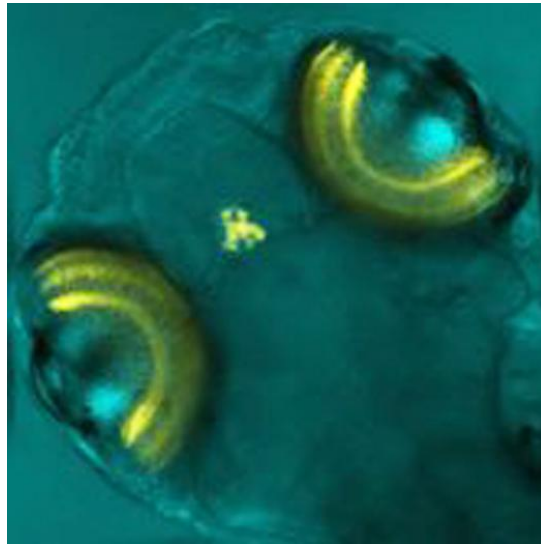




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΠΟΡΩΝ

**“Επίδραση του περιβάλλοντος πρόωμης ανάπτυξης στην
ποιότητα των ιχθυδίων του zebrafish (*Danio rerio*)”**



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ηλιοπούλου Μαρία

A.M.: 617

Ηράκλειο, 2014

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ηλιοπούλου Μαρία

Υπεύθυνος καθηγητής:

Κουμουνδούρος Γ. (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Κεντούρη Μ. (Καθηγήτρια)

Κουμουνδούρος Γ. (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Παυλίδης Μ. (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Περιεχόμενα

Πρόλογος-Ευχαριστίες	v
Εισαγωγή	1
1. Ποιότητα των εκτρεφόμενων ιχθυδίων	2
1.2. Φαινοτυπική πλαστικότητα	3
1.3. Φαινοτυπική πλαστικότητα στα ψάρια	6
1.4. Καταπόνηση	8
1.5. Απόκριση στην καταπόνηση	10
1.6. Zebrafish	15
1.7. Φαινοτυπική πλαστικότητα στο zebrafish	17
1.8. Απόκριση του zebrafish στην καταπόνηση	18
Σκοπός της μελέτης	21
Μέθοδοι και Υλικά	22
2.1. Εκτροφή πειραματικών πληθυσμών	23
2.2. Εγκλιματισμός	24
2.3. Συνθήκες εκτροφής	25
2.4. Δειγματοληψίες.....	25
2.5. Ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR)	26
2.6. Επιβίωση	27
2.7. Δοκιμασία καταπόνησης.....	27
2.8. Ανάλυση Δειγμάτων	28
2.8.1. Εκχύλιση κορτιζόλης.....	28
2.8.2. Ανοσοενζυμική ανάλυση ELISA	29
2.9. Στατιστική Ανάλυση	30
Αποτελέσματα	31
3.1. Δυναμική της κορτιζόλης	32
3.2. Συσχέτιση βάρους κορτιζόλης.....	34
3.3. Αύξηση τυπικού μήκους ως προς την ηλικία	36
3.4. Ρυθμός επιβίωσης.....	37
Συζήτηση	39
4.1. Τιμές αναφοράς της κορτιζόλης (baseline values) σε ιχθύδια zebrafish.....	40
4.2. Δυναμική της απόκρισης στην καταπόνησης	43
4.3. Ενδοπληθυσμιακή ποικιλομορφία στην απόκριση	47
4.4. Σχέση κορτιζόλης βάρους.....	48

4.5. Ρυθμός αύξησης.....	50
4.5. Ρυθμός επιβίωσης.....	53
Συμπεράσματα	54
Βιβλιογραφία	56
Περίληψη.....	66
Abstract	68

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή μου διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας του Πανεπιστημίου της Κρήτης, με υπεύθυνο καθηγητή τον κύριο Κουμουνδούρο Γ., Αναπληρωτή Καθηγητή. Θα ήθελα λοιπόν, αρχικά να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτήν την διατριβή υπό την επίβλεψη του, για τα μέσα που μου εξασφάλισε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης αλλά και για την καθοδήγηση και τις πάντα εύστοχες συμβουλές του. Τον ευχαριστώ θερμά για αυτήν την συνεργασία και τις γνώσεις που αποκόμισα. Καθώς μέρος των αναλύσεων πραγματοποιήθηκε και στο εργαστήριο της Βιοχημείας της Ιατρικής, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κυρία Παπακωνσταντή Ε., που με φιλοξένησε στο εργαστήριό της για την πραγματοποίηση των ανοσοενζυμικών αναλύσεων και ήταν πάντα πρόθυμη να μου απαντήσει σε όποιες απορίες είχα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κύριο Παυλίδη Μ. και την κυρία Κεντούρη Μ. που ήταν στην συντονιστική επιτροπή της διατριβής μου, για τον χρόνο και τις συμβουλές τους.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου που από την πρώτη μέρα με βοήθησαν, με εξοικείωσαν με το εργαστήριο και τις τεχνικές του, με στήριζαν, και τελικά γίναμε και φίλοι. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναστασία, η οποία με βοήθησε σε τεχνικό επίπεδο κατά την διάρκεια των αναλύσεων μου και ήταν πάντα εκεί όποτε την είχα ανάγκη με υπομονή και ενδιαφέρον. Πέραν αυτού, ήταν πάντα εμψυχωτική και μια καλή φίλη. Ως προς εσένα αγαπημένη μου Μαρία, σε ευχαριστώ και εσένα ιδιαίτερα για όλες τις φορές που με βοήθησες και για τις πολλές απορίες που κατά καιρούς μου έλυνες, καθώς και που με έκανες πάντα να γελάω. Θέλω όμως να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου τα οποία πάντα δημιουργούσαν ένα ευχάριστο κλίμα εντός του εργαστηρίου και πάντα ήταν πρόθυμα να βοηθήσουν. Ο λόγος για εσάς παιδιά Νατάσκι (σε ευχαριστώ για τις στιγμές εντός και εκτός εργαστηρίου), Στέφανε, Σταυρούλα, Μαρία, Χάρη, Αγγελική και προσφάτως και Γιάννα (ήταν υπέροχο που έστω και στο τέλος σε γνώρισα). Σας ευχαριστώ όλους, δεν είχα μόνο άριστη συνεργασία αλλά και την τύχη να κάνω νέους και καλούς φίλους. Για λόγους συντομίας και μόνο, σας ευχαριστώ μαζικά, παρότι τον καθένα ξεχωριστά για την ξεχωριστή σχέση που έχω με καθέναν σας.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου, που ήταν πάντα υποστηρικτικοί, με επαινούσαν και ενθάρρυναν και θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις φίλες μου Βάγια και Μαρία που ήταν καθημερινά στο πλευρό μου, εμψυχωτικές, με χιούμορ, αγάπη, πολύτιμες συμβουλές και κατανόηση.

Τέλος, θέλω φυσικά να ευχαριστήσω την βάση μου και το πρότυπο μου, την οικογένεια μου, που ήταν και σε αυτό το βήμα μου καθημερινά στο πλευρό μου, με αμέριστη κατανόηση, αγάπη και υπομονή, όπως πάντα. Ελπίζω να εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στη ζωή μου, και να μη τους απογοιτητεύσω ποτέ.

Η υλοποίηση του μεταπτυχιακού προγράμματος συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου(ΕΚΤ) και του ΕΣΠΑ, 2007-2013.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Στην Πόπη

Εισαγωγή



1. Ποιότητα των εκτρεφόμενων ιχθυδίων

Η ποιότητα των ψαριών διαφέρει στον ορισμό και τους δείκτες αυτής αναλόγως του πρίσματος: καταναλωτής – παραγωγός. Υπό το πρίσμα του καταναλωτή οι δείκτες ποιότητας αφορούν στην καταλληλότητα (wholesomeness), ακεραιότητα (integrity), φρεσκότητα (freshness), διατροφική αξία, εμφάνιση (εξωτερική και εσωτερική), παραμορφώσεις, υφή και στην γεύση (Grigorakis 2007).

Από την πλευρά του παραγωγού, η ποιότητα σχετίζεται τόσο με τα κριτήρια που θέτει ο καταναλωτής αλλά και με άλλα που σχετίζονται κυρίως με το κόστος παραγωγής. Στα τελευταία συμπεριλαμβάνονται ο ρυθμός αύξησης, η μετατρεψιμότητα της τροφής (food conversion efficiency), η ομοιογένεια των πληθυσμών, η αντίσταση σε ασθένειες, η κυτταρική των μυών και η ανθεκτικότητα στο στρες. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι κάποια από τα κριτήρια που θέτει ο παραγωγός με σκοπό την ελαχιστοποίηση των παραγόντων που θα αλλοίωναν τη ποιότητα των εκτρεφόμενων πληθυσμών και θα διασφάλιζαν την αύξηση της εμπορικής αξίας του τελικού προϊόντος (Χρίστου 2013).

Καθώς η ανθεκτικότητα στο στρες συνιστά έναν από τους δείκτες ποιότητας, κυρίως από την πλευρά του παραγωγού, γιατί τεκμηριωμένα το στρες μπορεί να αναστείλει την αύξηση, την αναπαραγωγή και την ανθεκτικότητα σε παθογόνα (Bonga 1997), είναι ιδιαιτέρως χρήσιμο να μελετηθεί η απόκριση στην καταπόνηση σε οργανισμούς μοντέλα (έτσι ώστε να μπορούν να υπάρξουν γενικεύσεις και για άλλα είδη) σε βάθος χρόνου, αλλά και κυρίως το πώς αυτή επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της εκτροφής.

Οι μεταβολές του περιβάλλοντος μπορούν να δράσουν άμεσα επηρεάζοντας την απόδοση και επιβίωση των ψαριών (π.χ. θερμοκρασία του νερού, τροφή, αφθονία θηρευτών) ή μπορούν να έχουν έμμεση δράση επάγοντας φαινοτυπική ποικιλομορφία ψάρια (Blaxter 1992, Chambers & Leggett 1996, Fuiman *et al.* 1998). Η μελέτη της φαινοτυπικής πλαστικότητας μέχρι στιγμής έχει προταθεί ως μία πολύ αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου χαρακτήρων ποιότητας όπως για παράδειγμα το σχήμα σώματος (Georga & Koumoundouros 2010), το φύλο των ατόμων (Pavlidis *et al.* 2000), την κυτταρική των μυών (Johnston *et al.* 2009) αλλά και άλλους που θα αναλυθούν εκτενέστερα αργότερα.

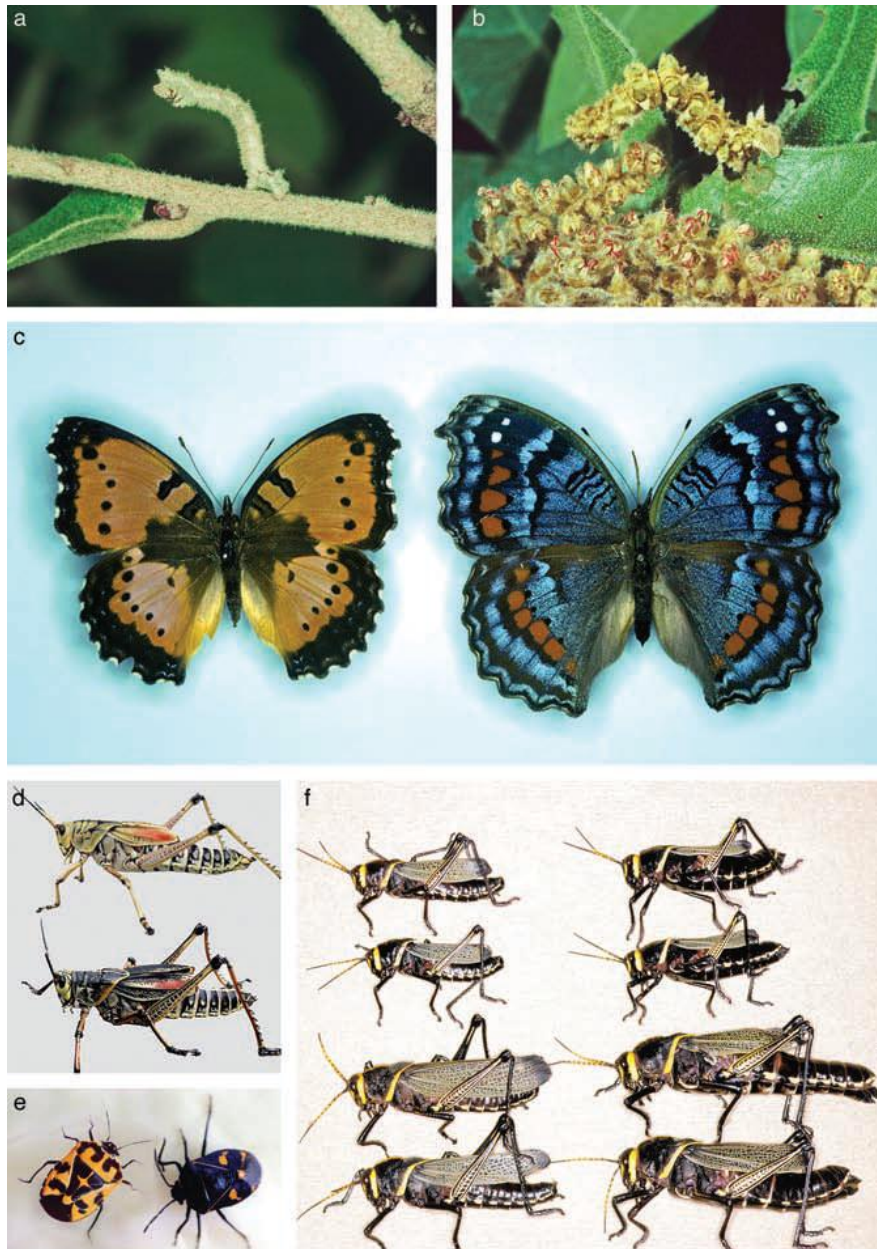
1.2. Φαινοτυπική πλαστικότητα

Η “φαινοτυπική πλαστικότητα” περιγράφει την ικανότητα ενός γονότυπου να παράγει μία ποικιλία φαινοτύπων ως απόκριση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτή η απόκριση μπορεί να εκφραστεί σε μορφολογικό, βιοχημικό, φυσιολογικό, αναπτυξιακό επίπεδο, ή ακόμα και στη συμπεριφορά του οργανισμού (Fuiman *et al.* 1998, Agrawal 2001, Gilbert 2001, Pigliucci *et al.* 2006). Η φαινοτυπική πλαστικότητα θεωρείται πως διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο σε εξελικτικό όσο και οικολογικό επίπεδο, διότι γενικώς θεωρείται προσαρμοστικός μηχανισμός, βελτιστοποιώντας την φυσική κατάσταση του οργανισμού σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Pigliucci *et al.* 2006). Η σημασία της φαινοτυπικής πλαστικότητας υπογραμμίζεται από το γεγονός πως επηρεάζοντας την φαινοτυπική έκφραση ενός μοναδικού γονότυπου, το περιβάλλον ελέγχει τους φαινότυπους που υπόκεινται στην φυσική επιλογή (West-Eberhard 1989).

Από την άποψη της προσαρμοστικής εξέλιξης της πλαστικότητας, ένας σημαντικός διαχωρισμός αφορά στις άμεσες και τις έμμεσες επιδράσεις του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη. Στην πρώτη περίπτωση, η πλαστικότητα οφείλεται στην επίδραση των περιβαλλοντικών μεταβλητών που επηρεάζουν μία αναπτυξιακή ή μία φυσιολογική διεργασία (π.χ. η θερμοκρασία μπορεί άμεσα να επηρεάζει τις αναπτυξιακές διεργασίες επηρεάζοντας την κινητική μίας χημικής αντίδρασης και τις φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών). Σε αυτές τις περιπτώσεις η πλαστικότητα είναι πιθανότατα μη προσαρμοστική. Αλλιώς, πρόκειται για τις έμμεσες επιπτώσεις του περιβάλλοντος, όπου το ερέθισμα επάγει αποκρίσεις οι οποίες μεσολαβούνται από άλλα φυσιολογικά και αναπτυξιακά γεγονότα. Έτσι, οι περιβαλλοντικές συνθήκες που προκαλούν έναν φαινότυπο δεν είναι ανάγκη να είναι οι ίδιες στις οποίες ο φαινότυπος θα εκφραστεί ως προσαρμογή. Συνεπώς, στις έμμεσες επιδράσεις υπάρχει καθυστέρηση ανάμεσα στο περιβαλλοντικό ερέθισμα και την σηματοδότηση αναπτυξιακής απόκρισης (Fusco & Minelli 2010).

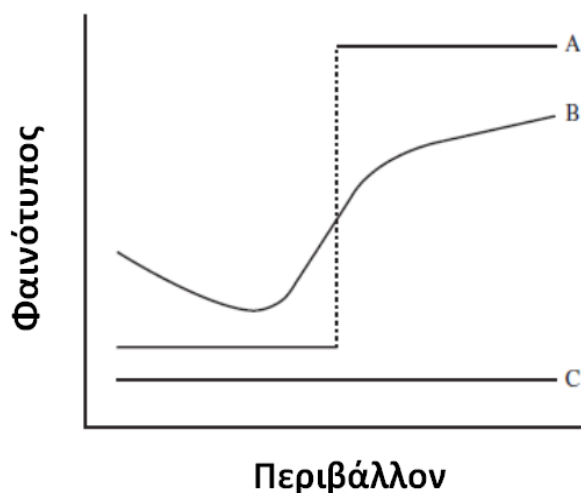
Καθώς δεν υπάρχει μόνο ένας φαινότυπος που να προκύπτει από έναν γονότυπο, ο φαινότυπος που προκύπτει από το ερέθισμα που δίνεται από το περιβάλλον καλείται “μορφή” (morph). Όταν η φαινοτυπική πλαστικότητα συνθέτει ένα συνεχές φάσμα φαινοτύπων από έναν μοναδικό γονότυπο ως απόκριση σε ένα εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, τότε αυτό το φάσμα καλείται “πρότυπο αντίδρασης” (reaction norm, Gilbert 2001). Το πρότυπο αντίδρασης είναι συνάρτηση

του γονοτύπου και διαφορετικοί γονότυποι αναμένεται να διαφέρουν ως προς την κατεύθυνση και το μέγεθος της πλαστικότητας που μπορούν να εκφράσουν. Όταν ωστόσο, το φάσμα φαινοτύπων που προκύπτει σε έναν πληθυσμό είναι ασυνεχές, τότε πρόκειται για το φαινόμενο του “πολυφαινισμού” (polyphenism, May 1963). Αυτός μπορεί να προκληθεί από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διατροφή, η εποχή, η πυκνότητα του πληθυσμού και η παρουσία θηρευτή (Gilbert 2001) (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Διαφορετικοί μορφολογικοί φαινότυποι στα έντομα. Διακριτοί εποχιακοί πολυφαινισμοί στην κάμπια *Nemoria arizonaria* (a,b). Πολυφαινισμός επαγόμενος από εποχές νηρασίας-ξηρασίας στην πεταλούδα *Precis octavia* (c), από την θερμοκρασία εκτροφής στην ακρίδα *Romalea microptera* (d), και στο έντομο *Murgantia histrionica* (e), και από την διατροφή στην ακρίδα *Taeniopoda eques* (αριστερά: αρσενικά- δεξιά: θηλυκά) (f). Από Whitman & Agrawal (2009).

