA (0.5 mg l ⁻¹) MT (0.5 mg l ⁻¹)	103 (10) 89 (3)	67.0 (1.4) b 75.5 (0.7) a	- -	9.0 17.5
	48 saat aralı 3 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)	104 (8)	56.9 (2.6) b	1.4 (0.6) a	10.3
%100 yumurta açılmasından 2 hafta sonra	48 saat aralı 2 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)	93 (4)	79.0 (1.5) a	2.1 (1.4) a	23.1

Tablo 3. Farklı yaşlardaki keseli larvalara verilen tek ya da 1 hafta aralı çift 17 α -metildihidrotestosteron (MDHT) ve 48 saat ya da 1 hafta aralı çift 17 α -metiltestosteron (MT) banyolarının gökkuşuğu alabalığının cinsiyet oranları üzerine etkileri. Aynı sütunda farklı küçük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

Table 3. Effects of administering single or 1 week apart double 17 α -methyl-dihydrotestosterone (MDHT) and 48 hours or 1 week apart double 17 α -methyltestosterone (MT) immersions at different pre-larval stages on sex ratios of rainbow trout. Means in the same column followed by different lower case letters are significantly different (P<0.05)

Uygulama Başındaki Larval Gelişim Aşaması	Uygulama Yoğunluğu	Androjen (Doz)	N (\pm SS)	% Ortalama Erkek (\pm SS)	% Ortalama İnterseks (\pm SS)	% Toplam Etkilenen
%100 yumurta açılmasından 1 hafta sonra	Tek banyo	Kontrol	96 (4)	1.2 (0.4) f	-	-
		MDHT (0.5 mg l ⁻¹)	95 (0)	11.6 (2.5) e	11.6 (3.0) a	22.0
		MDHT (1 mg l ⁻¹)	96 (5)	13.5 (1.5) e	5.4 (1.7) ab	17.7
1 hafta aralı 2 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)	MDHT (0.5 mg l ⁻¹)	98 (4)	28.1 (0.2) c	3.4 (1.5) b	30.3
		MDHT (0.5 mg l ⁻¹)	100 (2)	33.0 (1.0) b	6.4 (2.7) ab	38.2
48 saat aralı 2 banyo	MT (0.5 mg l ⁻¹)	107 (9)	20.9 (0.1) d	4.7 (0.9) ab	25.1	
%100 yumurta açılmasından 2 hafta sonra	Tek banyo	Kontrol	100 (8)	0.5 (0.4) f	-	-
		MDHT (0.5 mg l ⁻¹)	98 (3)	37.0 (3.6) b	2.8 (3.6) b	39.3
1 hafta aralı 2 banyo	MDHT (0.5 mg l ⁻¹)	96 (3)	57.9 (2.3) a	2.6 (2.3) b	60.0	
%100 yumurta açılmasından 3 hafta sonra	Tek banyo	MDHT (0.5 mg l ⁻¹)	98 (2)	29.7 (3.3) bc	2.5 (1.7) b	31.7

Tablo 4. Farklı dozlarda 17 α -metiltestosteron (MT) içeren yemlerle beslemenin gökkuşuğu alabalığının cinsiyet oranları üzerine etkileri. Aynı sütunda farklı küçük harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır (P<0.05)

Table 4. Effects of feeding with different dosages of 17 α -methyltestosterone (MT) containing diets on sex ratios of rainbow trout. Means in the same column followed by different lower case letters are significantly different (P<0.05)

Deneme Grubu	N (\pm SS)	% Ortalama Erkek (\pm SS)	% Ortalama İnterseks (\pm SS)
Kontrol	96 (6)	45.0 (2.1) b	-
3 mg MT/kg yem	93 (8)	99.5 (0.7) a	-
Kontrol	96 (4)	1.2 (0.4) c	-
3 mg MT/kg yem	92 (2)	98.0 (1.0) a	-
2 mg MT/kg yem	90 (3)	97.2 (2.6) a	2.8 (2.6) a
1 mg MT/kg yem	85 (2)	98.1 (2.8) a	1.0 (1.4) a