Ο όρος “πλαστικός χαρακτήρας” παρουσιάζει ένα πρότυπο αντίδρασης με αρκετά μεγάλο πεδίο τιμών, ενώ ένας μη πλαστικός χαρακτήρας παρουσιάζει μία τιμή η οποία δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον (επίπεδο πρότυπο αντίδρασης) (Εικ. 2). Ένας μη πλαστικός χαρακτήρας λέγεται και “μονοφαινικός”. Ο όρος “πλαστικός” συνήθως σχετίζεται με έναν χαρακτήρα αλλά μπορεί ακόμα να αναφέρεται σε ένα φυσικό πληθυσμό, σε ένα εργαστηριακό στέλεχος ή και σε ένα είδος (Fusco & Minelli 2010).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των προτύπων αντίδρασης για τρεις χαρακτήρες (A, B, C). Οι χαρακτήρες A, B είναι πλαστικοί, ενώ ο C είναι μη πλαστικός. Ο A είναι πολυφαινικός ενώ ο C μονοφαινικός. Τροποποίηση από Fusco & Minelli (2010).

Η πλαστικότητα μπορεί να κατηγοριοποιηθεί με πολλούς τρόπους βασισμένη στον υπό μελέτη χαρακτήρα (π.χ. μορφολογική, φυσιολογική, συμπεριφορική), την φύση του περιβαλλοντικού παράγοντα (π.χ. διατροφή, πληθυσμιακή πυκνότητα, θερμοκρασία, φωτοπερίοδο) και το οικολογικό περιεχόμενο (Fusco & Minelli 2010). Ο τύπος και ο βαθμός της πλαστικότητας είναι συγκεκριμένος και ανάλογος με τα χαρακτηριστικά του κάθε ατόμου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ένας χαρακτήρας για παράδειγμα μπορεί να είναι πλαστικός ως προς την θερμοκρασία αλλά όχι και ως προς την διατροφή (Pigliucci 2006).

Τα διάφορα είδη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς τον χρόνο μέχρι τον οποίο μπορούν να αποκρίνονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Κάποια είδη μπορούν να αποκρίνονται καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους. Σε κάποια άλλα, οι αναπτυξιακές διεργασίες δημιουργούν πολύ συγκεκριμένους χρόνους όπου είναι εφικτή η πλαστικότητα (Whitman & Agrawal 2009). Αυτό συμβαίνει, χαρακτηριστικά για παράδειγμα, στα αρθρόποδα καθώς έχουν πολύ συγκεκριμένα και διακριτά στάδια ανάπτυξης (π.χ. την μεταμόρφωση) και λόγω της ύπαρξης του

εξωσκελετού, μετά τον σχηματισμό του οποίου, αυτός δεν είναι εφικτό να αλλάξει (Frankino & Raff 2004).

Η συνολική ποικιλομορφία, όπως προαναφέρθηκε είναι συνιστώσα δύο παραγόντων, του γονοτύπου, του περιβάλλοντος, αλλά επιπλέον και ενός τρίτου παράγοντα, της αλληλεπίδρασης αυτών των δύο. Η σχετική συνεισφορά αυτών των παραγόντων στην συνολική φαινοτυπική ποικιλομορφία εκφράζεται με τη σχέση $V_p = V_g + V_e + V_e * g$, όπου V_p η φαινοτυπική ποικιλομορφία, V_g η οφειλόμενη στην γενετική, V_e η οφειλόμενη στο περιβάλλον και $V_e * g$ η οφειλόμενη στην αλληλεπίδραση γονοτύπου και περιβάλλοντος (Fusco & Minelli 2010).

1.3. Φαινοτυπική πλαστικότητα στα ψάρια

Τα ψάρια είναι μία ιδιαιτέρως πλαστική ομάδα που μπορεί να τροποποιεί τον φαινότυπο της ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Polo *et al.* 1991, Johnston *et al.* 2001, Koumoundouros *et al.* 2002). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (π.χ. η θερμοκρασία του νερού, η τροφή και η αφθονία των θηρευτών) μπορούν να επηρεάσουν την επίδοση και την επιβίωση των ψαριών άμεσα μέσω αποκρίσεων εγκλιματισμού, όσο και έμμεσα μέσω της επαγόμενης από το περιβάλλον φαινοτυπικής πλαστικότητας (Blaxter 1992, Chambers & Leggett 1996, Fuiman *et al.* 1998).

Στους τελεόστεους, υψηλά επίπεδα φαινοτυπικής πλαστικότητας επαγόμενα από το περιβάλλον έχουν περιγραφεί κυρίως κατά τα πρώτα οντογενετικά στάδια. Οι Polo *et al.* (1991) βρήκαν πως η **θερμοκρασία ανάπτυξης** μεταβάλλει τον χρονισμό ανάπτυξης αυγών και νυμφών στην τσιπούρα *Sparus aurata*, επηρεάζοντας το μήκος σώματος στο οποίο συμβαίνουν τα διάφορα οντογενετικά γεγονότα. Οι Georga *et al.* (2011) κατέληξαν πως τα **διατροφικά επίπεδα βιταμίνης Α** κατά την διάρκεια της νυμφικής περιόδου καθορίζουν το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων λαβρακιού. Ακόμα, έχει φανεί πως και η ταχύτητα της ροής του νερού επάγει διαφορετικούς μορφολογικούς φαινοτύπους. Οι Imre *et al.* (2002) βρήκαν πως η διαφορετική **ταχύτητα ροής του νερού** επηρέασε την μορφολογία του ουραίου πτερυγίου σε ιχθύδια *Salvelinus fontinalis*.

Ανάμεσα σε όλους τους φυσικούς παράγοντες που επηρεάζουν το υδάτινο περιβάλλον η **θερμοκρασία** αποτελεί ίσως τον πιο σημαντικό αβιοτικό παράγοντα,

επιδρώντας τόσο στην συμπεριφορά όσο και στην φυσιολογία των ατόμων (Brett 1971). Η θερμοκρασία μπορεί να αποτελέσει παράγοντα θνησιμότητας όταν ξεπεραστούν τα φυσιολογικά όρια ανοχής του κάθε είδους, βλάπτοντας την υγεία, αυξάνοντας τον μεταβολικό ρυθμό, την κατανάλωση οξυγόνου και μειώνοντας την ανθεκτικότητα σε παθογόνα, κάτι το οποίο μπορεί στο τέλος να οδηγήσει στον θάνατο των ψαριών (Gordon 2005, Dalvi *et al.* 2009).

Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν την θερμική ανοχή στα ψάρια δύο είναι οι σημαντικότεροι. Ο εγκλιματισμός και η γενετική (Lutterschmidt & Hutchison 1997, Beitinger *et al.* 2000). Η θερμοκρασία εγκλιματισμού επηρεάζει τόσο τα μέγιστα όσο και τα κατώτερα θερμοκρασιακά όρια ανοχής των ψαριών. Έτσι λοιπόν, η θερμοκρασιακή ιστορία επηρεάζει πολύ σημαντικά την θερμική ανοχή των ψαριών (Beitinger & Bennett 2000). Γενικά καθώς η θερμοκρασία εγκλιματισμού αυξάνεται, τόσο τα κατώτερα όσο και τα ανώτερα όρια ανοχής αυξάνονται επίσης (Beitinger & Bennett 2000). Πέραν όμως του εγκλιματισμού και της γενετικής, ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας είναι η αναπτυξιακή πλαστικότητα των ψαριών. Η αναπτυξιακή πλαστικότητα ορίζεται ως οι μόνιμες αλλαγές που επάγονται στον φαινότυπο από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την διάρκεια της ανάπτυξης (Kinne 1962).

Οι Schaefer & Ryan (2006) μελετώντας την αναπτυξιακή πλαστικότητα του είδους *Danio rerio* στην θερμοκρασία των 24 °C και 28 °C και σε αυξομειώσεις αυτών, παρατήρησαν πως η θερμοκρασία εγκλιματισμού επηρεάζει την θερμική ανοχή του είδους, και πιο συγκεκριμένα τα ψάρια που εκτράφηκαν στους 28 °C επέδειξαν υψηλότερη θερμική ανοχή σε σύγκριση με αυτά των 24 °C. Παρατηρήθηκε ακόμα, πως οι πληθυσμοί που εκτράφηκαν σε περιβάλλον με θερμοκρασιακές διακυμάνσεις επέδειξαν μεγαλύτερη θερμική ανοχή εν συγκρίσει με αυτούς που εκτράφηκαν σε σταθερή θερμοκρασία. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν πως εκτός από την θερμοκρασία εγκλιματισμού, οι μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν επίσης να επάγουν αναπτυξιακή πλαστικότητα και πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψη.

Η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι ένας από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επάγουν πλαστικότητα στα ψάρια, είτε τροποποιώντας προσωρινά τον **χρονισμό της ανάπτυξης** (Johnston *et al.* 2001, Koumoundouros *et al.* 2001, Green & Fisher 2004) είτε επάγοντας μόνιμες αλλαγές στο **φύλο** (Conover & Heins 1987, Koumoundouros *et al.* 2002), στους **μεριστικούς**

χαρακτήρες (Lindsey 1988, Georgakopoulou *et al.* 2007) και στον **αριθμό των μυϊκών ινών** (Albokhadaim *et al.* 2007, Johnston *et al.* 2009, Garcia de la serrana *et al.* 2012).

Οι Pavlidis *et al.* (2000) μελετώντας την φαινοτυπική πλαστικότητα στο λαβράκι βρήκαν πως η θερμοκρασία που εφαρμόζεται ως τα μέσα της μεταμόρφωσης είναι πολύ σημαντικός παράγοντας φυλοκαθορισμού των ατόμων. Ακόμη, οι Koumoundouros *et al.* (2002) μελετώντας την επίδραση της θερμοκρασίας σε ιχθύδια λαβρακιού, κατέληξαν πως οι διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες επάγουν διαφορές στην κολυμβητική επίδοση του είδους. Οι Stickland *et al.* (1998) βρήκαν πως η θερμοκρασία που εφαρμόζεται κατά την πρώιμη ανάπτυξη επηρεάζει τον αριθμό αλλά και την κατανομή των λευκών μυϊκών ινών κατά την εκκόλαψη.

Οι περισσότερες μελέτες ως τώρα που επικεντρώνονται στην φαινοτυπική πλαστικότητα, εκτός από αυτές που αφορούν στο φύλο και τους μεριστικούς χαρακτήρες, εστιάζουν το ενδιαφέρον τους σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Πλέον υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν δείξει πως οι περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια επηρεάζουν τον μετέπειτα φαινότυπο και τις λειτουργικές ικανότητες των ατόμων (Georgakopoulou *et al.* 2007, Johnston, Lee *et al.* 2009, Scott & Johnston 2012, Scott *et al.* 2012). Με δεδομένη την επίδραση της θερμοκρασίας και την επαγωγή της πλαστικότητας σε μεταγενέστερο στάδιο, έτσι και στην παρούσα μελέτη, εξετάζεται επίσης η επίδραση του περιβάλλοντος κατά την πρώιμη ανάπτυξη, στο στάδιο των ιχθυδίων.

1.4. Καταπόνηση

Ο ορισμός της καταπόνησης και των παραγόντων καταπόνησης χαρακτηρίζεται από πολλές αμφισβητήσεις και διχογνωμίες στο πέρασμα του χρόνου βιβλιογραφικά. Η καταπόνηση ή κοινώς το στρες ορίζεται ως η συνθήκη κατά την οποία η δυναμική ισορροπία των οργανισμών, που καλείται ομοιόσταση, απειλείται ή διαταράσσεται ως αποτέλεσμα ενδογενών ή εξωγενών ερεθισμάτων, που ορίζονται ως παράγοντες καταπόνησης (Chrousos & Gold 1992). Μία συνήθης παρεξήγηση που πλανάται είναι πως η καταπόνηση είναι καταστροφική για τον οργανισμό. Κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει πάντα καθώς η απόκριση στο στρες δεν είναι παρά ένας προσαρμοστικός μηχανισμός, ο οποίος επιτρέπει στον οργανισμό να αντιμετωπίσει τον παράγοντα καταπόνησης ώστε να διατηρήσει την ομοιόστασή του (ανασκόπηση Barton 2002).

Πιο απλά, δηλαδή, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε την καταπόνηση σαν μία κατάσταση που απειλεί την ομοιόσταση και ως αποτέλεσμα αυτού επάγεται μία σειρά προσαρμοστικών αποκρίσεων (Chrousos 1998).

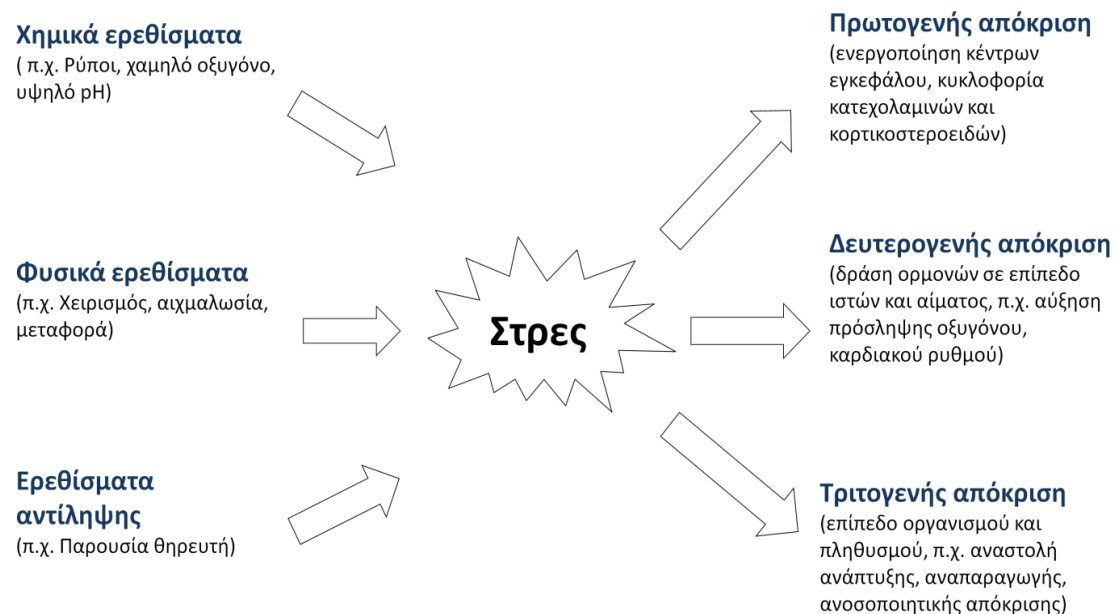
Οι παράγοντες καταπόνησης έχουν διττή δράση: αφενός επάγουν την διαταραχή ή απειλή της ομοιοστατικής ισορροπίας, και αφετέρου προκαλούν μια σειρά συμπεριφορικών και φυσιολογικών αποκρίσεων που είναι αντισταθμιστικές ή και προσαρμοστικές επιτρέποντας στον οργανισμό να ξεπεράσει την απειλή. Η καταπόνηση μπορεί να είναι είτε χρόνια είτε οξεία. Όταν, τα άτομα δέχονται μικρής έντασης - ήπιο παράγοντα καταπόνησης (ακόμα και ικανό να επάγει απόκριση) κατά τις καθημερινές πρακτικές οι οποίες δεν θεωρούνται ιδιαίτερα στρεσογόνες, τότε το στρες προσδιορίζεται ως «ευκαταπόνηση» (eustress) (Selye 1974). Αν, αντίθετα, ο οργανισμός υφίσταται χρόνιο στρες ή μεγάλης έντασης παράγοντα καταπόνησης, τότε η απόκριση στο στρες μπορεί να απολέσει την προσαρμοστική της αξία και να γίνει δυσλειτουργική, κάτι το οποίο θα είναι καταστροφικό για την υγεία και ευημερία του οργανισμού και περιγράφεται με τον όρο «δυσκαταπόνηση» (distress) (Selye 1974). Συνέπεια αυτού, θα ήταν να υπάρχουν σοβαρές επιπτώσεις στην αύξηση, την αναπαραγωγή και την ανοσοποιητική απόκριση (Pickering 1992, Schreck *et al.* 2001).

Η επίδραση του παράγοντα καταπόνησης δεν εξαρτάται μονάχα από την έντασή του, αλλά και από την κατάσταση του οργανισμού και τον τρόπο με τον οποίο αυτός βιώνεται από το εκάστοτε ζώο. Έτσι, παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το φύλο, το είδος, η εποχή, η ηλικία, η φυσιολογία, κοινωνικοί παράγοντες και κληρονομούμενα ή επίκτητα χαρακτηριστικά μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την απόκριση στον ίδιο στρεσογόνο παράγοντα (ανασκόπηση Bonga 1997).

Οι παράγοντες καταπόνησης στα ψάρια αφορούν σε απότομες ή υπερβολικές αλλαγές του φυσικού περιβάλλοντος (θερμοκρασία, θολερότητα, αλατότητα), στην αλληλεπίδραση των οργανισμών (θήρευση, παράσιτα, ανταγωνισμός για χώρο, τροφή, αναζήτηση αναπαραγωγικού συντρόφου), στην ανθρώπινη παρέμβαση, συμπεριλαμβανομένων πρακτικών των ιχθυοκαλλιεργειών (χειρισμός, μεταφορά, χρήση διχτυών, συνωστισμός) και στην ρύπανση των υδάτων (χαμηλό pH, βαρέα μέταλλα, οργανικοί ρύποι) (ανασκόπηση Bonga 1997).

1.5. Απόκριση στην καταπόνηση

Οι αποκρίσεις που επάγονται μετά την καταπόνηση διάκρινονται σε πρωτογενείς, δευτερογενείς και τριτογενείς (Pickering 1981, Pickering, Pottinger *et al.* 1987) (Εικ.3). Οι πρωτογενείς αποκρίσεις αφορούν στην ενεργοποίηση των κέντρων του εγκεφάλου, προκαλώντας μαζική απελευθέρωση κατεχολαμινών από τον χρωμόφιλο ιστό (Randall & Ferry 1992) και κορτικοστεροειδών ύστερα από την ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-μεσонеφρού (Bonga 1997). Οι δευτερογενείς αποκρίσεις αφορούν στις πολλαπλές επιπτώσεις και δράσεις αυτών των ορμονών στον μεταβολισμό και την οσμωρύθμιση, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της καρδιακής παροχής, της πρόσληψης οξυγόνου και την διαταραχή της ιοντικής ισορροπίας (Pickering 1981, Iwama *et al.* 2011). Οι τριτογενείς αποκρίσεις εκτείνονται σε επίπεδο οργανισμού αλλά και πληθυσμού και αφορούν στην αναστολή της αύξησης, της αναπαραγωγής, της ανοσοποιητικής απόκρισης και στην μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης των ιδίων ή και επιπρόσθετων παραγόντων καταπόνησης (Bonga 1997).



Εικόνα 3: Φυσικοί, χημικοί και άλλοι αντιληπτοί παράγοντες που επάγουν πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή απόκριση στο στρες. Τροποποίηση από Barton (2002)

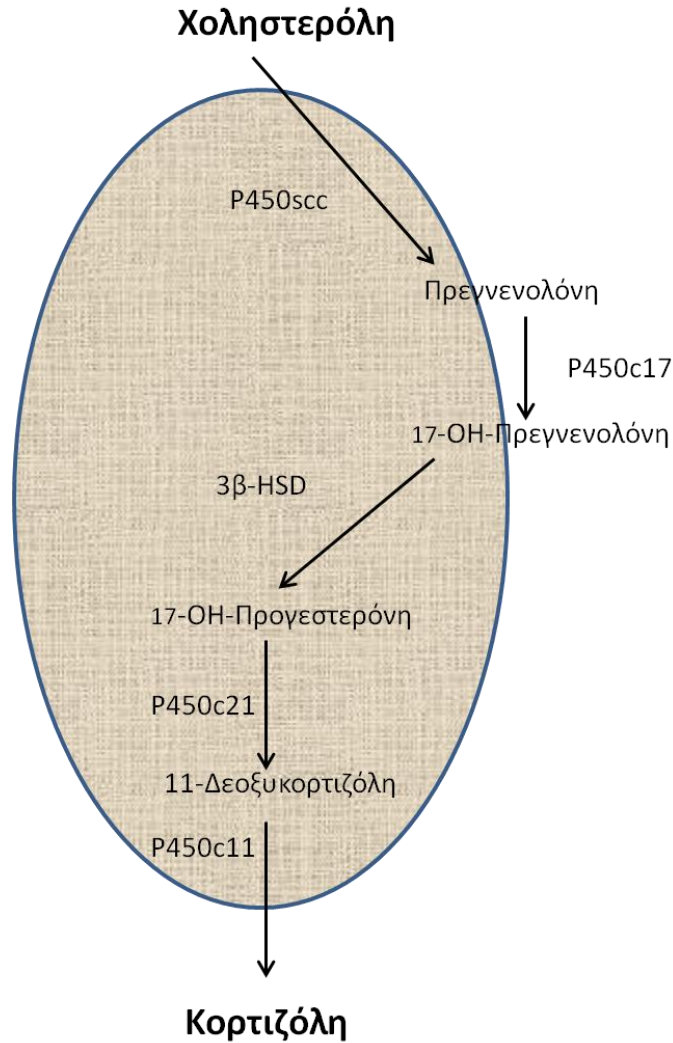
Πολλές ορμόνες έχει φανεί πως αυξάνονται κατά την απόκριση στο στρες, αλλά κυρίαρχος είναι ο ρόλος των κατεχολαμινών και των γλυκοκορτικοειδών. Πέραν αυτών άλλες χαρακτηριστικές ορμόνες που αυξάνονται κατά την απόκριση είναι η

θυροξίνη (Brown *et al.* 1978), η προλακτίνη (Pottinger *et al.* 1992) και η σωματολακτίνη (Kakizawa *et al.* 1995), ενώ επίσης κάποιες άλλες καταστέλλονται, όπως αυτές που σχετίζονται με την αναπαραγωγή (Pickering *et al.* 1987). Αυτές όμως οι ορμόνες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ασφαλείς δείκτες της απόκρισης. Αντίθετα, χρήσιμοι δείκτες για τη εκτίμηση της απόκρισης κατά την οξεία καταπόνηση είναι η συγκέντρωση κορτιζόλης, γλυκόζης και λακτόζης (Barton 2002).

Οι κατεχολαμίνες και τα κορτικοστεροειδή είναι οι πρωταρχικοί αγγελιοφόροι των δύο κυρίων διαδρομών μέσω των οποίων ο εγκέφαλος συντονίζει την απόκριση στο στρες. Ύστερα από την αναγνώριση της απειλής από το κεντρικό νευρικό σύστημα, οι νευρικές ίνες του συμπαθητικού που νευρώνουν τα κύτταρα χρωμαφίνης διεγείρουν την απελευθέρωση των κατεχολαμινών μέσω χολινεργικών υποδοχέων (Reid *et al.* 1998). Η απελευθέρωση τους γίνεται άμεσα και τα επίπεδα τους αυξάνονται σημαντικά αμέσως μετά την καταπόνηση (Reid *et al.* 1998).

Η απελευθέρωση της κορτιζόλης γίνεται από τα κύτταρα του μεσονεφρού και έπεται χρονικά μερικών λεπτών των κατεχολαμινών (Wedemeyer *et al.* 1990). Συνοπτικά (εκτενέστερα θα περιγραφεί στην ενότητα 4.2), αρχικά διεγείρεται ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-μεσονεφρού (HPI axis) συνοδευόμενος με την απελευθέρωση της εκλυτικής ορμόνης της φλοιοτρόπου ορμόνης (CRF) η οποία διεγείρει την έκκριση της φλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH) η οποία και τέλος διεγείρει τα κύτταρα του μεσονεφρού να συνθέσουν και απελευθερώσουν στην κυκλοφορία τους αίματος την κορτιζόλη, για να κατευθυνθεί έπειτα στους διάφορους ιστούς (Barton 2002).

Αρχική και καθοριστική για τον ρυθμό της βιοσύνθεσης της κορτιζόλης είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη. Η αντίδραση καταλύεται από το μιτοχονδριακό P-450 scc (γνωστό και ως 20-22-δεσμολάση), το οποίο διασπά την πλάγια αλυσίδα. Η πρεγνενολόνη μετατρέπεται κατόπιν σε προγεστερόνη μέσω υδροξυλίωσης στην θέση 17. Ακολουθεί υδροξυλίωση στη θέση 21. Η παραγόμενη με τον τρόπο αυτό 11-δεοξυκορτιζόλη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και υδροξυλιώνεται στη θέση 11 που είναι το τελευταίο και κρίσιμο στάδιο για την παραγωγή του γλυκοκορτικοειδούς μορίου (Εικ. 4). Ούτε το τελικό προϊόν, η κορτιζόλη, ούτε και οι πρόδρομες ουσίες εναποθηκεύονται στα φλοιοεπινεφριδιακά κύτταρα. Έτσι σε περιπτώσεις οξείας καταπόνησης και αυξημένων αναγκών ποσότητας κορτιζόλης απαιτείται η ενεργοποίηση του αρχικού σταδίου: η διάσπαση της πλάγιας αλυσίδας της χοληστερόλης (ανασκόπηση Mommsen *et al.* 1999).



Εικόνα 4: Βιοσύνθεση της κορτιζόλης στους τελεόστεους. Η σκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί στην μιτοχονδριακή περιοχή, ενώ οι υπόλοιπες αντιδράσεις εκτός αυτής, συμβαίνουν στο κυτοσόλιο. Συντομώσεις: 3β -HSD: υδροξυστεροειδής δευδρογονάση, P450s: οι διάφορες μορφές του κυτοχρώματος P450. Τροποποίηση από Mommsen *et al.* (1999).

Αύξηση στα επίπεδα των κορτικοστεροειδών του πλάσματος συνεπάγεται μία σειρά μεταβολικών συνεπειών όπως στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων μέσω της γλυκονεογένεσης, στη ρύθμιση του μεταβολισμού των αμινοξέων, της παραγωγής αμμωνίας, της δραστηριότητας της συνθετάσης της γλουταμίνης και της αμινοτρανσφεράσης, και στην αύξηση της λιπόλυσης (ανασκόπηση Mommsen *et al.* 1999).

Παρότι γενικά το στρες έχει μελετηθεί κυρίως σε θηλαστικά, πλέον έχει φανεί πως τα ψάρια διαθέτουν μηχανισμούς νευροενδοκρινικού ελέγχου συγκρίσιμους με των θηλαστικών και ακολουθούν το γενικότερο πρότυπο απόκρισης των σπονδυλωτών. Υπάρχει, πλέον, αφθονία δεδομένων ως προς τα επίπεδα κορτιζόλης σε απόκριση στην καταπόνηση. Η χρήση της κορτιζόλης ως δείκτη καταπόνησης

έγκειται αφενός στο ότι μπορεί να μετρηθεί εύκολα με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια χρησιμοποιώντας ανοσοενζυμικές τεχνικές όπως η ELISA και η RIA και αφετέρου επειδή μέσω αυτής μπορούν να μετρηθούν οι βασικές και κατώτατες τιμές συγκέντρωσής της (σε άτομα που δεν δέχθηκαν καταπόνηση δηλαδή) δεδομένου ότι έχει γίνει σωστά η δειγματοληψία (συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αναισθητικού). Ένας ακόμα λόγος είναι πως η κορτιζόλη πάντα αυξάνεται σε απόκριση στην καταπόνηση (Mommssen *et al.* 1999).

Παρόλα αυτά, αν και πλέον υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων ως προς τα επίπεδα της κατά την καταπόνηση για πολλά είδη, υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές ασυνέχειες και διαφορές. Αυτή η σύγχυση επί των αποτελεσμάτων σχετίζεται κυρίως με διαφορές ανάμεσα στα είδη (Vijayan & Moon 1994), διαφορές στον τρόπο καταπόνησης (Gamperl *et al.* 1994), στον τρόπο δειγματοληψίας (Laidley & Leatherland 1988), εποχιακές και ημερήσιες διακυμάνσεις (Thorpe *et al.* 1987), διαφορές στην φωτοπερίοδο (Audet *et al.* 1986), στις διατροφικές συνθήκες (Reddy *et al.* 1995) όπως και διαφορές στην αναπαραγωγική ωριμότητα των ατόμων που καταπονούνται (Pickering *et al.* 1987).

Συνήθως, στα μεγαλύτερα ψάρια, ως δείκτης της απόκρισης χρησιμοποιείται η κορτιζόλη του πλάσματος (Barton & Iwama 1991, Bonga 1997), εναλλακτικά όμως όταν η ποσότητα αίματος δεν είναι επαρκής διότι τα ψάρια είναι μικρού μεγέθους, χρησιμοποιείται όλο το σώμα του ψαριού για μεγαλύτερη ακρίβεια στον καθορισμό των επιπέδων της (Ramsay *et al.* 2006, Alsop & Vijayan 2008). Τα επίπεδα κορτιζόλης του αίματος οφειλόμενα σε οξεία καταπόνηση, που έχουν αναφερθεί στα διάφορα είδη ψαριών κυμαίνονται ανάμεσα στα 30 και 300 ng/ml, με πολλές εξαιρέσεις ωστόσο και μεγάλες ενδοειδικές διαφορές αναλόγως της διάρκειας και της έντασης του παράγοντα καταπόνησης (Wedemeyer *et al.* 1990, Barton & Iwama 1991). Στους τελεόστεους ειδικά, έχουν αναφερθεί μεγάλες αποκλίσεις ως προς την συγκέντρωση κορτιζόλης ύστερα από οξεία καταπόνηση. Χαρακτηριστικά να αναφερθεί πως ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), είχε μέγιστη συγκέντρωση κορτιζόλης 15 ng/ml (Hemre *et al.* 1991), ενώ το ραβδωτό λαβράκι (*Morone saxatilis*) ύστερα από 5 ώρες χαλάρωσης από την καταπόνηση είχε συγκέντρωση 2,000 ng/ml, επίπεδα από τα υψηλότερα αναφερθέντα (Mazik *et al.* 1991).

Ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι να μπορέσουν να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κορτιζόλη του πλάσματος (response latency) μελετήθηκε

σε ποικιλία ειδών και έχει φανεί πως αυτός μπορεί να κυμαίνεται ανάμεσα σε 2,5 min για το είδος *Morone saxatilis* (Tomasso *et al.* 1996) έως και 120 min μετά την καταπόνηση για το είδος *Hemipterus americanus* (Vijayan & Moon 1994). Ακόμα έχει φανεί πως δεν υπάρχει έντονη συσχέτιση ανάμεσα στη θερμοκρασία και στον χρόνο σημαντικής αύξησης των κορτικοστεροειδών του πλάσματος. Ψάρια τα οποία εκτρέφονται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 10 °C επιδεικνύουν χρόνους καθυστέρησης της απόκρισης ίδιους ή και λίγο πιο σύντομους συγκριτικά με είδη που εκτρέφονται σε θερμοκρασίες έως και 30 °C (ανασκόπηση Pankhurst 2011). Ο χρόνος καθυστέρησης της αύξησης της συγκέντρωσης από τα βασικά επίπεδα ηρεμίας, έχει φανεί πως σχετίζεται με διαφορές κυρίως με τον τρόπο ζωής. Για παράδειγμα έχει φανεί πως βενθικά ψάρια επιδεικνύουν μειωμένα επίπεδα κορτιζόλης ή πιο αργή αύξησή της (Vijayan & Moon 1994, Wright *et al.* 2007). Στις περισσότερες περιπτώσεις ο μέσος χρόνος σημαντικής αύξησης της συγκέντρωσης της κορτιζόλης υπολογίζεται στα 12,5 min και αυτός ο σύντομος χρόνος κορτικοστεροειδούς απόκρισης αποδεικνύει την προσαρμοστικότητα των ψαριών με άμεση απόκριση στους παράγοντες καταπόνησης (ανασκόπηση Bonga 1997, Mommsen *et al.* 1999).

Παρά το μεγάλο ενδιαφέρον για τις μετρήσεις της κορτιζόλης ως δείκτη καταπόνησης, λίγες μελέτες μονάχα έχουν μετρήσει την κινητική της κορτιζόλης στα ψάρια. Οι μετρήσεις της κορτιζόλης του πλάσματος αντικατοπτρίζουν την επίδραση του παράγοντα καταπόνησης στην παραγωγή κορτιζόλης και τον επακόλουθο μεταβολισμό της. Η πτώση των επιπέδων της από το πλάσμα σχετίζεται με την πρόσδεση της με άλλες πρωτεΐνες, υποδοχείς ιστών-στόχων, την πρόσληψη της από τους ιστούς, και τον καταβολισμό της. Καθώς η κορτιζόλη είναι λιπόφιλη η πρόσληψη της από τα κύτταρα θεωρείται πως γίνεται με παθητική διάχυση. Αφότου μπει στο κύτταρο το στεροειδές προσδένεται στον υποδοχέα, ενεργοποιείται ή μεταβολίζεται. Η προσδεμένη στον υποδοχέα ορμόνη τελικά θα απελευθερωθεί από το σύμπλοκο υποδοχέα-ορμόνης και θα μεταβολιστεί (ανασκόπηση Mommsen *et al.* 1999).

1.6. Zebrafish

Το zebrafish χρησιμοποιείται στην έρευνα εδώ και πολλά χρόνια και αποτελεί ένα πολύ δημοφιλές μοντέλο ψαριού σε πολλούς διαφορετικούς ερευνητικούς τομείς, ειδικά όσον αφορά στην αναπτυξιακή βιολογία, τη βιοχημεία και στην γενετική (Zou & Peterson 2005). Γενικότερα ένας οργανισμός γίνεται μοντέλο στην έρευνα όταν λόγω των βιολογικών του χαρακτηριστικών θεωρείται αντιπροσωπευτικός για μία μεγαλύτερη ομάδα οργανισμών, ενώ επίσης τα χαρακτηριστικά του αυτά το καθιστούν εύκολο είδος στον χειρισμό και τη μελέτη εν συγκρίσει με την μεγαλύτερη ομάδα την οποία αντιπροσωπεύει. Ένας οργανισμός μοντέλο θα πρέπει α) να χαρακτηρίζεται από δομική απλότητα, ενώ την ίδια ώρα να έχει όλη την κυτταρική πολυπλοκότητα που πιο σύνθετοι οργανισμοί έχουν, β) να είναι ευπρόσιτο για μελέτη και εύκολο στον χειρισμό, γ) να αναπαράγεται και αυξάνεται εύκολα και οικονομικά σε εργαστηριακές εγκαταστάσεις, δ) να μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί γενετικά, ε) να έχει μικρό μέγεθος και σταθερό γονιδίωμα (Ribas & Piferrer 2013).

Ειδικά ως προς τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται για την έρευνα στον χώρο των υδατοκαλλιέργειών, ένα καλό είδος ψαριού μοντέλου είναι αυτό το οποίο θα μπορεί α) να έχει τα βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά που θα έχουν και τα σημαντικότερα είδη υδατοκαλλιέργειας, β) να επιδεικνύει παρόμοιες φυσιολογικές αποκρίσεις με τα είδη των υδατοκαλλιέργειών, γ) να έχει μικρό κύκλο ζωής και να είναι εύκολο και οικονομικό στην αναπαραγωγή του και τέλος δ) να έχει γονιδίωμα που να επιτρέπει την μελέτη του για πολλούς ερευνητικούς τομείς. Το zebrafish λοιπόν, περισσότερο από κάθε άλλο είδος πληροί όλες τις προαναφερθείσες προϋποθέσεις, σε μεγάλο βαθμό (Ribas & Piferrer 2013).

Το zebrafish ανήκει στην οικογένεια των κυπρινοειδών που περιλαμβάνει πάνω από 2000 είδη (Froese & Pauly 2014). Ακόμη, συστηματικά ταξινομείται στο φύλο των χορδωτών, το υπόφυλο των σπονδυλωτών, την υπερομοταξία των γναθοστομάτων, την ομοταξία των ακτινοπτερυγίων, την υφομοταξία των τελεόστεων, την τάξη των κυπρινόμορφων και την οικογένεια των κυπρινοειδών. Η προηγούμενη επιστημονική του ονομασία ήταν *Brachydanio rerio*, αλλά άλλαξε σε *Danio rerio* (Hamilton, 1822) το 1981 (Chu 1981).

Το zebrafish είναι είδος γλυκού νερού και εξελίχθηκε στην Δυτική Ασία περίπου 320 εκατομμύρια χρόνια πριν. Η γεωγραφική του κατανομή εκτείνεται κυρίως στην Ινδία, το Μπαγκλαντές και το Νεπάλ, ενώ ακόμα βρίσκεται στο

Πακιστάν, τη Μυανμάρ, τη Σρι Λάνκα και στους ποταμούς που καταλήγουν στην Αραβική θάλασσα (Spence *et al.* 2008). Ζει λοιπόν σε τροπικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από κλιματικές διακυμάνσεις λόγω των μουσώνων. Αυτή η γεωγραφική κατανομή και το συγκεκριμένο κλίμα, που συνεπάγεται έντονες βροχοπτώσεις και ξηρασία, έχει μεγάλη επίδραση στις παραμέτρους των ενδαιτημάτων, συμπεριλαμβανομένων της χημείας του νερού και της αφθονίας της τροφής.

Παρουσιάζει λοιπόν, μεγάλη προσαρμοστικότητα σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες λόγω των ενδαιτημάτων στα οποία ζει, τα οποία μπορεί να έχουν σημαντική διακύμανση ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Είναι ευρύθερμο είδος και αντέχει στη φύση θερμοκρασίες οι οποίες κυμαίνονται από 16,5 έως και 38,6 °C (López-Olmeda & Sánchez-Vázquez 2011). Μπορεί επίσης να ζήσει σε περιβάλλον με διαφορετική οξύτητα, σε τιμές pH κυμαινόμενες από 5,5 έως και 9 και σε τιμές αγωγιμότητας του νερού τόσο χαμηλές της τάξης 10-271 μS/cm (Engeszer *et al.* 2007) όσο και ψηλές, για όσα ζουν σε περιοχές υψηλής αλατότητας, της τάξης των 1000 μS/cm (Lawrence 2007).

Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας για τα εξώθερμα είδη. Η επιβίωση για τα ενήλικα άτομα zebrafish έχει αναφερθεί πως είναι εφικτή για μεγάλο εύρος θερμοκρασιακό εντός των εργαστηρίων που κυμαίνεται από 6,2 έως και 42 °C. Παρόλα αυτά η θερμοκρασία που κυμαίνεται σε ανεκτά όρια κυμαίνεται ανάμεσα στους 22 και 30 °C, ενώ γενικά η τυπική θερμοκρασία εκτροφής θα πρέπει να περιορίζεται στους 26-29 °C. Η πιο προτιμώμενη θερμοκρασία για τη βέλτιστη ανάπτυξη είναι αυτή των 28 °C (Detrich *et al.* 2004).

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την μελέτη της θερμικής ανοχής του zebrafish, που είναι και ο υπό μελέτη οργανισμός της παρούσας εργασίας. Οι Cortemeglia & Beitinger (2005) ανέφεραν ως ανώτατο θερμοκρασιακό όριο (CTMax) την θερμοκρασία των 39.2±0.3 °C και ως κατώτατο θερμοκρασιακό όριο (CTMin) την θερμοκρασία των 6.2± 0.3 °C για ψάρια που είχαν εγκλιματιστεί στους 20 °C και για ψάρια που έχουν εγκλιματιστεί στους 30 °C ανέφεραν τιμές ανώτατου ορίου την θερμοκρασία των 41.7±0.4°C και κατώτατου την θερμοκρασία των 10.6±0.5 °C. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν πως το zebrafish συνιστά ένα ιδιαίτερος ευρύθερμο και ανθεκτικό είδος. Αυτή η μελέτη αφορούσε στο στέλεχος GlofishTM, και οι παρατηρήσεις αυτές διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τις

παρατηρήσεις σε άγρια zebrafish με διαφορές που κυμαίνονται από 0.4 έως και 1°C, (Cortemeglia & Beitinger 2005, 2006).