* Post larvalar ilk yemlemeden itibaren 600 derece-gün sürecince kilogramında 1-3 mg MT içeren yemlerle beslenmiştir (Starting from first feeding post larvae were feed 1-3 mg/kg MT containing diets for a duration of 600 degree-days)

değiştirmekte etkili olmuştur (Tablo 4). Yüzde ortalama erkek oranları %97.2-99.5 arasında değişmiş ve yemdeki MT miktarına bağlı herhangi bir farklılık göstermemiştir (P>0.05). Bununla birlikte, spermatogenezin başladığı 2. yaşta (266-699 g) yapılan tetkiklerde önemli oranlarda steril bireyin tespit edilmesi (Tablo 5), spermatogenez öncesi 7-8. aylarda yapılan değerlendirmelerde steril bireylerin erkek olarak sınıflandırıldığını işaret etmiştir. Steril bireylerin oranları ise yemdeki MT miktarıyla doğru orantılı bir artış göstermiştir (Tablo 5).

Spermatogenezin başladığı 2. yaşta yapılan tetkikler, oral uygulamaların %22'lere varan kısır birey oluşumuna sebep olduğunu gösterirken, hormon uygulamasına tabi tutulmayan kontrol populasyonlarının birinin de %2 oranında kısır birey içerdiğini ortaya koymuştur (Tablo 5). Ayrıca 48 saat aralıkla verilen kısa süreli MT banyolarının düşük oranlarda da olsa kısırlaşmaya sebep olabileceğini işaret etmiştir. Diğer yandan, oral uygulamalarda sperm kanalı gelişiminin yeme eklenen MT miktarına bağlı ol-

duğu ve kullanılan MT miktarı düştükçe kanallı erkek oranının arttığı görülmüştür. Bununla birlikte, fonksiyonel, sperm kanalına sahip ve abdominal masajla sperm toplanabilen erkekleştirilmiş dişi anaç üretmekte androjen banyolarının oral MT uygulamalarından daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Hormonlarla cinsiyetin başarılı bir şekilde yönlendirilmesi ve fonksiyonel olarak fenotipik cinsiyeti değiştirilmiş bireylerin elde edilmesi hormon uygulamalarının gelişime bağlı zamanlamasına, uygulamanın süresine, kullanılan hormonun türüne ve dozuna bağlıdır^{2,5,6}. Gonokorist balıkların sitolojik değişime uğramamış gamet hücreleri uzun süre cinsiyet hormonlarının etkisine duyarlı kalabilmektedir. Fakat hormon uygulamalarının gonadların sitolojik değişimden hemen önce başlatılması her zaman fonksiyonel cinsiyet değişimi ile sonuçlanmayabilir. Sito-

Tablo 5. Banyo ya da oral yolla verilen 11 β -hidroksiandrostenedion (OHA), 17 α -metiltestosteron (MT) ve 17 α -metildihidrotestosteron (MDHT) uygulamalarının gökkuşağı alabalığının gonad gelişimine etkileri

Table 5. Effects of immersion or oral 11 β -hydroxyandrostenedione (OHA), 17 α -methyltestosterone (MT) and 17 α -methyl-dihydrotestosterone (MDHT) administrations on gonadal development of rainbow trout

Deneme Grubu	Uygulama Başındaki Larval Gelişim Aşaması	Uygulama Yoğunluğu	% Ortalama Erkek (\pm SS)	N	% Ortalama Kanallı Erkek	% Ortalama Steril Birey
Kontrol	%100 yumurta açılması	48 saat aralı 2 banyo	45.0 (2.1)	100	98.0	2.0
OHA (0.5 mg l ⁻¹)	%100 yumurta açılması	48 saat aralı 2 banyo	66.5 (3.5)	50	82.0	2.0
	%100 yumurta açılmasından 1 hafta sonra		67.0 (1.4)			
MT (0.5 mg l ⁻¹)	%100 yumurta açılması	48 saat aralı 2 banyo	76.0 (2.8)	75	80.0	8.0
	%100 yumurta açılmasından 1 hafta sonra		75.5 (0.7)			
	%100 yumurta açılmasından 2 hafta sonra		79.0 (1.5)			
MDHT (0.5 mg l ⁻¹)	%100 yumurta açılmasından 1 hafta sonra	1 hafta aralı 2 banyo	33.0 (1.0)	50	90.0	-
	%100 yumurta açılmasından 2 hafta sonra	1 hafta aralı 2 banyo	57.9 (2.3)	75	96.0	-
3 mg MT/kg yem	Yeme yeni kalkan	-	99.5 (0.7)	75	44.0	20.0
3 mg MT/kg yem			98.0 (1.0)	100	18.0	22.0
2 mg MT/kg yem			97.2 (2.6)	100	35.0	13.0
1 mg MT/kg yem			98.1 (2.8)	100	53.0	3.0

lojik değişimden hemen önce başlatılan hormon uygulamalarının farklı balık türlerinde gonadların yalnızca gametik elementlerini etkilediği, ama somatik elementlerini değiştirmediği tespit edilmiştir^{13,18-20}. Çünkü gonadların somatik değişimi özellikle de gonadal kanal sisteminin oluşumu ve gonadal hücrelerin fizyolojik değişimi arasında zamanlama türlerine bağlı farklılıklar gösterebilmektedir¹⁴. Yani gökkuşağı alabalığında olduğu gibi sperm kanalları oluşmamış, morfolojik olarak testisten çok ovaryuma benzeyen ama yalnızca erkek üreme hücresi içeren gonadlar gelişebilir^{1,9,11}. Bu türlerde cinsiyetin fonksiyonel olarak değiştirilmesi ve üreme özellikleri ile fenotipik eşdeğerlerine benzer bireylerin oluşturulması, hormon uygulamalarının gonadların somatik değişimi sırasında başlatılmasını gerektirebilir.

Nitekim gökkuşağı alabalığının yakın akrabası olan ve gonadlarının sitolojik değişimi larvaların serbest yüzme aşamasına denk gelen Pasifik salmonlarında, *O. kisutch* ve *O. tshawytscha*^{21,22}, ilk yemlemeden itibaren oral yolla verilen steroidler çok çeşitli sonuçlar üretmiş ve genelde fenotipik cinsiyeti yönlendirmede başarısız olmuştur⁵. Gonadların somatik büyüme aşamasına denk gelen yumurtaların medyan açılması sırasında verilen 2 saatlik tek androjen veya östrojen banyoları ise fonksiyonel olarak tamamı erkek veya tamamı dişi popülasyonlar üretmekte başarılı olmuştur²¹⁻²³. Bu çok kısa steroid uygulamalarının yüksek başarısı uygulamaların gonadların fizyolojik olarak hormonların etkisine en açık olduğu dönemde verilmiş ol-

masına²² ve verilen steroidlerin salmon larvalarının nispeten büyük besin kesesi tarafından absorbe edilerek, banyo uygulamalarından çok sonra bile larvalara aktarılabilmesine bağlanmıştır²⁴.

Buna karşılık gonadların sitolojik değişimi larvaların serbest yüzmeye başladığı ay içerisinde gerçekleşen gökkuşağı alabalığı¹⁴⁻¹⁶ ve Atlantik salmonunda, *Salmo salar*^{2,5,14}, ilk yemlemeden itibaren yemle verilen androjen veya östrojenler, fenotipik cinsiyeti yönlendirmede başarılı sonuçlar üretmekle birlikte, bu uygulamayla erkekleştirilen bireylerde sperm kanalı oluşmadığı rapor edilmiştir^{1,10,11}. Bu durum uygulamaların zamanlamasıyla ilişkilendirildiğinden, gonadal değişimin hem somatik hem de sitolojik elementlerini etkileyebilmek için her iki türde de keseli larval dönemde banyo yoluyla steroid uygulamaları yapılmıştır. Atlantik salmonunda yapılan uygulamalar, yumurtaların medyan açılmasından sonra, 2-4. haftalarda (döllenmeden 570-690 derece-gün sonra) verilen 3 saatlik 2 adet 0.4 mg l⁻¹ MDHT banyosunun %100 erkek popülasyonlar üretmekte başarılı olduğunu göstermiştir²⁵. Ayrıca bu yolla üretilen erkekleştirilmiş dişilerin %84-92 oranında fonksiyonel, kanallı bireylerden oluştuğu rapor edilmiştir²⁵. Feist ve ark.'nın ön çalışmasında⁸ ise, gökkuşağı alabalığı yumurtalarına (açılmadan 1 hafta önce) ve larvalarına (medyan açılmada, açılmadan 1-2 hafta sonra) verilen 1-4 adet, 2 saatlik 0.4 mg l⁻¹ MT ya da OHA banyosunun %0-76 oranında erkekleşmeye sebep olduğu ve bu yolla erkekleştirilen dişilerin %60-100 oranında kanallı fonksi-

yonel bireylerden oluştuğu rapor edilmiştir. Ayrıca banyo uygulamaları için en uygun zamanın medyan açılmadan 1 hafta (döllenenmeden yaklaşık 425 derece-gün) sonra olduğu gözlenmiştir⁸. Buna karşılık bu çalışmada, en yüksek başarı döllenmeden sonraki 470-560 derece-gün'lerde verilen banyo uygulamalarında elde edilmiş ve MDHT banyolarının MT banyolarından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ama benzer şekilde, banyo yoluyla üretilen erkekleştirilmiş dişilerin yem uygulamalarına göre daha yüksek oranda (%80-96) fonksiyonel, kanallı bireylerden oluştuğu görülmüştür.