1.7. Φαινοτυπική πλαστικότητα στο zebrafish

Πρόσφατες μελέτες στο zebrafish απέδειξαν την πλαστικότητα του είδους ως προς την θερμοκρασία. Οι Schnurr *et al.* (2013) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας που εφαρμόστηκε κατά τα εμβρυικά στάδια στην ανάπτυξη και την ενεργότητα πολλών μεταβολικών ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κολυμβητική ικανότητα και κατέληξαν πως η θερμοκρασία κατά την πρόωμη ανάπτυξη επιδρά στα **μεταβολικά μονοπάτια** και στην **ικανότητα εγκλιματισμού** σε επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Οι Scott & Johnston (2012) απέδειξαν την πλαστικότητα του είδους, επαγόμενη από την θερμοκρασία που εφαρμόστηκε κατά τα εμβρυικά στάδια, στην **κολυμβητική ικανότητα** και την **σύσταση των μυών** επόμενων αναπτυξιακών σταδίων. Παρομοίως, οι Johnston *et al.* (2009) διαπίστωσαν την πλαστικότητα του είδους ως προς τους φαινότυπους της **μυικής αύξησης** εξετάζοντας την υπερτροφία και υπεπλασία των μυικών ινών ως αποτέλεσμα εφαρμογής διαφορετικών θερμοκρασιών κατά τα εμβρυικά στάδια. Οι Sfakianakis *et al.* (2011) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας που εφαρμόζεται από την γονιμοποίηση μέχρι και το στάδιο των ιχθυδίων και παρατήρησαν πλαστικότητα ως προς συγκεκριμένους **μεριστικούς χαρακτήρες** και όπως και οι Georga & Koumoundouros (2010) βρήκαν πως επηρεάζει γενικότερα το **σχήμα σώματος** του zebrafish. Ακόμα, οι Parichy *et al.* (2009) περιέγραψαν πως η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τόσο το **πρότυπο ανάπτυξης** όσο και μορφολογικούς χαρακτήρες εκτρέφοντας νύμφες σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (14, 18,5 και 33°C).

Πέραν όμως της φαινοτυπικής πλαστικότητας επαγόμενης από την θερμοκρασία υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που έχουν μελετηθεί και έχουν αποδείξει πως το zebrafish είναι πλαστικό είδος. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη των Ricci *et al.* (2013) εξέτασε την πλαστικότητα της επιθετικής συμπεριφοράς στο zebrafish και κατέληξε πως η συμπεριφορά αυτή είναι πλαστική και ο τελικός φαινότυπος της επηρεάζεται από την **ηλικία, την ιεράρχηση, την εμπειρία και τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις**.

Επίσης, ο Pelster (2002) σε μία ανασκόπηση του, αναλύοντας την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων και δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην επίδραση της

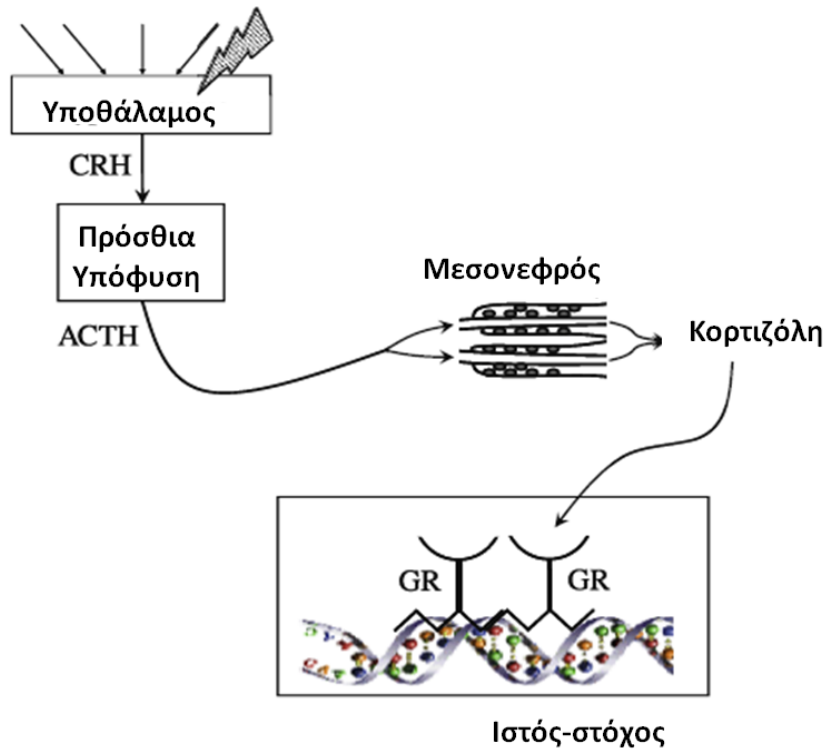
υποξίας στην ανάπτυξη της **καρδιακής λειτουργίας** και τον **σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων**, αναφέρει πως το zebrafish έχει πλαστικότητα και ως προς τον σχηματισμό του καρδιαγγειακού του συστήματος εμβρύων και νυμφών.

1.8. Απόκριση του zebrafish στην καταπόνηση

Η επιτυχία στις υδατοκαλλιέργειες έγκειται στην εξασφάλιση κατάλληλου περιβάλλοντος και συνθηκών (Klontz 1995). Μη διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια στρες (Schreck 2000) και έτσι είναι πολύ σημαντική η κατανόηση της επίδρασης του περιβάλλοντος εκτροφής ως μέσο εξασφάλισης της ομοιόστασης και της ευζωίας (Schreck 2000, Ellis *et al.* 2002). Ενώ το zebrafish χρησιμοποιείται ευρέως και χρόνια στην έρευνα, σχετικά λίγες είναι οι εργασίες οι οποίες μελετούν την απόκριση του είδους στο στρες (Ramsay *et al.* 2006, Alsop & Vijayan 2008, Alderman & Bernier 2009, Alsop & Vijayan 2009a, Alsop & Vijayan 2009b, Egan *et al.* 2009, Canavello *et al.* 2011, Pavlidis *et al.* 2013). Οι Alsop & Vijayan (2009a) μελέτησαν τους μοριακούς μηχανισμούς πίσω από την απόκριση του zebrafish στο στρες εστιάζοντας στην λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-μεσοenceφρού όταν ήδη από τους Keller *et al.* (2008) ήταν γνωστό πως το zebrafish παρουσιάζει παρεμφερές σύστημα απόκρισης με τα υπόλοιπα σπονδυλωτά (συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου). Οι Egan *et al.* (2009) μελετώντας την απόκριση του zebrafish στο στρες, τόσο σε επίπεδο συμπεριφοράς όσο και φυσιολογίας, απέδειξαν πως το zebrafish είναι πολύ αξιόπιστο είδος για μελέτες ως προς την καταπόνηση αλλά και ιδιαίτερος πλαστικό ως προς αυτήν δίνοντας πολλούς συμπεριφορικούς φαινοτύπους σε απόκριση στο στρες.

Το zebrafish έχει άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-μεσοenceφρού (HPI axis), ο οποίος είναι ομόλογος του ανθρώπινου άξονα υποθαλάμου- υπόφυσης- επινεφριδίων (HPA axis), και είναι αυτός που μεσολαβεί στην ενδοκρινική απόκριση στην καταπόνηση (Alsop & Vijayan 2008) (Εικ.5). Κάτω από συνθήκες στρες ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου διεγείρει την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της φλοιοτρόπου ορμόνης (CRF), η οποία μεταβαίνει στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης μέσω του συστήματος αιμοφόρων αγγείων της υπόφυσης και του υποθαλάμου (Suzuki *et al.* 2009). Αυτή με τη σειρά της διεγείρει την υπόφυση προκαλώντας την απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) στη

ροή του αίματος (Tsigos & Chrousos 2002). Όταν διεγείρεται ο φλοιός των επινεφριδίων από την φλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH) συνθέτει γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες από ένα πρόδρομο της χολιστερόλης κι έτσι τελικά εκκρίνεται η κορτιζόλη (περαιτέρω πληροφορίες ως προς την βιοσύνθεση της αναφέρθηκαν στην ενότητα 3.2) (McEwen 2007, Dedovic *et al.* 2009).



Εικόνα 5: Συνοπτική παρουσίαση του HPI άξονα. Μετά από την έκθεση σε έναν παράγοντα καταπόνησης ο υποθάλαμος εκκρίνει την CRH ορμόνη η οποία διεγείρει την έκκριση και της ACTH. Η κυκλοφορία της ACTH στο αίμα διεγείρει την βιοσύνθεση της κορτιζόλης και την έκκρισή της από τα κύτταρα του μεσонеφρού. Έπειτα η κορτιζόλη προσδένεται στους υποδοχείς GR και ρυθμίζει την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Στο zebrafish συγκεκριμένα υπάρχει μόνο ένας υποδοχέας GR. Τροποποίηση από Alsop & Vijayan (2009).

Τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών προκαλούν μεταβολικές επιπτώσεις οι οποίες ρυθμίζουν την απόκριση στο στρες (Dedovic *et al.* 2009, Pruessner *et al.* 2010). Αυτές οι επιπτώσεις συμπεριλαμβάνουν την διέγερση της γλυκονεογένεσης, αντιφλεγμονώδεις δράσεις και την καταστολή του ανοσοποιητικού (Kern *et al.* 2008). Ο καταρράκτης αυτός αντιδράσεων που ενεργοποιείται ως απόκριση στην καταπόνηση, είναι επιβλαβής όταν προκαλείται σε μεγάλο βαθμό και για να αντισταθμιστούν οι συνέπειές του επάγεται αρνητική ανάδραση από τον υποθάλαμο και την υπόφυση, η οποία καταστέλλει την απελευθέρωση της εκλυτικής ορμόνης της φλοιοτρόπου ορμόνης (CRF) και της φλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH) (Bremner 1999, Tsigos & Chrousos 2002). Η άμεση επίδραση των γλυκοκορτικοειδών που σχετίζεται

με την καταστολή του HPI άξονα μέσω της ρυθμιστικής αρνητικής ανάδρασης μεσολαβείται από την πρόσδεση τους σε ενδοκυτταρικούς υποδοχείς. Τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την έκκριση ACTH από την CRH σε διάστημα λεπτών μέσω ενός ταχέως ανεξάρτητου από την μεταγραφή μηχανισμού. Από την άλλη όμως, η καθυστερημένη αρνητική ανάδραση στους νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) συμβαίνει μέσω ενός μηχανισμού κατά τον οποίο οι ορμόνες αυτές αναστέλλουν την μεταγραφή της CRH (Schulkin *et al.* 1998).

Στα zebrafish, κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της εμβρυογένεσης η περιεχόμενη κορτιζόλη είναι μητρικής προέλευσης ενώ η *de novo* σύνθεση της ξεκινάει μόνο μετά την εκκόλαψη (Alsop & Vijayan 2008). Έτσι, η αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης ως απόκριση στο στρες δεν είναι εφικτή μέχρι και 3-4 μέρες μετά την γονιμοποίηση (dpf), καθώς το έμβρυο φτάνει στο στάδιο της έναρξης της διατροφής (Alsop & Vijayan 2008, Alderman & Bernier 2009). Συνεπώς, υπάρχει μία χρονική μείωση του μητρικής προελεύσεως αποθέματος κορτιζόλης στα έμβρυα μέχρι την εκκόλαψη (Alsop & Vijayan 2008). Έτσι δημιουργείται η υπόθεση πως μία περίοδος μειωμένης απόκρισης των κορτικοστεροειδών είναι βασική για την πρόιμη ανάπτυξη και όντως σε κάποιες μελέτες έχει φανεί πως αυξημένη έκθεση σε γλυκοκορτικοειδή προγεννητικά, διαταράσσει την αύξηση και την ανάπτυξη των ψαριών, αλλά δεν έχει βρεθεί ακόμα ο τρόπος που συμβαίνει αυτό (Eriksen *et al.* 2006). Βεβαίως, το πιο πιθανό είναι πως εκείνη την περίοδο ο άξονας HPI δεν είναι ακόμα λειτουργικός (Barton 2002).

Μέχρι στιγμής, έχουν μελετηθεί τα επίπεδα της κορτιζόλης σε νύμφες έως και 6 dpf καθώς και σε ενήλικα άτομα. Ως μέθοδοι καταπόνησης σε νύμφες έχουν μελετηθεί το οσμωτικό «σοκ», (Alderman & Bernier 2009, Yeh *et al.* 2013), το θερμικό «σοκ» καθώς και «σοκ» οξύτητας (Yeh *et al.* 2013), το οπτικό «σοκ», μέσω διαφορετικών φωτισμών ως μέσο καταπόνησης (De Marco *et al.* 2013) ενώ σε ενήλικα άτομα έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος δημιουργίας στροβιλισμού στο νερό (swirling) (Alsop & Vijayan 2008), η σύλληψη μέσω απόχης και έκθεση στον αέρα (Ramsay *et al.* 2009, Pavlidis *et al.* 2013), η νηστεία, η πυκνότητα (Ramsay *et al.* 2006, Pavlidis *et al.* 2013) το χρώμα του υποστρώματος (Pavlidis *et al.* 2013) και η επαφή με τον θηρευτή (Barcellos *et al.* 2007). Τέλος, η δυναμική της έχει περιγραφεί μόνο σε δύο περιπτώσεις και αφορά σε ενήλικα άτομα (Ramsay *et al.* 2009, Pavlidis *et al.* 2013).

Σκοπός της μελέτης

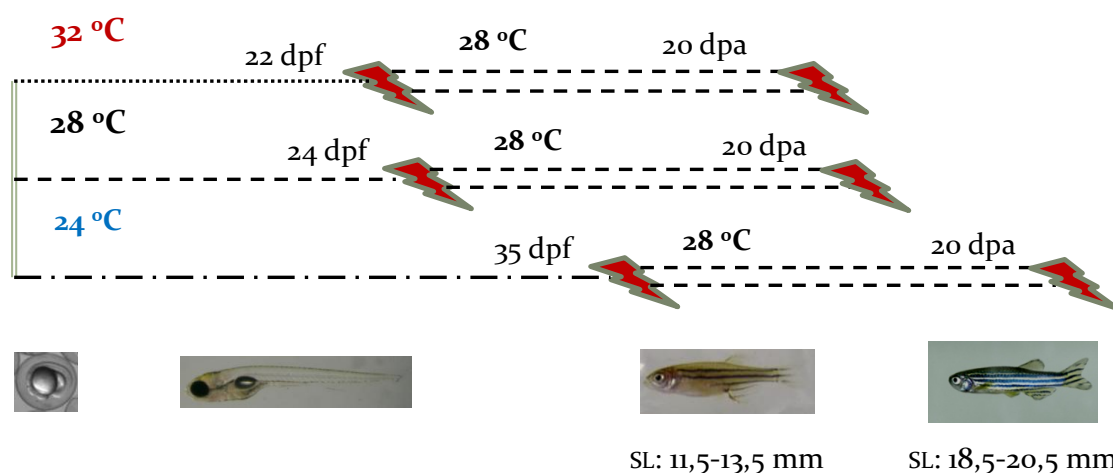
Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας που εφαρμόζεται κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια ως προς την ποιότητα των ιχθυδίων zebrafish. Καθώς είναι γνωστό πως η θερμοκρασία ανάπτυξης μπορεί να επάγει φαινοτυπική πλαστικότητα, τέθηκε το ερώτημα πως η θερμοκρασία που εφαρμόστηκε κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια επηρέασε την πλαστικότητα του είδους *Danio rerio* ως προς την απόκριση του στο στρες. Η απόκριση του οργανισμού στο στρες, ως μελέτη της φαινοτυπικής πλαστικότητας που επάγεται λόγω της διαφορετικής θερμοκρασιακής ιστορίας των πληθυσμών, είναι μία μελέτη που δεν έχει αναφερθεί ως τώρα στο συγκεκριμένο είδος και στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο.

Μέθοδοι και Υλικά



Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασιακής ιστορίας στην ποιότητα των ιχθυδίων zebrafish. Γι' αυτόν τον σκοπό εφαρμόστηκαν 3 διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες των 24, 28 και 32 °C από την γονιμοποίηση έως και την αρχή της μεταμόρφωσης. Έπειτα, όλοι οι πληθυσμοί παρέμειναν στους 28 °C και ύστερα από 20 ημέρες δέχθηκαν δοκιμασία καταπόνησης (Εικ. 6). Δοκιμασία καταπόνησης δέχθηκαν όλοι οι πληθυσμοί και κατά το πέρας των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών, αλλά τα δείγματα αυτά δεν αναλύθηκαν. Τα δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν ύστερα από διαφορετικούς χρόνους μετά την δεύτερη δοκιμασία καταπόνησης αναλύθηκαν με την ανοσοενζυμική τεχνική της ELISA για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο σώμα τους. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις.



Εικόνα 6: Πειραματική διαδικασία. Απεικονίζονται οι θερμοκρασιακές συνθήκες που εφαρμόστηκαν και ο χρόνος που έλαβαν χώρα οι δοκιμασίες καταπόνησης. dpf: Ημέρες μετά την γονιμοποίηση, dpa: Ημέρες μετά τον εγκλιματισμό υπό κοινές συνθήκες (28°C), SL: Τυπικό Μήκος. Τα δείγματα της πρώτης δοκιμασίας καταπόνησης σε μέσο τυπικό μήκος 11,5-13,5 mm δεν αναλύθηκαν.

2.1. Εκτροφή πειραματικών πληθυσμών

Σε δύο διαφορετικά αποθέματα γεννητόρων zebrafish άγριου τύπου (ZF WT 2 F 5, Wageningen Agricultural University, The Netherlands) μία νύχτα πριν την μέρα της πειραματικής διαδικασίας τοποθετήθηκαν γεννήστρες, ώστε το επόμενο πρωί να συλλέξουμε τα αυγά. Για το πείραμα αυτό συλλέχθηκαν αυγά και από τα δύο

αποθέματα γεννητόρων ώστε να έχουμε τη μεγαλύτερη δυνατή ποικιλομορφία και αυτά μοιράστηκαν σε όλους τους πειραματικούς πληθυσμούς ισομερώς.

Η γονιμοποίηση των αυγών πραγματοποιήθηκε στους 28 °C και στην πορεία τα αυγά τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία τριών διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών. Της τοποθέτησής των αυγών στις εκάστοτε συνθήκες προηγήθηκε εγκλιματισμός. Η αρχική συγκέντρωση σε κάθε ενυδρείο ήταν 350 αυγά/9 L.

Στην συνέχεια οι πληθυσμοί εκτράφηκαν υπό τις διαφορετικές συνθήκες έως ότου φτάσουν σε μέσο τυπικό μήκος 11,5-13,5 mm, κάτι το οποίο συνέβη για διαφορετικούς χρόνους ανά θερμοκρασιακό καθεστώς που εφαρμόστηκε. Πιο συγκεκριμένα για τους πληθυσμούς των 24 °C απαιτήθηκαν 35 ημέρες μετά την γονιμοποίηση, για τους πληθυσμούς των 28 °C 24 ημέρες και για τους πληθυσμούς των 32 °C 22 ημέρες. Κατόπιν, όλοι οι πληθυσμοί τοποθετήθηκαν σε κοινές θερμοκρασιακές συνθήκες, στους 28 °C. Πριν μεταβούν σε κοινές συνθήκες, τα άτομα τα οποία είχαν επιβιώσει μετρήθηκαν και ο κάθε πληθυσμός μοιράστηκε σε δύο ενυδρεία με $n=40$ άτομα/ενυδρείο (9 L). Εκεί παρέμειναν για διάστημα 20 ημερών. Στο πέρας αυτής της περιόδου, τα άτομα υπέστησαν διαδικασία οξείας καταπόνησης.