Banyo uygulamaları daha yüksek oranda fonksiyonel, kanallı erkek üretmekle birlikte, keseli larval dönemin değişik zamanlarında verilen banyo uygulamalarının hiçbiri gökkuşağı alabalığında tamamı veya tamamına yakını erkek popülasyonlar oluşturmakta başarılı olamamıştır. Pasifik veya Atlantik salmonlarındaki gibi popülasyondaki tüm bireylerin etkilenebildiği, eksternal androjenlerin etkisine duyarlılığın maksimum olduğu kısa kritik bir gelişim dönemine rastlanmamıştır. Diğer yandan, yumurta açılmasından-keseli larval dönemin son haftasına kadar (döllenenmeden itibaren 370-560 derece-gün arası) verilen tüm tek veya çift MT ve MDHT banyoları erkek oranlarında önemli artışa sebep olmuştur. Fakat yumurta açılmasından sonraki 2. ve 3. haftalarda (döllenenmeden sonraki 470-560 derece-gün'lerde) verilen çift MDHT banyosu aynı dönemde verilen tek banyo uygulamalarından daha etkili olmuştur. Keseli larval dönem sonrasında, uzun bir süreçte (600 derece-gün boyunca) oral yolla verilen MT ise genotipik dişilerin tamamına yakınında gonadal gelişimi etkilemiş ve gonadal değişimin yönünü değiştirmekte daha etkili olmuştur. Ayrıca yeme eklenen MT miktarı düştükçe, erkekleştirilen dişilerde sperm kanallı, fonksiyonel birey oranının arttığı (%18'den %53'e yükseldiği) gözlenmiştir. Benzer bir çalışmada da, yemdeki MT oranının 3 mg'dan 1 mg/kg'a düşürmenin fonksiyonel erkek oranını %26.4'ten %54.7'ye yükselttiği görülmüştür⁴. Bu sonuçlar, kanal oluşumu ve fonksiyonel cinsiyet değişiminin, uygulamanın zamanlaması yanında uygulamada kullanılan hormonun dozajı ile de ilgili olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca gökkuşağı alabalığında eksternal androjenlere en duyarlı periyodun döllenmeden sonraki 470 derece-gün civarında başlamakla birlikte, keseli larval dönem sonrasında da devam ettiğini işaret etmektedir. Dişi ovaryumlarında mayozun keseli larval dönemden sonraki haftalar içerisinde (800 derece-gün civarında) başladığı da¹⁵ göz önünde bulundurulursa, bu sonuçlar gökkuşağı alabalığında fonksiyonel monoseks erkek popülasyonlar üretmek için uygun androjen prosedürünün en azından döllenmeden sonraki 470-800 derece-gün'leri kapsayan, periyodik banyolar veya periyodik banyolar ve düşük dozlu oral uygulamalar şeklinde bir prosedür olması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Yumurtaların açılmasından bir hafta (döllenenmeden itibaren 420-450 derece-gün) sonra birer hafta yerine daha yakın (48 saat) aralıkla verilen MT banyolarında, banyo sayısı