2.2. Εγκλιματισμός

Για τον εγκλιματισμό των δειγμάτων τα αυγά τα οποία προορίζονταν είτε για τους 24 °C είτε για τους 32 °C η μεταβολή της θερμοκρασίας δεν υπερέβαινε τον ένα βαθμό/15 min. Για τον σκοπό αυτό, για την μετάβαση των αυγών από τους 28°C στους 32 °C, χρησιμοποιήθηκε ενυδρείο με εσωτερική αντίσταση της οποίας η θερμοκρασία αυξανόταν κατά ένα βαθμό ανά ένα τέταρτο. Για τον εγκλιματισμό των αυγών στους 24 °C, τα αυγά τοποθετήθηκαν σε εξωτερικό ενυδρείο και αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 24 °C, έως ότου πέσει η θερμοκρασία. Συνολικά ο εγκλιματισμός διήρκεσε 60-90 min. Ο εγκλιματισμός πραγματοποιήθηκε την ίδια μέρα με την γονιμοποίηση των αυγών και αφότου τα δείγματα έφταναν στην επιθυμητή θερμοκρασία εντάσσονταν στα κλειστά συστήματα. Η ροή του νερού εντός των ενυδρείων ήταν παντού σταθερή και ίση με 14 L/hr.

2.3. Συνθήκες εκτροφής

Η εκτροφή των πληθυσμών έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται από τον (Westerfield 1995) στο «*The Zebrafish Book*». Η διατροφή των νυμφών ξεκίνησε για τους πληθυσμούς των 24, 28 και 32 °C κατά την 3^η, 4^η και 6^η dpf αντιστοίχως. Οι νύμφες από την έναρξη της διατροφής τους έως και 22-35 dpf (αναλόγως της θερμοκρασίας) τρέφονταν με ναύπλιους *Artemia sp.* (Salt Creek, Select Brine Shrimp Eggs, Nitro Pak). Μετά από αυτό το διάστημα, για 5 ημέρες οι πληθυσμοί συνδιατρέφονταν τόσο με ζωντανή τροφή όσο και βιομηχανική ενώ με το πέρας αυτών των ημερών μόνο με βιομηχανική τροφή. Η βιομηχανική τροφή που χορηγήθηκε ήταν Cichlid Omni (Ocean Nutrition).

Οι συνθήκες αγωγιμότητας, θερμοκρασίας, κορεσμού του οξυγόνου και pH των συστημάτων ελέγχονταν καθημερινά και τα επίπεδα τους καταγράφονταν. Πιο συγκεκριμένα το pH των συστημάτων ήταν ίσο με 7-8 και η αγωγιμότητα κυμαινόταν στα 500 – 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Ο κορεσμός του οξυγόνου στο νερό κυμάνθηκε σε ποσοστό 85 – 100% και η συγκέντρωση των αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων ήταν μικρότερη του 0,1 mg/L. Η φωτοπερίοδος είχε ρυθμιστεί 14hL:10hD. Η θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν σταθερή ανά θερμοκρασιακή συνθήκη (24, 28 και $32 \pm 0,2^\circ\text{C}$).

2.4. Δειγματοληψίες

Στα στάδια της έναρξης του ετερότροφου σταδίου, την 10^η μέρα καθώς και την 20^η ημέρα μετά την γονιμοποίηση τυχαίο δείγμα 15 ατόμων από κάθε πληθυσμό λήφθηκε ώστε να υπολογιστεί το τυπικό μήκος του σώματος στο οποίο βρίσκονταν οι πληθυσμοί. Έτσι, θα μπορούσε να γίνει η εκτίμηση του ρυθμού αύξησης και άρα της ακριβούς ημερομηνίας που τα άτομα θα υπόκεινταν στο στρες. Κατά το στάδιο μετάβασης στις κοινές συνθήκες λήφθηκε τυχαίο δείγμα 40 ατόμων ανά πληθυσμό. Πέραν αυτών των σταθερών δειγματοληψιών, πραγματοποιήθηκαν και άλλες ανά τακτά διαστήματα με σκοπό τον ακριβή έλεγχο μήκους ώστε όλα τα άτομα να έχουν κοινό μέσο τυπικό μήκος πριν μεταβούν σε κοινές συνθήκες, όπως επίσης και πριν υποστούν την καταπόνηση. Για την δειγματοληψία των ατόμων χρησιμοποιήθηκε το αναισθητικό MS-222 65 ppm σε συνδυασμό με ισοφλουρανίο 65 ppm (Huang *et al.* 2010) σε δόση ευθανασίας.

Ύστερα από την δειγματοληψία των ατόμων, αυτά φωτογραφήθηκαν στο στερεοσκόπιο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Canon Powershot G12) που εφαρμόστηκε σε στερεοσκόπιο OLYMPUS μοντέλου SZX-ILLD2-200. Από τις φωτογραφίες αυτές υπολογίστηκε το τυπικό μήκος των ψαριών με την βοήθεια του λογισμικού trsDig (Rohlf 2008) (Εικ. 7).



Εικόνα 7: Σημεία τοποθέτησης των μορφομετρικών σημείων (*landmarks*) για τον υπολογισμό τυπικού μήκους (*SL*) με την χρήση *trs* λογισμικού

2.5. Ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR)

Αφότου υπολογίστηκαν τα τυπικά μήκη κάθε δείγματος και σχεδιάστηκαν οι καμπύλες αύξησης, παρατηρήθηκε ο χρόνος που αντιστοιχεί στο σημείο αλλαγής του ρυθμού αύξησης. Στην συνέχεια, μετρήθηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορούσε στον ρυθμό αύξησης που μετρήθηκε κατά το σημείο αλλαγής του ρυθμού αύξησης ως προς την έναρξη του ετερότροφου σταδίου (f.f), ενώ το δεύτερο στάδιο αφορούσε στον ρυθμό αύξησης που μετρήθηκε στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας ως προς τον χρόνο που παρατηρήθηκε η αλλαγή του ρυθμού αύξησης για κάθε θερμοκρασία .

Για τον υπολογισμό του ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR) ο τύπος:

$$SGR = \frac{\ln (SL2) - \ln (SL1)}{t2 - t1}$$

όπου *SL1* και *SL2* το μέσο τυπικό μήκος ενός τυχαίου δείγματος πληθυσμού σε ηλικία *t1* και *t2* αντίστοιχα.

2.6. Επιβίωση

Η επιβίωση εκτιμήθηκε σε δύο χρόνους. Η πρώτη εκτίμηση της έγινε στις 10 dpf και η δεύτερη μετά την καταπόνηση (20 dra) που αντιστοιχούσε και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Το πιο κρίσιμο στάδιο της επιβίωσης αφορούσε τις 10 πρώτες ημέρες μετά την γονιμοποίηση, καθώς ύστερα από αυτό το διάστημα δεν παρατηρήθηκε άλλη σημαντική θνησιμότητα πέραν των δειγματοληψιών. Γενικότερα, ύστερα από μέσο τυπικό μήκος 8 mm δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα. Η αύξηση των ατομών μέχρι αυτό το μέσο τυπικό μήκος διήρκησε μέχρι και τις 20 dpf (για την συνθήκη των 24 °C). Για τον υπολογισμό του ρυθμού επιβίωσης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σχέσεις:

Για τις 10 dpf: Ρυθμός επιβίωσης = $\frac{Ni}{N_{αρχικό}}$, όπου Ni: ο αριθμός των ατόμων που μετρήθηκαν εκείνη την ημέρα

Για τις 20 dra: Ρυθμός επιβίωσης = $\frac{Ni+Ns}{N_{αρχικό}}$, όπου Ni: ο αριθμός των επιζώντων ατόμων στο τέλος του πειράματος, Ns: ο αριθμός των ατόμων τυπικού μήκους > 8 mm που λήφθηκαν για τις δειγματοληψίες.

2.7. Δοκιμασία καταπόνησης

Κατά τη δοκιμασία καταπόνησης (20 dra), ελέγχθηκαν διαφορετικοί χρόνοι ύστερα από το στρες για να ανιχνευθούν τα επίπεδα της κορτιζόλης των ατόμων, κατά την ηρεμία (ομάδα control) όσο και σε συγκεκριμένους χρόνους ανάκαμψης μετά την καταπόνηση. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε έγινε σύμφωνα με τους Ramsay *et al.* (2009), με κάποιες όμως τροποποιήσεις ως προς τη διάρκεια της καταπόνησης. Η δοκιμασία της καταπόνησης περιελάμβανε κυνήγι λίγων δευτερολέπτων με την απόχη, μέχρι να συλληφθούν τα άτομα, και στην συνέχεια αιώρηση και έκθεση στον αέρα για 2 λεπτά. Στο πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα άτομα αναισθητοποιούνταν με τη χρήση αναισθητικού μεθανοσουλφινικής τρικαΐνης (MS-222) 65 ppm και ισοφλουρανίου 65 ppm (Huang *et al.* 2010) ώστε να διαχωριστούν σε πεντάδες και να τοποθετηθούν σε διαφορετικά δειγματοληπτικά διάτρητα, λευκά, πλαστικά ποτήρια, όπου επιτρεπόταν η ροή νερού

και οξυγόνωσης, και να παραμείνουν εκεί για διαφορετικούς χρόνους ανάκαμψης ύστερα από το στρες. Για την διευκόλυνση της σύλληψης των ατόμων με σκοπό να μειωθεί ο χρόνος κυνηγιού και να αποφευχθεί η καταπόνηση στην ομάδα ελέγχου, πριν την σύλληψη των ατόμων προηγήθηκε πτώση της στάθμης του νερού των ενυδρείων.

Οι χρόνοι χαλάρωσης ύστερα από την καταπόνηση ήταν οι εξής: t=15, 30, 60 min pns (post net stress). Ως ομάδα ελέγχου (control, t=0 min pns) χρησιμοποιήθηκαν 5 άτομα τα οποία δεν υπέστησαν στρες, αλλά συλλέχθηκαν ταχύτατα με τη χρήση απόχης και απευθείας τοποθετήθηκαν σε αναισθητικό (MS-222 65 ppm και ισοφλουρανίου 65 ppm) με δόση ευθανασίας. Ο αριθμός των ατόμων που μελετήθηκαν ανά χρόνο και ανά συνθήκη ήταν ίσος με n=5. Στο πέρας αυτών των χρόνων ανάκαμψης τα άτομα θανατώθηκαν με τη χρήση αναισθητικού μεθανοσουλφινικής τρικαϊνης (MS-222) 65 ppm και ισοφλουρανίου 65 ppm (Huang, Hsieh et al. 2010) και αφού ζυγίστηκαν και φωτογραφήθηκαν πάγωσαν σε υγρό άζωτο. Ακολούθως, τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -20 °C έως την ημέρα της ανάλυσης.

Να σημειωθεί ακόμη πως, όλες οι δοκιμασίες καταπόνησης ξεκίνησαν την ίδια ώρα κάθε μέρα, προς αποφυγή διακυμάνσεων στην κορτιζόλη λόγω των κιρκάδιων ρυθμών (Davis *et al.* 1984). Δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα λόγω της καταπόνησης.

2.8. Ανάλυση Δειγμάτων

Λόγω του μικρού μεγέθους των ατόμων, για την μέτρηση των επιπέδων κορτιζόλης χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το σώμα των ατόμων. Πραγματοποιήθηκε αρχικά η εκχύλιση της κορτιζόλης κι έπειτα μετρήθηκε η συγκέντρωση της μέσω της ανοσοενζυμικής τεχνικής ELISA. Όλες οι συνθήκες ελέγχθηκαν σε δύο βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις.

2.8.1. Εκχύλιση κορτιζόλης

Για την διαδικασία εκχύλισης της κορτιζόλης χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Canavello *et al.* (2011) με κάποιες τροποποιήσεις:

Αρχικά τα άτομα αφέθηκαν να ξεπαγώσουν για να μετρηθεί εκ νέου το βάρος τους. Στην συνέχεια, κάθε άτομο ομογενοποιήθηκε σε γυάλινο σωλήνα με την χρήση PBS 1x διαλύματος σε αναλογία 5 ml ανά g ιστού (Dejesus *et al.* 1991) για δύο λεπτά. Το δύο τρίτα αυτής της ποσότητας χρησιμοποιήθηκαν για την ομογενοποίηση και το ένα τρίτο αυτής για ξέπλυμα του ομογενοποιητή (TissueRuptor QIAGEN) και λήψη όλης της εναπομείνουσας ποσότητας.

Στην πορεία, προστέθηκαν 5 ml αιθέρα σε όλα τα δείγματα, και κατόπιν τα δείγματα αναδεύτηκαν στο vortex για ένα λεπτό. Ακολούθησε φυγοκέντριση 25 min στις 2,500 rpm. Ύστερα από την φυγοκέντριση συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε άλλο γυάλινο σωλήνα και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο (45°C) για την εξάτμιση του αιθέρα εντός των δοκιμαστικών σωλήνων. Η διαδικασία της προσθήκης αιθέρα στην εναπομείνουσα υδατική φάση, ανάδευσης στο vortex, φυγοκέντρισης και λήψης του υπερκειμένου ακολουθήθηκε για δύο ακόμα φορές για την μέγιστη απομόνωση της κορτιζόλης.

Ύστερα από την εκχύλιση της κορτιζόλης τα δείγματα αφέθηκαν overnight να εξατμιστούν σε θερμοκρασία δωματίου, και στην πορεία συντηρήθηκαν στους -20 °C ως την ημέρα της ανάλυσης.

2.8.2. Ανοσοενζυμική ανάλυση ELISA

Για την μέτρηση των επιπέδων κορτιζόλης χρησιμοποιήθηκε το *Cortisol EIA kit* (Cayman Chemical). Για την ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο όπως αυτό προτείνεται από το εγχειρίδιο του *Cayman EIA kit* επί των δειγμάτων που είχαν εκχυλιστεί.

Επίσης για την μέτρηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις επί των αρχικών δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, για t=0 min pns (ομάδα ελέγχου) η εκχυλισμένη κορτιζόλη αραιώθηκε σε 1 ml EIA buffer, για t=15 min pns η εκχυλισμένη κορτιζόλη αφότου αραιώθηκε σε 1 ml EIA buffer, στην πορεία αραιώθηκε σε αναλογία 1 προς 3 (400 μl EIA buffer-200 μl δείγματος) και για t=30 min pns όπως και για t=60 min pns η εκχυλισμένη κορτιζόλη αφότου αραιώθηκε σε 1 ml EIA buffer, έπειτα αραιώθηκε σε αναλογία 1 προς 10 πριν την ανάλυση (900 μl EIA buffer -100 μl μl δείγματος). Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματόμετρο στα 405 nm.

2.9. Στατιστική Ανάλυση

Οι διαφορές ανάμεσα στις βιολογικές επαναλήψεις (R1 και R2) των πληθυσμών μελετήθηκαν ανά θερμοκρασία και ανά χρόνο με μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal Wallis με τη χρήση του προγράμματος Statistica 7 (StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system, version 7. www.statsoft.com.) Με την χρήση του ίδιου προγράμματος και του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal Wallis ελέγχθηκαν και οι διαφορές στην συγκέντρωση της κορτιζόλης ανάμεσα στα άτομα των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών ανά χρόνο, όπως επίσης και οι διαφορές στην συγκέντρωση των ατόμων κάθε συνθήκης ως προς τον χρόνο. Η συσχέτιση βάρους και κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση απλής παλινδρόμησης από το πρόγραμμα STATGRAPHICS (Centurion XVI, version 16.1.11 www.statgraphics.com), εξετάζοντας την διαφορά στην κλίση της ευθείας από το μηδέν. Η σημαντικότητα των διαφορών των ρυθμών επιβίωσης ανάμεσα στις διάφορες συνθήκες αλλά και κάθε βιολογική επανάληψη ελέγχθηκε με την χρήση του G-test (Sokal & Rohlf 1969). Η σημαντικότητα των διαφορών στον ρυθμό αύξησης που παρουσίασαν οι διαφορετικοί πληθυσμοί εξετάστηκε με μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal Wallis (Statistica 7).

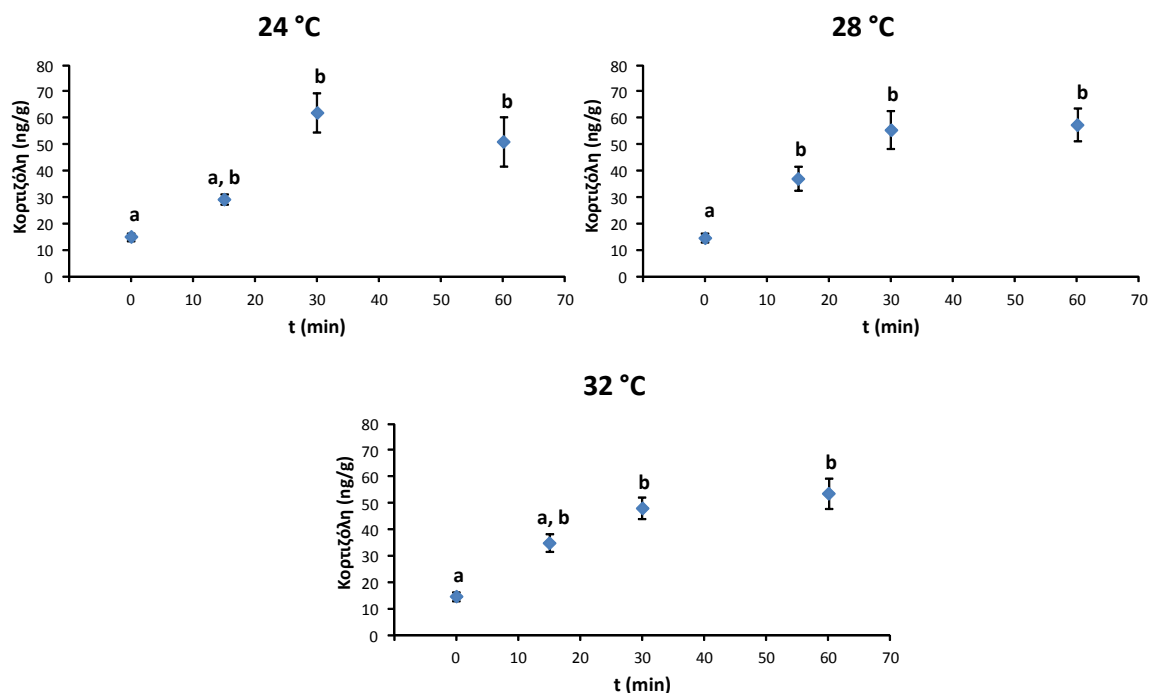
Αποτελέσματα



3.1. Δυναμική της κορτιζόλης

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε το πρότυπο απόκρισης στην οξεία καταπόνηση και για τους τρεις πειραματικούς πληθυσμούς, ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα των δύο επαναλήψεων. Σε κανέναν όμως υπό μελέτη χρόνο, ούτε αυτόν των επιπέδων ηρεμίας ούτε αυτόν των επιπέδων ανάκαμψης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τη θερμοκρασία που εφαρμόστηκε κατά την πρώιμη ανάπτυξη.

Από τα αποτελέσματα της απόκρισης στην καταπόνηση για τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες προκύπτει ένα κοινό πρότυπο κινητικής της απόκρισης (Εικ. 8). Φαίνεται πως η θερμοκρασιακή ιστορία δεν επηρεάζει τα βασικά επίπεδα κορτιζόλης στην ηρεμία, καθώς όλοι οι πληθυσμοί παρουσιάζουν ίδια επίπεδα στην ομάδα ελέγχου. Παρατηρείται, επίσης, όλοι οι πληθυσμοί να παρουσιάζουν μέγιστη συγκέντρωση κορτιζόλης στον χρόνο $t=30$ min pns και μάλιστα με αρκετά κοντινές τιμές μέσης συγκέντρωσης της κορτιζόλης.



Εικόνα 8: Συγκέντρωση κορτιζόλης από όλο το σώμα των ατόμων σε συνάρτηση με τον χρόνο ύστερα από την καταπόνηση ($t=15, 30, 60$ min pns) για την συνθήκη 24, 28 και 32 °C (μέση τιμή, τυπικό σφάλμα). Για $t=0$ η συγκέντρωση της κορτιζόλης της ομάδας ελέγχου, η οποία δεν υπέστη καταπόνηση. Με διαφορετικά γράμματα συμβολίζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση κορτιζόλης ($p<0,05$, Kruskal Wallis). Η καταπόνηση πραγματοποιήθηκε κατά την 55^η drpf για την συνθήκη των 24 °C, την 44^η drpf για την συνθήκη των 28 °C και την 42^η drpf για την συνθήκη των 32 °C.

Σε χρόνο t=15 min pns, φαίνεται πως στατιστικά σημαντική διαφορά από τα επίπεδα ηρεμίας παρουσίασε μόνο η συνθήκη των 28°C (p<0.05). Οι πληθυσμοί των συνθηκών των 24 °C και 32 °C δεν έχουν προλάβει να αυξήσουν σημαντικά την συγκέντρωση κορτιζόλης ως προς τις βασικές της τιμές. Σε χρόνο t=60 min pns τα επίπεδα της κορτιζόλης δεν έχουν μειωθεί σημαντικά για καμία συνθήκη καθώς δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές του χρόνου t=30 min pns.

Ακόμα, στους χρόνους t=30 και t=60 min pns, παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες διακυμάνσεις συγκριτικά με τους υπόλοιπους υπό μελέτη χρόνους και η μικρότερη τυπική απόκλιση που παρατηρήθηκε αφορούσε στην ομάδα ελέγχου (Πίνακας 1).

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος ανάκαμψης (min pns)	Μέση τιμή Συγκέντρωσης κορτιζόλης (ng/g)	Τυπική απόκλιση
24	0	15.1	4.2
	15	29.3	5.9
	30	62.1	20.2
	60	51.1	24.6
28	0	14.6	5.7
	15	37.1	14.8
	30	55.5	22.2
	60	57.5	21.4
32	0	14.7	4.8
	15	35.0	9.3
	30	48.2	11.9
	60	53.7	15.1

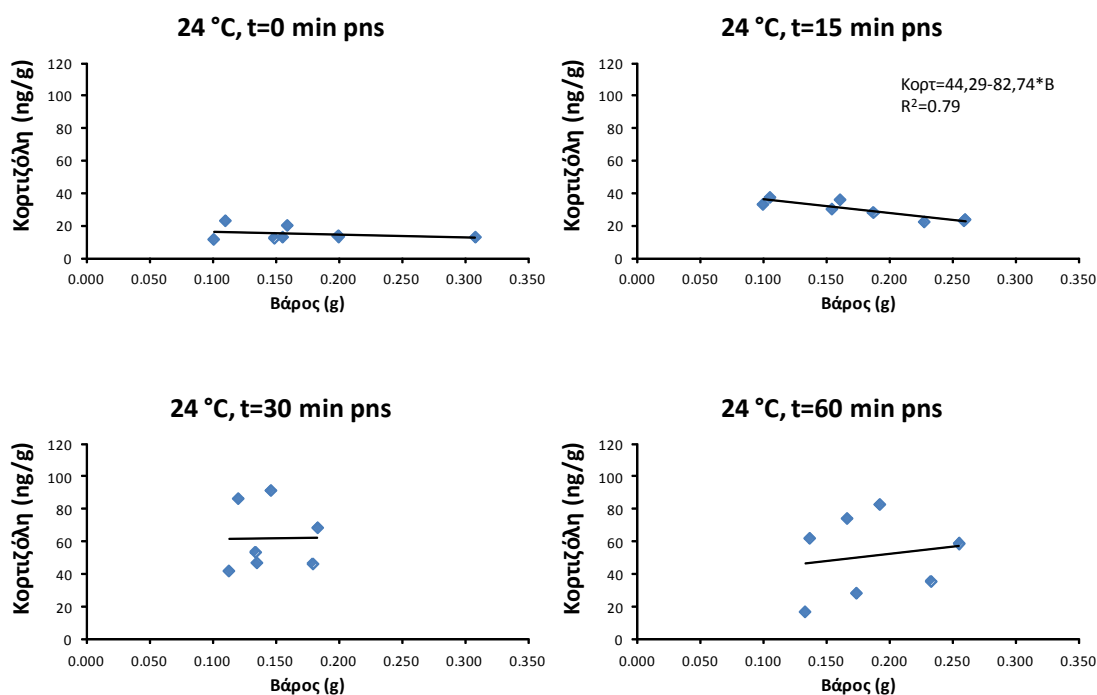
Πίνακας 1: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση συγκέντρωσης της κορτιζόλης για όλους τους υπό εξέταση χρόνους και όλες τις πειραματικές συνθήκες.

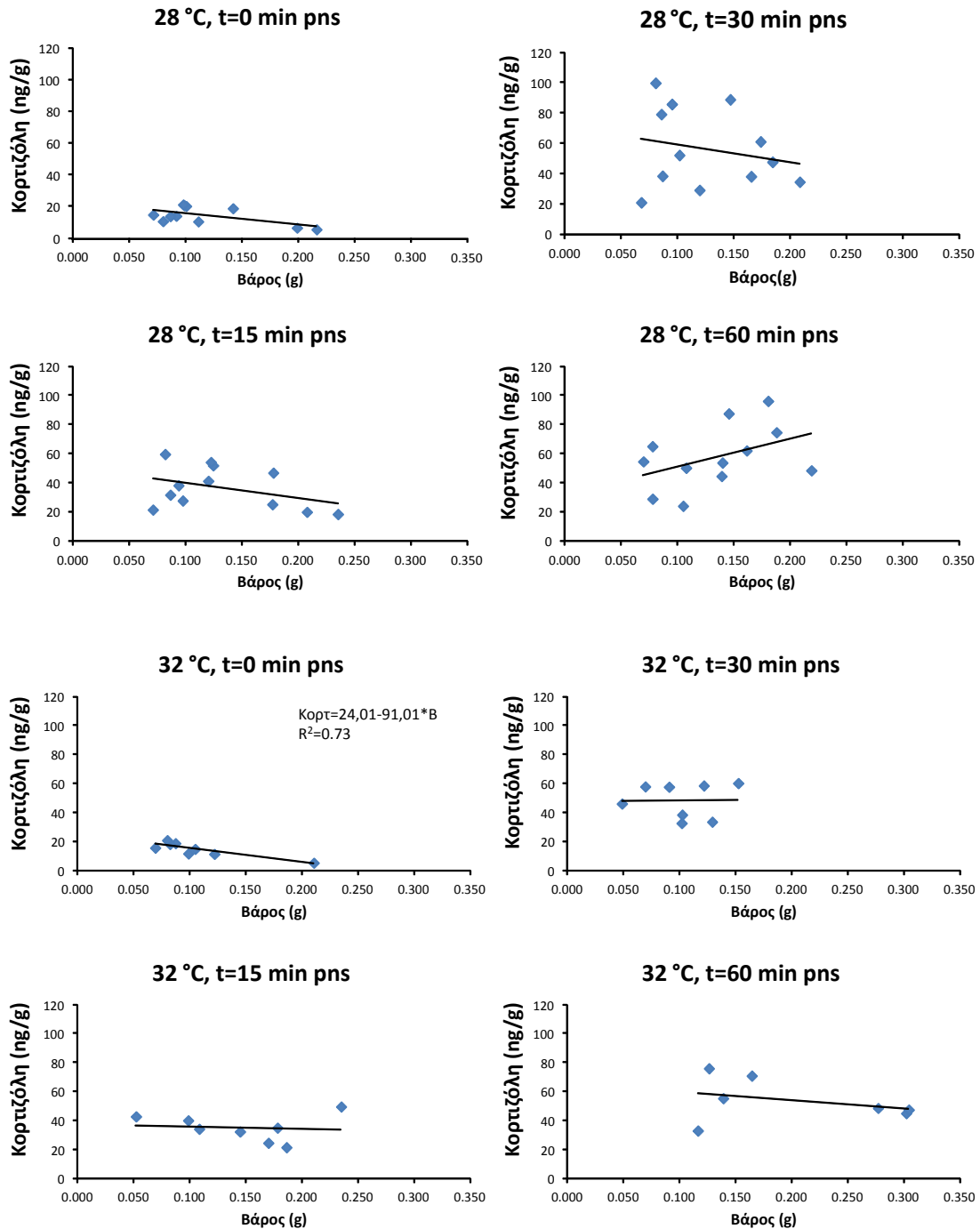
Ως προς την σύγκριση της απόκρισης στην καταπόνηση των δύο βιολογικών επαναλήψεων, ύστερα από μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal Wallis προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο για την συνθήκη των 28°C (p<0,01) και αυτή μόνο για τον χρόνο t=15 min pns.

3.2. Συσχέτιση βάρους κορτιζόλης

Με σκοπό να βρεθεί αν το βάρος επηρεάζει την συγκέντρωση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε συσχέτιση βάρους του σώματος ως προς την συγκέντρωση κορτιζόλης για όλες τις θερμοκρασιακές συνθήκες/χρόνο ανάκαμψης, όπως και για την ομάδα ελέγχου. Φάνηκε πως το βάρος γενικά δεν επηρέασε τα επίπεδα κορτιζόλης (Εικ.9).

Παρατηρήθηκαν, όμως, δύο περιπτώσεις που το βάρος του σώματος επηρέασε τα επίπεδα της κορτιζόλης. Σε χρόνο $t=15$ min pns για την συνθήκη των $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στην ομάδα ελέγχου της συνθήκης των $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της κλίσης από το 0 ($p<0.01$). Φαίνεται πως στις κατώτερες τιμές κορτιζόλης, δηλαδή στα επίπεδα ηρεμίας αλλά και στην αρχή της απόκρισης, το βάρος επηρέασε την απόκριση για τις δύο από τις τρεις συνθήκες. Σε αυτές τις περιπτώσεις υπολογίστηκε και το γραμμικό μοντέλο πρόβλεψης της συγκέντρωσης της κορτιζόλης από το βάρος.

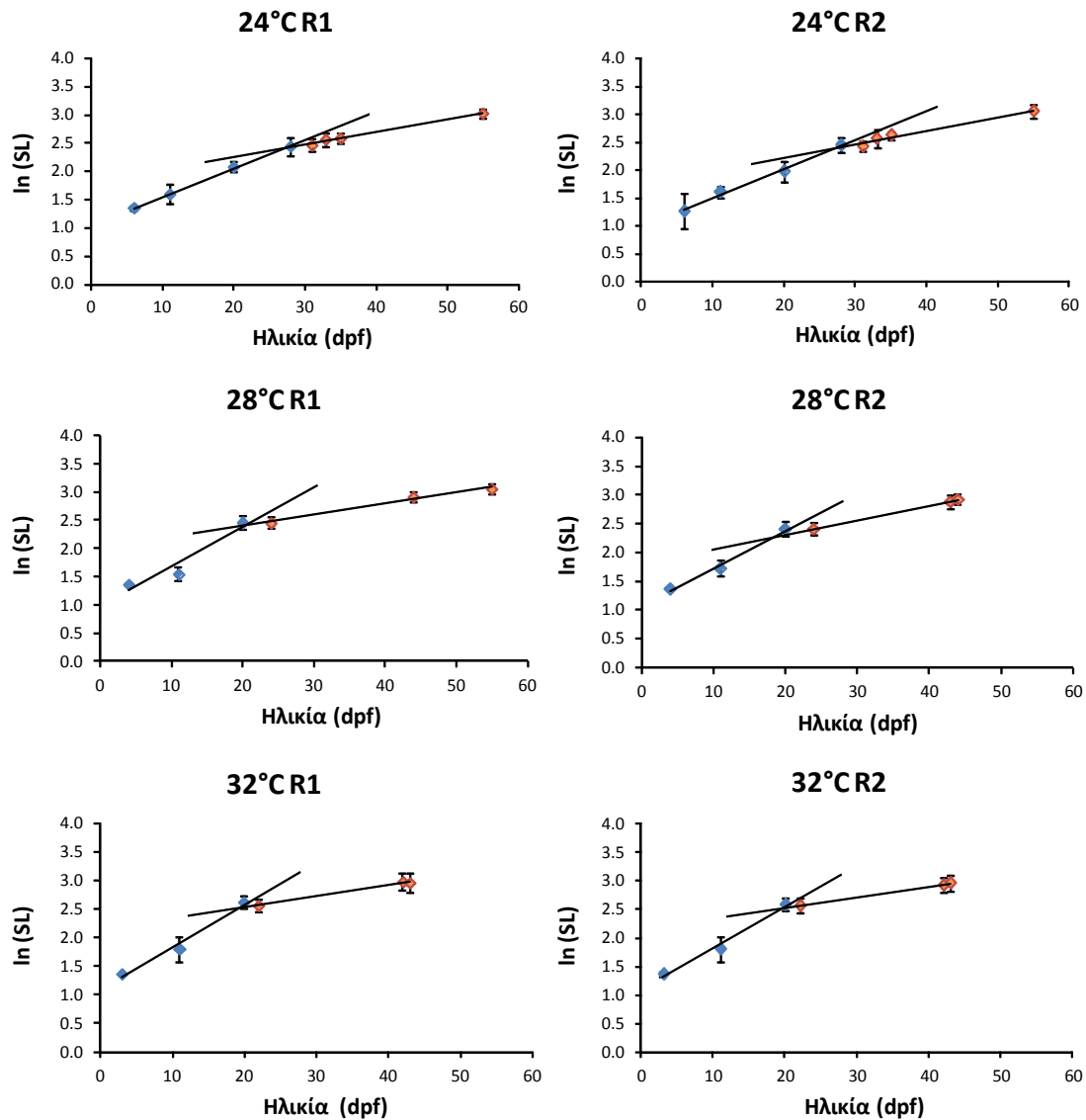




Εικόνα 9: Σχέση συγκέντρωσης κορτιζόλης – βάρους σώματος για όλες τις συνθήκες και όλους τους χρόνους ανάκαμψης καθώς και των ομάδων ελέγχου. Ο έλεγχος της κλίσης πραγματοποιήθηκε με απλή παλινδρόμηση. Στα δύο γραφήματα που αναγράφεται το γραμμικό μοντέλο πρόβλεψης της συγκέντρωσης της κορτιζόλης από το βάρος του σώματος, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της κλίσης από το 0 ($p<0,01$). Στα υπόλοιπα γραφήματα δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση.

3.3. Αύξηση τυπικού μήκους ως προς την ηλικία

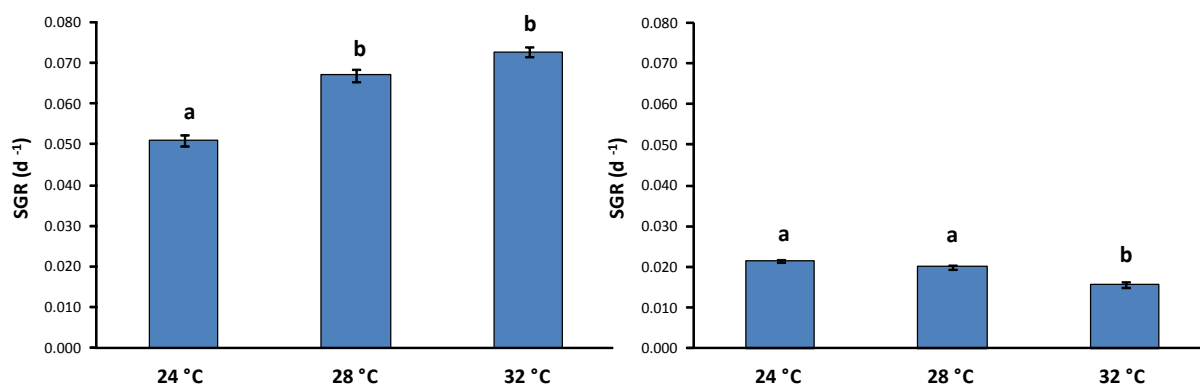
Σε όλες τις θερμοκρασίες η αύξηση των πληθυσμών παρουσίασε δύο διακριτές περιόδους. Μία ταχείας αύξησης μέχρι τα 11-14 mm μέσου τυπικού μήκους σώματος, και μία βραδύτερης αύξησης ύστερα από αυτό το μήκος (Εικ.10).



Εικόνα 10: Καμπύλες αύξησης για όλες τις πειραματικές συνθήκες και στις δύο επαναλήψεις. Παριστάνεται η αύξηση των λογαριθμημένων τιμών μέσου τυπικού μήκους ως προς την ηλικία (μέση τιμή, τυπική απόκλιση). Dpf: Ημέρες μετά την γονιμοποίηση.

Η αλλαγή του ρυθμού αύξησης έγινε στην ηλικία των 20 dpf για τη θερμοκρασία των 28 °C και 32 °C και στην 28^η dpf για την θερμοκρασία των 24 °C. Το σημείο καμψής της καμπύλης αύξησης αντιστοιχεί στον χρόνο μετάβασης των πληθυσμών στις κοινές συνθήκες.

Για τον υπολογισμό του ειδικού ρυθμού αύξησης πραγματοποιήθηκαν δύο εκτιμήσεις. Η πρώτη αφορούσε στον ρυθμό αύξησης, όπως αυτός εκτιμήθηκε μέχρι το χρονικό σημείο αλλαγής του, και η δεύτερη κατόπιν τούτου ως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας για όλους τους πειραματικούς πληθυσμούς. Η θερμοκρασία ανάπτυξης μέχρι τη μεταμόρφωση είχε σημαντική επίδραση στον ρυθμό αύξησης των ατόμων τόσο κατά την περίοδο εφαρμογής των διαφορετικών συνθηκών, όσο και μετά ($p < 0,05$) (Εικ. 11). Κατά την πρώτη περίοδο ο SGR αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, χωρίς ωστόσο να διαφέρει σημαντικά ο SGR της συνθήκης 28°C με αυτόν της συνθήκης 32°C. Κατά την δεύτερη περίοδο ο SGR των ατόμων που αρχικά αναπτύχθηκαν στους 32°C ήταν μικρότερος ($p < 0,05$) των άλλων των δύο συνθηκών.



Εικόνα 11: Ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR). Αριστερά, ο ειδικός ρυθμός αύξησης μέχρι τις 20 dpf για τους πληθυσμούς των 28 °C και 32 °C και 28 dpf για τους πληθυσμούς των 24 °C. Δεξιά, ο ειδικός ρυθμός αύξησης στις 42, 44 και 55 dpf για τους πληθυσμούς που είχαν εκτραφεί στους 32, 28 και 24 °C αντιστοίχως.