artıkça erkekleşme oranlarının düştüğü görülmüştür. Banyo yoluyla verilen steroidler salmonid larvalarının nispeten büyük besin kesesi tarafından absorbe edilmektedir²⁴. Dolayısıyla sık periyotlarda androjen banyosu verilen larvalar, besin kesesinde birikim sonucu daha seyrek periyotlarda androjen banyosu verilen keseli larvalara göre daha yüksek dozajlarda androjene maruz kalmış olabilirler. Diğer yandan, birer hafta arayla verilen benzer konsantrasyonda MT banyolarında banyo sayısı arttıkça erkekleşme oranlarında azalma olduğu gözlemlenmiştir ve banyo uygulamalarının etkinsinin artan banyo sayısı ile azaldığı rapor edilmiştir⁸. Ama o çalışmada⁸, keseli larvalar daha yüksek su sıcaklığında (11.5°C) bakılmışlardır. Yüksek su sıcaklıklarında bakılan larvaların metabolik hızı ve besin kesesini tüketme süresi, dolayısıyla maruz kaldıkları gerçek androjen dozu, larvaların daha düşük bir sıcaklıkta (8.7±0.1°C) bakıldığı bu çalışmaya göre daha yüksek olmuş olabilir. MT östrojene aromatize olabilen bir androjen olduğundan²⁶, yüksek dozda MT verilen balıklarda aromatisasyon sonucu erkekleşme oranlarında düşüş ve hatta dişi oranlarında artışlar (paradoksal dişileşme) görülmüştür^{23,27,28}. Bu sebeple, periyodik MT banyo uygulamalarında gözlemlenen erkekleşme oranlarında azalma, banyo sayısından çok larvaların maruz kaldığı gerçek androjen dozajı ile bağlantılı olabilir.

Öte yandan, östrojene aromatize olabilen androjenlerin yüksek dozları kısa süreli uygulamalarda paradoksal dişileşmeye sebep olurken, tüm androjenlerin yüksek dozları uzun süreli uygulamalarda sterilizasyona (kısırlaşmaya) sebep olabilmektedirler^{5,6,27,28}. Çalışmamızda da uzun süreli yem uygulamalarında, yemdeki MT konsantrasyonu arttıkça kısır birey oranlarının arttığı gözlenmiştir. Daha ilginç, kısa süreli uygulama olarak düşünülebilecek MT banyo uygulamalarında kısır birey oranının, kontrol popülasyonunun üzerinde olduğunu gözlenmesidir. Bu durum banyo uygulamalarında kullanılan 0.5 mg l⁻¹ MT dozunun çalışmamızdaki gibi sık periyotlarda (48 saat arayla) verildiğinde, besin kesesinde birikim sonucu kısırlaşmaya sebep olabilecek kadar yüksek konsantrasyonlara ulaşabileceğini ve yüksek dozda kısa süreli uygulamalarında sterilizasyona sebep olabileceğini işaret etmektedir.

Salmonidlerde cinsiyet temelde ikili kromozomal ve dişi homogametik (XX/XY), genetik bir mekanizma tarafından belirlenmektedir²⁹. Bu tür bir mekanizmanın katı kontrolü altında, erkekleştirilmiş dişi yavrularının tamamının dişi olması beklenir. Fakat çalışmamızda, erkekleştirilmiş dişi gökkuşağı alabalığı yavruları arasında %0-2 oranında erkeklerin olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde salmonidlerde yapılan diğer çalışmalarda da erkekleştirilmiş dişi yavruları arasında az sayıda erkeğe rastlanmıştır^{8,25,30}. Bu durum, balıklarda cinsiyete etki eden genlerin spesifik kromozomlar üzerinde toplanarak cinsiyet kromozomlarını oluşturmasını, yani cinsiyet kromozomu evrimini tamamlamış olmasına ve otozomal kromozomlar üzerindeki gen veya genlerinde cinsiyeti belirlemede etkili olabile-

sine bağlanmaktadır²⁹⁻³¹. Bu koşullar altında, tamamı dişi populasyonlar üretebilmek ancak üretimde kullanılacak anaçların cinsiyeti etkileyen bu otozomal gen veya genlere karşı seçilimi ile mümkün olabilecektir. Monoseks dişi populasyonlar üretmek isteyen üreticiler anaç olarak kullandıkları dişi ya da erkekleştirilmiş dişilerin %100 dişi yavrular ürettiğini takip etmeli ve yavruları %100 dişi olmayan bireyleri anaç populasyonundan çıkarmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için ana finansal destek Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 104V134 nolu proje kapsamında sağlanmıştır. Projenin destekleyici kuruluşu olan Önder Alabalık Şirketi saha çalışmaları için fiziki alan sağlamak yanında, yavru, yem ve işçilik anlamında projeye finansal katkıda bulunmuştur. Yazar ticari bir işletmenin yoğun üretim baskısı altında, böylesine uzun soluklu bir araştırmada desteklerini esirgemeyen tüm Önder Alabalık ailesine ve özellikle Su Ürünleri Müh. Aytaç Levent IŞIK'a teşekkürü bir borç bilir.