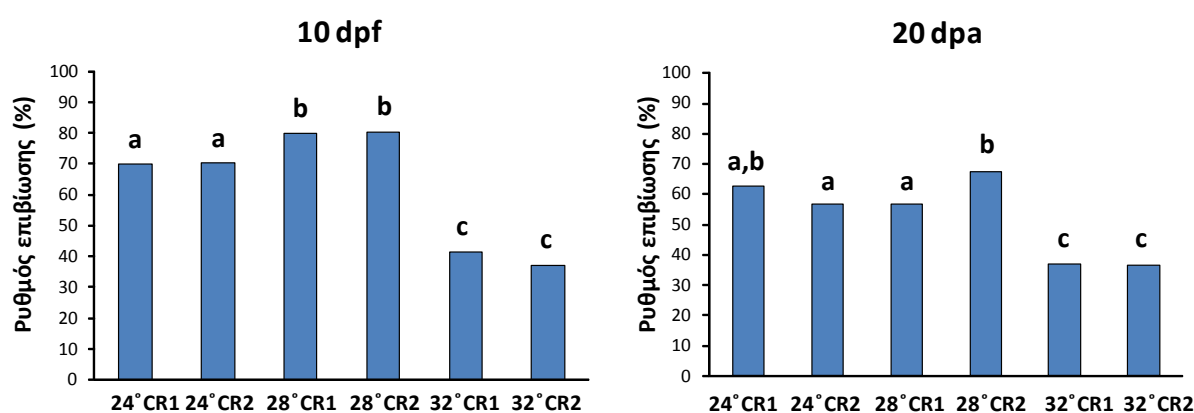
Ως προς την σύγκριση των βιολογικών επαναλήψεων ανά συνθήκη προέκυψε πως κατά την πρώτη περίοδο ταχείας αύξησης δεν σημειώθηκαν διαφορές. Ως προς τη δεύτερη υπό μελέτη περίοδο οι δύο επαναλήψεις των 28 °C διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0,01$), ενώ οι υπόλοιπες βιολογικές επαναλήψεις των δύο άλλων συνθηκών δε διέφεραν.

3.4. Ρυθμός επιβίωσης

Ο ρυθμός της επιβίωσης εκτιμήθηκε χωριστά σε δύο στάδια που αντιστοιχούσαν σε άτομα που επιβίωσαν με μέσο τυπικό μήκος μικρότερο και μεγαλύτερο των 8 mm (Εικ. 12). Όπως παρατηρείται, η μεγαλύτερη επιβίωση κατά την πιο κρίσιμη περίοδο ($SL < 8$ mm) αντιστοιχούσε στην θερμοκρασία των 28°C,

έπειτα των 24 °C και τέλος των 32 °C. Κατά την πρώτη περίοδο ο ρυθμός επιβίωσης στις τρεις διαφορετικές συνθήκες διέφερε με $p < 0.01$. Οι βιολογικές επαναλήψεις των ίδιων συνθηκών δεν διέφεραν.

Στο τέλος της δεύτερης περιόδου ($SL > 8$ mm) ο ρυθμός επιβίωσης των πληθυσμών των 24 °C διαφοροποιήθηκε εντελώς από την συνθήκη των 32 °C ($p < 0.001$). Ο ρυθμός επιβίωσης των δύο βιολογικών επαναλήψεων της συνθήκης των 24 °C δεν διέφερε και δεν διέφερε επίσης με την μία βιολογική επανάληψη της συνθήκης των 28 °C. Οι επαναλήψεις της συνθήκης των 28°C διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.01$).



Εικόνα 12: Ρυθμός επιβίωσης 10 ημέρες μετά την γονιμοποίηση (dpf) και 20 ημέρες μετά των εγκλιματισμό στις κοινές συνθήκες. Διαφορετικά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,01$, G-test.).

Συζήτηση



Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί αν η θερμοκρασία ανάπτυξης αποτελεί παράγοντα επαγωγής φαινοτυπικής πλαστικότητας ως προς την απόκριση στην καταπόνηση. Είναι ήδη γνωστό πως το zebrafish είναι είδος πλαστικό, τόσο σε επίπεδο φυσιολογίας όσο και συμπεριφοράς (Egan *et al.* 2009, Georga & Koumoundouros 2010, Johnston *et al.* 2009, Parichy *et al.* 2009, Sfakianakis *et al.* 2011, Scott & Johnston 2012). Καθώς το zebrafish είναι οργανισμός μοντέλο για πολλούς τομείς της βιολογίας, αλλά και έχει ενδοκρινικό σύστημα παρόμοιο με των υπολοίπων σπονδυλωτών (Lohr & Hammerschmidt 2011), στην μελέτη αυτή επιχειρήθηκε η εκτίμηση της απόκρισης ιχθυδίων zebrafish στο στρες.

Τα τελευταία χρόνια έμφαση δίνεται στην μελέτη της απόκρισης ενηλίκων ατόμων zebrafish στο στρες. Η μελέτη της απόκρισης στο στρες έχει μελετηθεί ήδη ακόμα και από το στάδιο των νυμφών και έχει φανεί πως η έναρξη της χρονολογείται στις 97 hpf (δύο ημέρες μετά την εκκόλαψη) (Alsop & Vijayan 2008, Yeh *et al.* 2013). Επειδή ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί η πλαστικότητα του είδους στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο και με ερώτημα την επίδραση της θερμοκρασιακής ιστορίας στην απόκριση στην καταπόνηση, όπως επίσης και η περιγραφή της κινητικής της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στον χρόνο στο συγκεκριμένο στάδιο, αυτή η μελέτη είναι μία καινοτόμος προσέγγιση ως προς την μελέτη της πλαστικότητας του είδους.

4.1. Τιμές αναφοράς της κορτιζόλης (baseline values) σε ιχθύδια zebrafish

Στην παρούσα εργασία όλοι οι πληθυσμοί παρουσίασαν ίδια επίπεδα μέσης συγκέντρωσης κορτιζόλης στην ομάδα ελέγχου. Αυτό συνεπάγεται πως η θερμοκρασία κατά την πρώιμη ανάπτυξη δεν επηρεάζει τις βασικές τιμές κορτιζόλης σε μεταγενέστερο στάδιο. Ακόμα, η μελέτη αυτή έδειξε πως οι τιμές ηρεμίας για την κορτιζόλη στο στάδιο των ιχθυδίων είναι 3-10πλάσιες συγκριτικά με των ενηλίκων που έχουν ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά (Πίνακας 2). Οι διαφορές των βασικών επιπέδων κορτιζόλης ως προς την βιβλιογραφία, για τα άτομα δηλαδή που δεν υπέστησαν καταπόνηση είναι πολύ πιθανό να οφείλονται σε διαφορά του **αναπτυξιακού σταδίου**. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απόκριση των ιχθυδίων, για την οποία δεν υπάρχουν ως τώρα τιμές αναφοράς προς σύγκριση,

καθώς οι πιο πολλές εργασίες αφορούν σε ενήλικα άτομα (π.χ. Ramsay *et al.* 2006, Ramsay *et al.* 2009, Pavlidis *et al.* 2013) αλλά και σε νύμφες (π.χ. Alderman & Bernier 2009, Alsop & Vijayan 2009, Griffiths *et al.* 2012).

Μέχρι στιγμής λίγα δεδομένα υπάρχουν για να θεωρηθεί με ασφάλεια πως τα ψάρια επιδεικνύουν συνεχή αύξηση της απόκρισης καθώς αυξάνονται, αλλά έχει αποδειχτεί ωστόσο πως κάποια ψάρια έχουν πολύ υψηλή απόκριση κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης (Barton 2002) συγκριτικά με αυτό που είχαν ως λάρβες. Ανάδρομα ψάρια της οικογένειας των σαλμονοειδών εμφανίζονται ιδιαίτερος ευαίσθητα σε συγκεκριμένους παράγοντες καταπόνησης, ειδικά σε φυσικούς παράγοντες, κατά το δεύτερο στάδιο της μεταμόρφωσης όπου τα ιχθύδια προετοιμάζονται για την μετάβαση στο θαλασσινό νερό (Young *et al.* 1989). Τα επίπεδα της κορτιζόλης κατά το στάδιο αυτό μπορούν να διπλασιαστούν συγκριτικά με τα επίπεδα ηρεμίας (Barton *et al.* 1985). Βεβαίως τα συγκεκριμένα είδη αποτελούν μία ιδιαίτερη ομάδα και η μετάβασή τους από το γλυκό στο θαλασσινό νερό επάγει και πολλές ακόμα οσμωρυθμιστικές μεταβολές οι οποίες μπορεί να είναι από μόνες τους στρεσογόνες, οπότε πρέπει να ληφθεί υπόψη η ιδιαιτερότητα τους αυτή πριν καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης γενικά αναμένονται υψηλότερες τιμές απόκρισης.

Πράγματι όμως, οι Pottinger *et al.* (1995) πρότειναν πως καθώς τα ψάρια ωριμάζουν αναπαραγωγικά, οι πρωτογενείς αποκρίσεις μπορεί να μειώνονται σε μέγεθος ως αποτέλεσμα μειωμένης ευαισθησίας στην καταπόνηση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, το μέγεθος δεν είναι αυτό το οποίο επάγει την διαφορά, κι επίσης το βάρος δεν επηρεάζει την ποικιλομορφία στα επίπεδα της κορτιζόλης κάτι το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, πλην δύο συνθηκών. Έτσι, προτείνουν πως κατά το στάδιο της ενηλικίωσης τα βασικά επίπεδα κορτιζόλης είναι μειωμένα και πως η διαφορά στην απόκριση των ώριμων και μη αναπαραγωγικά ατόμων οφείλεται στην ευαισθησία της υπόφυσης. Προηγούμενες μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει πως η αυξημένη συγκέντρωση των ανδρογόνων καταστέλλει την ευαισθησία του άξονα υπόφυσης-μεσοεφρού. Χαρακτηριστικά, οι Handa *et al.* (1994) έδειξαν πως η τεστοστερόνη μειώνει τα επίπεδα ACTH και της κορτικοστερόνης.

Προηγούμενες μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα άτομα, πέραν της διαφοράς του αναπτυξιακού σταδίου είχαν και κάποιες μεθοδολογικές διαφορές οι οποίες ενδεχομένως δικαιολογούν επίσης ένα μέρος της μεγάλης απόκλισης

(Πίνακας 2). Οι Pavlidis *et al.* (2013) χρησιμοποίησαν διαφορετική **θερμοκρασία εκτροφής**, ενώ επίσης χρησιμοποίησαν και διαφορετική **φωτοπερίοδο**. Σύμφωνα με τους Pavlidis *et al.* (1999) η φωτοπερίοδος επηρεάζει τους ημερήσιους ρυθμούς κορτιζόλης στην συναγρίδα, συνεπώς ενδέχεται η διαφορά στην φωτοπερίοδο που εφαρμόστηκε να προκάλεσε αποκλίσεις.

Διαφορές ως προς την βιβλιογραφία θα μπορούσαν ακόμα να αποδοθούν και σε διαφορές ως προς τον τρόπο ανάλυσης των δειγμάτων. Έτσι, ενώ οι Ramsay *et al.* (2006) μελετώντας την επίδραση του συνωστισμού και της νηστείας στην απόκριση στο στρες δεν διέφεραν σημαντικά ως προς την θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο που εφάρμοσαν (Πίνακας 2), χρησιμοποίησαν διαφορετικές **αναλυτικές τεχνικές**. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν την ραδιοανοσοενζυμική ανάλυση **RIA** έναντι της ELISA, ενώ επίσης χρησιμοποίησαν και διαφορετικό **πρωτόκολλο εκχύλισης** της κορτιζόλης χρησιμοποιώντας 8 ml αιθέρα σε δύο επαναλήψεις έναντι 5 ml τριών επαναλήψεων, κάτι το οποίο θα μπορούσε να σημαίνει διαφορά στην ικανότητα απομόνωσης της συνολικής κορτιζόλης.

Πηγές	Βασικές Τιμές Κορτιζόλης (ng/g)	Στάδιο	Θερμοκρασία	Φωτοπερίοδος
Παρούσα εργασία	14,70-15,10	Ιχθύδια	28 °C	14L:10D
Pavlidis <i>et. al</i> (2013)	1,05	Ενήλικα	26 °C	12L:12D
Ghisleni <i>et al.</i> (2012)	5,00	Ενήλικα	28±2 °C	14L:10D
Parker <i>et al.</i> (2012)	0,04	Ενήλικα	28 °C	14L:10D
Egan <i>et al.</i> (2009)	0,06	Ενήλικα	25-27 °C	12L:12D
Ramsay <i>et al.</i> (2009)	5,00	Ενήλικα	28,5 °C	14L:10D
Barcellos <i>et al.</i> (2007)	6,80	Ενήλικα	26 °C	14L:10D
Ramsay <i>et al.</i> (2006)	3,20	Ενήλικα	28,5 °C	14L:10D

Πίνακας 2: Παράθεση βασικών μέσων τιμών κορτιζόλης της παρούσας εργασίας και κάποιων άλλων επιλεγμένων βιβλιογραφικά αναφερόμενων ενηλικών ατόμων.

Οι Barcellos *et al.* (2007) μελετώντας την επίδραση της παρουσίας θηρευτή βρήκαν βασικά επίπεδα κορτιζόλης ίσα με 6,8 ng/gr τα οποία προσεγγίζουν αρκετά αυτά των Ramsay *et al.* (2009) και των Ghisleni *et al.* (2012). Ακόμα οι Parker *et al.* (2012) μελετώντας τις τιμές ηρεμίας της κορτιζόλης σε ενήλικα άτομα τα οποία είτε ήταν απομονωμένα σε δεξαμενές είτε σε ομάδες εκτίμησαν βασικές τιμές κορτιζόλης ίσες με 0,02 και 0,04 ng/g αντιστοίχως. Οι τιμές αυτές είναι εξαιρετικά χαμηλότερες τόσο από της παρούσας εργασίας όσο και των υπολοίπων για τα ενήλικα άτομα.

Παρατηρείται λοιπόν βιβλιογραφικά πως ακόμα και στο ίδιο στάδιο υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις ως προς τις τιμές ηρεμίας για το zebrafish.

4.2. Δυναμική της απόκρισης στην καταπόνησης

Μέχρι στιγμής λίγα είναι γνωστά για την δυναμική της κορτιζόλης στο zebrafish (Ramsay *et al.* 2009, Pavlidis *et al.* 2013, Pottinger & Calder 1995). Γενικότερα, σε όσες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα, παρατηρούνται διαφορές τόσο στις συνθήκες εκτροφής, όσο στην δοκιμασία καταπόνησης αλλά και στον τρόπο ανάλυσης των δειγμάτων, κάτι που καθιστά δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Κάποιες από τις διαφορές κατά την εκτροφή αναφέρθηκαν στην ενότητα 4.1.

Στην παρούσα εργασία το πρότυπο που παρατηρήθηκε αφορούσε σε ίδια βασικά επίπεδα κορτιζόλης, αύξησης τους σε 15 min pns για την συνθήκη των 28°C και σε 30 min pns για τις άλλες δύο συνθήκες. Παρατηρήθηκε λοιπόν μία καθυστέρηση στην αύξηση των τιμών της κορτιζόλης για τις συνθήκες των 24 °C και 32°C. Για όλες τις συνθήκες η μέση συγκέντρωση κορτιζόλης των δειγμάτων του χρόνου t=15 min pns ήταν σχεδόν διπλάσια σε σχέση με τις τιμές της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 1). Τα δείγματα της μισής ώρας διατηρήθηκαν σταθερά έως και τη μία ώρα για όλες τις συνθήκες. Παρόλα αυτά, για την συνθήκη των 24°C, παρατηρήθηκε μία πτωτική τάση στην δειγματοληψία της μίας ώρας (Εικ. 8) η οποία δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά. Καθώς ο αριθμός όμως των ατόμων ήταν μικρός (n=4) ανά συνθήκη και ανά χρόνο, και δεδομένης της βιολογικής ποικιλομορφίας στην απόκριση, ενδεχομένως θα απαιτούνταν περισσότερα δείγματα για τον σαφή καθορισμό της κινητικής της συγκέντρωσης της κορτιζόλης.

Το πρότυπο ιδιαίτερος αυξημένων τιμών σε σύγκριση με τα ενήλικα παρατηρείται και στους χρόνους ανάκαμψης πέραν της ομάδας ελέγχου. Γενικότερα, όπως προαναφέρθηκε, η απόκριση στην καταπόνηση πέραν της γενετικής επίδρασης δέχεται και την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων. Διαφορές στον τύπο, την ένταση και τον χρόνο εφαρμογής του παράγοντα καταπόνησης, την ώρα της ημέρας, το μήκος κύματος του φωτός, τη θερμοκρασία εγκλιματισμού, τη διατροφική κατάσταση, τη ποιότητα του νερού, το χρώμα του υποβάθρου των ενυδρείων, η προσβολή από ασθένειες, μπορεί να επάγουν διαφορές στις μετρήσεις της απόκρισης

(ανασκόπηση Barton 2002, Pankhurst 2011). Βεβαίως, εδώ να σημειωθεί πως στην παρούσα εργασία που οι τιμές ηρεμίας διαφοροποιήθηκαν τόσο πολύ από τις αναφερόμενες βιβλιογραφικά ως προς τα ενήλικα άτομα, οι διαφορές οι οποίες παρατηρούνται στους χρόνους ανάκαμψης και ειδικά κορύφωσης, ήταν αναμενόμενο να συμβούν, δεδομένου ότι τα αρχικά επίπεδα κορτιζόλης ήταν τόσο υψηλότερα.

Ένας παράγοντας που εξηγεί τις διαφορές της παρούσας μελέτης από την βιβλιογραφία, αν όχι ο βασικός και κυριότερος, όπως προαναφέρθηκε είναι το αναπτυξιακό στάδιο. Αν ωστόσο εστιάσουμε σε διαφορές ως προς την διάρκεια και το είδος του παράγοντα καταπόνησης και συγκρίνουμε της τιμές της παρούσας εργασίας με τις συγγενέστερες δυνατές συνθήκες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα, θα παρατηρήσουμε και πάλι διαφορές ως προς την βιβλιογραφία.

Οι Ramsay *et al.* (2009) ελέγχοντας τα επίπεδα της κορτιζόλης έως και μια ώρα μετά την καταπόνηση ανά τακτούς χρόνους παρατήρησαν πως αυτά αυξήθηκαν άμεσα μετά την εφαρμογή του παράγοντα καταπόνησης, και έπεσαν εντός μίας ώρας. Τα επίπεδα κορτιζόλης για την ομάδα ελέγχου ήταν 5 ng/g ενώ τα μέγιστα επίπεδα αντιστοιχούσαν στον χρόνο 15 min μετά το στρες (30 ng/g) και μέχρι τη μία ώρα είχαν επανέλθει στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου (5 ng/gr). Στην παρούσα μελέτη τα μέγιστα επίπεδα μέσης συγκέντρωση κορτιζόλης αντιστοιχούσαν στον χρόνο $t=30$ min rms και από εκεί κι έπειτα τα επίπεδα κορτιζόλης ήταν σταθερά μέχρι την μία ώρα (Εικ. 8).