KAYNAKLAR

1. **Bye VJ, Lincoln RF:** Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 57, 299-309, 1986.
2. **Piferrer F:** Endocrine sex control strategies for feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197, 229-281, 2001.
3. **Piferrer F, Beaumont A, Falguiere JC, Flajshans M, Haffray P, Colombo R:** Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293, 125-156, 2009.
4. **Arslan T, Güven E, Baltacı MA:** Hormonal cinsiyet dönüşüm metodu kullanarak monoseks gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl-B): S361-S368, 2010.
5. **Hunter GA, Donaldson EM:** Hormonal Sex Control and Its Application to Fish Culture. In, Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds): *Fish Physiology*. Vol: 9B, pp. 223-291, Academic Press, New York, 1983.
6. **Pandian TJ, Sheela SG:** Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138, 1-22, 1995.
7. **Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI:** Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197, 283-301, 2001.
8. **Feist G, Yeoh CH, Fitzpatrick M, Schreck CB:** The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, 131, 145-152, 1995.
9. **Johnstone R, Simpson TH, Youngson HF:** Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, 13, 115-134, 1978.
10. **Cousin-Gerber M, Burger G, Boisseau C, Chevassus B:** Effect of methyltestosterone on sex differentiation and gonad morphogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Living Resour*, 2, 230-255, 1989.
11. **Van Der Hurk R, Van Oordt PGWJ:** Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocr*, 57, 216-222, 1985.
12. **Geffen AJ, Evans JP:** Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182, 61-72, 2000.
13. **Van Der Hurk RJ, Slof GA:** A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res*, 218, 487-497, 1981.
14. **Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, Nagahama Y:** Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J Exp Zool*, 281, 362-372, 1998.
15. **Baron D, Houlgatte R, Fostier A, Guiguen Y:** Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod*, 73, 959-966, 2005.
16. **Krisfalusi M, Nagler JJ:** Induction of gonadal intersex in genotypic male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos following immersion in estradiol-17 β . *Mol Reprod Dev*, 56, 495-501, 2000.
17. **Guerrero RD, Shelton WL:** An aceto-carmine squash method for sexing juvenile fishes. *The Prog Fish-Cult*, 36, 56, 1974.
18. **Arslan T, Phelps RP, Osbourne JA:** Effects of oestradiol-17 β or 17 α -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). *Aquacult Res*, 40, 1813-1822, 2009.
19. **Goetz FW, Donaldson EM, Hunter GA, Dye HM:** Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 17, 267-278, 1979.
20. **Malison JA, Kayes TB, Best CD, Amudson CH, Wenworth BC:** Sexual differentiation and use of hormones to control sex in yellow perch (*Perca flavescens*). *Can J Fish Aquat Sci*, 43, 26-35, 1986.
21. **Piferrer F, Donaldson EM:** The comparative effectiveness of the natural and a synthetic estrogen for the direct feminization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 106, 183-193, 1992.
22. **Piferrer F, Donaldson EM:** Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen and estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, 77, 251-262, 1989.
23. **Piferrer F, Baker IJ, Donaldson EM:** Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen Comp Endocr*, 91, 59-65, 1993.
24. **Piferrer F, Donaldson EM:** Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 β and testosterone during the early development of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), including eggs, alevins and fry. *Fish Physiol Biochem*, 13, 219-232, 1994.
25. **Lee P, King H, Pankhurst N:** Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. *North Am J Aquacult*, 66, 1-7, 2004.
26. **Crim LW, Peter RE, Bilar R:** Onset of gonadotropic hormone accumulation in immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. *Gen Comp Endocr*, 44, 374-38, 1981.
27. **Piferrer F, Carillo M, Zanuy S, Solar II, Donaldson E M:** Induction of sterility in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by androgen immersions before first feeding. *Aquaculture*, 119, 409-423, 1994.
28. **Solar II, Donaldson EM, Hunter GA:** Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture*, 42, 129-133, 1984.
29. **Devlin RH, Nagahama Y:** Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191-364, 2002.
30. **Quillet E, Aubard G, Quesu I:** Mutation in a sex-determining gene in rainbow trout: Detection and genetic analysis. *J Hered*, 93, 91-99, 2002.
31. **Scheerer PD, Thorgaard GH, Allendorf F:** Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. *J Exp Zool*, 260, 382-390, 1991.