Η σύγκριση των δύο αυτών εργασιών οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα ενήλικα σε χρόνο ανάκαμψης $t=15$ min έχουν την ίδια συγκέντρωση κορτιζόλης με τα ιχθύδια κατά την ηρεμία. Διαφέρουν, λοιπόν, οι βασικές τιμές ηρεμίας και κορύφωσης καθώς και ο χρόνος κορύφωσης και επαναφοράς στα αρχικά επίπεδα. Μία πιθανή ερμηνεία που εξηγεί τις διαφορές έγκειται στο ότι οι Ramsay *et al.* (2009) χρησιμοποίησαν μεν τον ίδιο **παράγοντα καταπόνησης**, σύλληψη και αιώρηση σε απόχη, αλλά για διαφορετικούς χρόνους. Αρχικά, τα άτομα κρατήθηκαν στην απόχη εκτός νερού για τρία λεπτά, αφέθηκαν να χαλαρώσουν άλλα τρία λεπτά και επανακαταπονήθηκαν για άλλα τρία λεπτά στην απόχη, κάτι το οποίο διαφέρει από την παρούσα προσέγγιση, η οποία αφορούσε σε δύο λεπτά στρες και έπειτα χαλάρωση για συγκεκριμένους χρόνους και την επακόλουθη δειγματοληψία τους. Το πρωτόκολλο καταπόνησης παρότι πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Ramsay *et al.* (2009) τροποποιήθηκε ως προς την επανάληψη της καταπόνησης αλλά και ως προς τον χρόνο διάρκειας της, λόγω του σταδίου που μελετήσαμε, για αποφυγή μη αναστρέψιμων επιδράσεων της

οξείας καταπόνησης (κυρίως την θνησιμότητα). Η διάρκεια λοιπόν της καταπόνησης θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορές ανάμεσα στις δύο αυτές μελέτες.

Οι Pavlidis *et al.* (2013) εξετάζοντας την δυναμική της κορτιζόλης σε διάστημα 24 ωρών βρήκαν επίσης πως η μέγιστη τιμή της επιτυγχάνεται σε χρόνο $t=30$ min pns (11,87 ng/gr) και πως για $t=60$ min pns διατηρούνται και πάλι υψηλά επίπεδα, αλλά από την μισή ώρα και έπειτα τα επίπεδα της κορτιζόλης αρχίζουν να έχουν πτωτική τάση. Διαφορές στην **ένταση και διάρκεια της καταπόνησης**, και σε αυτήν την περίπτωση, θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τις διαφορετικές εκτιμήσεις στο πρότυπο δυναμικής καθώς οι Pavlidis *et al.* (2013) υπέβαλλαν τα άτομα σε δοκιμασία κυνηγιού για 4 min και έκθεση στον αέρα για 1 min.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως ο χρόνος επαναφοράς στα επίπεδα ηρεμίας ποικίλει επίσης. Έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει σε διάστημα ωρών κυρίως παρά λεπτών, αλλά αυτό που έχει σημασία ως προς τη διάρκεια αυτή έχει να κάνει με τις συνθήκες στις οποίες φυλάσσεται ο εκάστοτε οργανισμός μέχρι να επανέλθει στην ηρεμία (ανασκόπηση Pankhurst 2011). Γενικότερα, ο χρόνος επαναφοράς ύστερα από οξεία καταπόνηση έχει αναφερθεί να είναι σύντομος όσο 2-6 ώρες (Pickering, Pottinger *et al.* 1982, Young & Cech Jr 1993) και παρατεταμένος έως και 24-48 ώρες (Pankhurst *et al.* 1992, Vijayan & Moon 1994, Barnett & Pankhurst 1998). Ταχύτερη πτώση των τιμών της κορτιζόλης του πλάσματος ίσως αντικατοπτρίζει την απευαισθητοποίηση του HPI άξονα που προκαλείται από παρατεταμένη έκθεση σε παράγοντες καταπόνησης (ανασκόπηση Pankhurst 2011).

Τα ψάρια μπορούν να επιδεικνύουν συσσωρευτική απόκριση σε επαναλαμβανόμενους παράγοντες καταπόνησης (Carmichael *et al.* 1983, Flos *et al.* 1988, Maule *et al.* 1988). Οι Barton *et al.* (1986) έδειξαν πως ιχθύδια *Oncorhynchus tshawytscha* τα οποία υπέστησαν πολλαπλούς παράγοντες καταπόνησης χειρισμού επέδειξαν συσσωρευτική απόκριση ως προς την τιμή κορύφωσης της κορτιζόλης. Στην παρούσα εργασία υπάρχουν δύο παράγοντες που ενδέχεται να έχουν αποτελέσει επιπρόσθετους παράγοντες καταπόνησης κατά την ηρεμία, η **πυκνότητα** και το **χρώμα των ποτηριών**, στα οποία διατηρήθηκαν τα άτομα κατά το διάστημα ανάκαμψης μετά την καταπόνηση.

Στην παρούσα εργασία, τα άτομα τα οποία αφέθηκαν να χαλαρώσουν για τους χρόνους 15, 30 και 60 min τοποθετήθηκαν σε διάτρητα ποτήρια όγκου 150 ml και σε πυκνότητα 5 ατόμων/ 150 ml, δηλαδή πυκνότητα ίση με 33 άτομα/1 L. Αυτή η προσέγγιση ενδεχομένως να αποτέλεσε επιπρόσθετο παράγοντα στρες, δεδομένης της

διαφοράς **πυκνότητας και συνωστισμού** από τις αρχικές συνθήκες, και την εμπειρία ενός νέου περιβάλλοντος, ακόμα και αν ήταν υπό καθεστώς χαλάρωσης. Οι Pavlidis *et al.* (2013) χρησιμοποίησαν beakers με πυκνότητα 3 άτομα/1,1 L. Ακόμα, οι Ramsay *et al.* (2006), όταν έλεξαν την επίδραση του συνωστισμού, στην ομάδα ελέγχου χρησιμοποίησαν πυκνότητα ίση με 0,25 ψάρια/Lt. Ενδέχεται λοιπόν, πέραν της διάρκειας σύλληψης και έκθεσης στον αέρα, η πυκνότητα κατά τον χρόνο χαλάρωσης να συνεπέδρασε ως παράγοντας επιπρόσθετης καταπόνησης και να αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της κορτιζόλης και να καθυστέρησε τον χρόνο επαναφοράς.

Ακόμα, οι Pavlidis *et al.* (2013) βρήκαν πως το **χρώμα του υποβάθρου** (background color) επηρεάζει τα επίπεδα της κορτιζόλης στο zebrafish και πιο συγκεκριμένα, τα επηρεάζει θετικά αυξανόμενης της φωτεινότητας. Δοκιμάζοντας λευκό χρώμα στα ενυδρεία τους, οι αποκτηθείσες τιμές κορτιζόλης μετά την καταπόνηση ήταν ίσες με $37,8 \pm 6,7$ ng/g, πολύ υψηλότερες σε σχέση με το διάφανο χρώμα των ενυδρείων που η τιμή της κορτιζόλης ήταν ίση με $4,8 \pm 1,1$ ng/g. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί μελετώντας τα επίπεδα της α -MSH (melanophore stimulating hormone), η οποία είναι μία ορμόνη η οποία σχετίζεται με την διασπορά των μελανοσωμάτων στο σώμα των ψαριών, αλλά είναι και μία κορτικοεκκριτική ορμόνη η οποία συμμετέχει κατά την απόκριση. Ίσως λοιπόν το λευκό χρώμα υποβάθρου επάγει την έκκριση α -MSH η οποία με τη σειρά της επάγει την έκκριση κορτιζόλης (Baker *et al.* 1984). Δεδομένης αυτής της μελέτης, είναι πολύ πιθανό τα άτομα να είχαν διαφορετική απόκριση από τις βιβλιογραφικά αναφερόμενες, να καθυστέρησε ο χρόνος επαναφοράς των επιπέδων κορτιζόλης αλλά και να παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τις αναμενόμενες, καθώς καθ' όλη την διάρκεια της ανάκαμψης ήταν τοποθετημένα σε λευκά ποτήρια, και άρα ήταν υπό καθεστώς παρατεταμένης καταπόνησης.

Ένας ακόμα παράγοντας που θα μπορούσε να διαφοροποιεί την απόκριση είναι ο **τρόπος ευθανασίας**. Στην παρούσα μελέτη η ευθανασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αναισθητικού MS-222 και ισοφλουρανίου. Η χρήση του αναισθητικού MS-222 έχει αποδειχτεί πως αποτελεί πιθανό παράγοντα δυσκαταπόνησης όταν χρησιμοποιείται για ευθανασία και πως ο χρόνος δράσης του είναι 55 sec. Μέχρι εκείνο το σημείο έχει προλάβει να προκαλέσει παράγοντα καταπόνησης και ενδέχεται λοιπόν να αλλοιώνει τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης της κορτιζόλης (Wilson *et al.* 2009). Ακόμη, άλλες μελέτες έχουν δείξει πως όσο

περισσότερο χρόνο τα άτομα εκτίθενται στο MS-222 τόσο πιο πολύ αυξάνεται η συγκέντρωση της κορτιζόλης και μάλιστα έχει φανεί πως τα επίπεδα κορτιζόλης στην ραβδωτή πέρκα και την ιριδιζούσα πέστροφα αυξάνονται σημαντικά ακόμα και σε μικρή συγκέντρωση του αναισθητικού (25 mg/ml) (Barton & Peter 1982, Davis *et al.* 1982, Wagner *et al.*, 2002). Άλλες μελέτες όμως έχουν δείξει πως η συγκέντρωση της κορτιζόλης μπορεί και να μειωθεί ύστερα από την χρήση αναισθητικού. Οι Crosby *et al.* (2006), μελετώντας την επίδραση της αναισθησίας στην κορτιζόλη του πλάσματος έδειξαν πως όλα τα άτομα που είχαν εκτεθεί σε αναισθητικό MS-222 είχαν χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης ως προς την ομάδα ελέγχου.

Ως προς τον συγκεκριμένο παράγοντα, η διαφορά με τις υπόλοιπες εργασίες δεν εστιάζεται μόνο στον τρόπο ευθανασίας καθώς η πλειοψηφία των υπολοίπων εργασιών χρησιμοποιούν επίσης το MS-222 (π.χ. Ramsay *et al.* 2006; 2009, Egan *et al.* 2009, Alderman & Bernier 2009), αλλά και στην αναισθητοποίηση που δέχτηκαν τα άτομα αμέσως μετά την καταπόνηση για την διευκόλυνση της διαλογής και τοποθέτησής τους στα δοχεία χαλάρωσης. Η αναισθητοποίηση που δέχτηκαν ενδεχομένως έχει τροποποιήσει είτε με τρόπο μειωτικό ή αυξητικό την απόκριση κατά την χαλάρωση και αναλόγως του χρόνου χαλάρωσης και του χρόνου παραμονής στο διάλυμα του αναισθητικού ενδεχομένως η αρχική αναισθητοποίηση να είχε και διαφορετική επίδραση. Βέβαια, εδώ να αναφερθεί πως στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός του αναισθητικού MS-222 με ισοφλουράνιο, ο οποίος έχει φανεί πως επιμηκύνει τον χρόνο της αναισθησίας μειώνοντας τα ποσοστά θνησιμότητας λόγω αυτής και πως τα άτομα επανέρχονται ταχύτερα από ότι όταν δέχονται μόνο το διάλυμα MS-222.

4.3. Ενδοπληθυσμιακή ποικιλομορφία στην απόκριση

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν μεγάλες αποκλίσεις από την μέση τιμή, με την μικρότερη διακύμανση τιμών να σημειώνεται για την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 1). Παρόμοια, μεγάλη διακύμανση παρατηρήθηκε και από τους Ramsay *et al.* (2006) οι οποίοι ύστερα από την 5^η ημέρα καταπόνησης με συνωστισμό εκτίμησαν πως τα επίπεδα κορτιζόλης κυμαίνονταν σε εύρος <1-45 ng/gr, ενώ ακόμα και τρεις ώρες ύστερα από συνωστισμό τα επίπεδα κυμαίνονταν σε εύρος 2-32 ng/gr, προδίδοντας μεγάλη ποικιλομορφία στην απόκριση ακόμα και στους πληθυσμούς κοινών

συνθηκών. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές σε **επίπεδο γενετικό** καθώς έχουν ήδη παρατηρηθεί διαφορές ανάμεσα σε άτομα ίδιου πληθυσμού ή στελέχους ως προς την απόκριση, οι οποίες έχουν γενετικό υπόβαθρο (Heath *et al.* 1993). Ακόμα, έχει φανεί πως μερικά ψάρια μπορεί να έχουν προδιάθεση να επιδεικνύουν υψηλά ή χαμηλά επίπεδα κορτιζόλης (Pottinger *et al.* 1992).

Ύστερα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον σολομό του Ατλαντικού (Fevolden *et al.* 1993), τον κυπρίνο (Tanck *et al.* 2002), την τσιπούρα (Tort *et al.* 2001), το γατόψαρο (Martins *et al.* 2006) και τη ραβδωτή πέρκα (Wong *et al.* 2010), έχει φανεί πως υπάρχει μεγάλη διακύμανση από άτομο σε άτομο τόσο στις βασικές τιμές όσο και στις τιμές που προκύπτουν ύστερα από καταπόνηση στην συγκέντρωση των κορτικοστεροειδών. Πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε επιλεκτική αναπαραγωγή έδειξαν πως υπάρχει κληρονομικότητα στην απόκριση (ανασκόπηση Pankhurst 2011). Η επιλογή των ατόμων ανάλογα με τα υψηλά ή χαμηλά επίπεδα απόκρισης στο στρες (high responders-low responders) φαίνεται να συσχετίζεται με την συμπεριφορά των ατόμων. Χαρακτηριστικά όπως η αυξημένη κινητικότητα και η μειωμένη σίτιση, η μειωμένη ικανότητα να αντιμετωπιστούν πολλοί παράγοντες καταπόνησης ταυτόχρονα, υψηλότερα ποσοστά πιθανότητας να αναπτυχθεί υποχωρητική συμπεριφορά σε διαμάχες και η μειωμένη αποτελεσματικότητα μετατρεψιμότητας της τροφής και αύξησης παρουσιάζουν άτομα με χαμηλότερα επίπεδα απόκρισης (low responders), συγκριτικά με άλλα άτομα που χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα απόκρισης (high responders) (ανασκόπηση Pankhurst 2011). Η προσαρμοστική σημασία αυτών των ποικίλων επιπέδων απόκρισης στην καταπόνηση ανάμεσα στα άτομα ενός πληθυσμού θεωρείται πως είναι ένας μηχανισμός που επιτρέπει την επιλογή ανάμεσα σε μία ποικιλία στρατηγικών απέναντι στην καταπόνηση (Overli *et al.* 2002).

4.4. Σχέση κορτιζόλης βάρους

Από την παρούσα εργασία σε όλους τους χρόνους ανάκαμψης που μετρήθηκαν δεν παρατηρήθηκε σχέση εξάρτησης της συγκέντρωσης της κορτιζόλης ως προς το βάρος. Ωστόσο, σε δύο από τις τρεις συνθήκες, στην ομάδα ελέγχου για την θερμοκρασία των 32 °C, και σε χρόνο t=15 min pns για την συνθήκη των 24 °C παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στο βάρος και την συγκέντρωση της κορτιζόλης.

Να σημειωθεί ότι για τον χρόνο ανάκαμψης $t=15$ min pns τα επίπεδα της κορτιζόλης δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από αυτά των βασικών τιμών αν και η μέση τιμή της κορτιζόλης ήταν διπλάσια συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Θα μπορούσε άρα, για τις χαμηλές συγκεντρώσεις κορτιζόλης το βάρος να επιδρά στην απόκριση στην καταπόνηση, ενώ έπειτα από ένα όριο συγκέντρωσης κορτιζόλης, αυτή να μην επηρεάζεται πλέον από το βάρος. Καθώς όμως συσχέτιση φάνηκε να υπάρχει μόνο σε δύο από τις τρεις συνθήκες και μόνο σε δύο χρόνους από όσους μελετήθηκαν το αποτέλεσμα αυτό ίσως προκύπτει λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων και ίσως μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων να έδειχνε, όπως και στις άλλες περιπτώσεις, πως δεν υπάρχει συσχέτιση.

Εδώ να αναφερθεί ωστόσο πως οι Ramsay *et al.* (2006) εκτίμησαν πως το βάρος θα μπορούσε να προβλέψει την συγκέντρωση κορτιζόλης. Αυτό σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους θα μπορούσε να ισχύει μόνο στην περίπτωση που τα άτομα εκτίθενται σε καθεστώς νηστείας και συνωστιμού, ο οποίος και βρήκαν πως συνιστά παράγοντα καταπόνησης. Στην παρούσα εργασία όμως τα άτομα δεν είχαν εκτεθεί σε καθεστώς νηστείας. Ως προς τον συνωστιμό δε, κατά την διάκριση διαφορετικών συνθηκών η αρχική πυκνότητα ήταν ίση με 39 άτομα/ L (σταδιακά όμως μειωνόταν λόγω θνησιμότητας) και κατά την περίοδο εγκλιματισμού σε κοινές συνθήκες, κατά την οποία εξετάστηκε η απόκριση στην καταπόνηση, η πυκνότητα ήταν ίση με 4 άτομα/ L. Οι Ramsay *et al.* (2006) χρησιμοποίησαν πυκνότητα για την ομάδα ελέγχου ίση με 0,25 άτομα/L και κατά τον συνωστιμό πυκνότητα ίση με 40 άτομα/L. Συγκριτικά, η πυκνότητα που χρησιμοποιήθηκε κατά την δεύτερη περίοδο στην παρούσα εργασία είναι μεν μεγαλύτερη αυτής της ομάδας ελέγχου των Ramsay *et al.* (2006), ωστόσο είναι υποδεκαπλάσια αυτής που χρησιμοποιήθηκε για την επίδραση του συνωστισμού.

Είναι όμως πολύ σημαντικό πως η συγκέντρωση που χρησιμοποίησαν οι Ramsay *et al.* (2006) για να προκαλέσουν συνωστιμό ήταν ίδια με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία πριν την μετάβαση στις κοινές συνθήκες. Μπορεί λοιπόν, η αρχική ιχθυοφόρτιση να είχε αποτελέσει χρόνιο παράγοντα χρόνιας καταπόνησης και να επέδρασε στην απόκριση των πληθυσμών ακόμα και αν μετά τον εγκλιματισμό χρησιμοποιήθηκε μικρότερη πυκνότητα. Κάτι τέτοιο θα σήμαινε πως η επίδραση της ιχθυοφόρτισης κατά την πρώιμη ανάπτυξη συνεπάγεται αλλαγή στην απόκριση στην καταπόνηση σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνεπώς, τόσο μεγαλύτερος αριθμός ατόμων όσο και μικρότερη πυκνότητα κατά την εκτροφή ίσως έδειχναν

ακριβέστερη εικόνα τόσο για τις βασικές τιμές απόκρισης στην καταπόνηση όσο και για τη συσχέτιση βάρους-συγκέντρωσης κορτιζόλης.

4.5. Ρυθμός αύξησης

Οι ρυθμοί αύξησης μελετήθηκαν σε δύο στάδια και τελικά εκτιμήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας τόσο κατά τη διάρκεια της εφαρμογής διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών, όσο και υπό κοινές συνθήκες. Κατά το πρώτο διάστημα, οι πληθυσμοί των 28 °C και 32 °C είχαν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης ως προς των 24 °C, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο, καθώς είναι γνωστό πως η θερμοκρασία επηρεάζει τον ρυθμό αύξησης. Η επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό αύξησης έχει αναφερθεί σε πολλές ακόμα περιπτώσεις (Barrionuevo & Burggren 1999, Delaunay *et al.* 2000, Dekens *et al.* 2003, Schroter *et al.* 2008, Schmidt & Starck 2010).

Αυτές οι αλλαγές στον ρυθμό αύξησης αυξανόμενης της θερμοκρασίας μπορούν να εξηγηθούν από την επίδραση της θερμοκρασίας στην ολοκλήρωση της σωματογένεσης. Οι Schroter *et al.* (2008) ανέφεραν πως η διάρκεια της σωματογένεσης μειώνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία σε εύρος θερμοκρασιών 20-30,8 °C, καθώς η θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα των βιοχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την σωματογένεση.

Η μελέτη των Kimmel *et al.* (1995), η οποία αποτελεί μελέτη αναφοράς για την ανάπτυξη του zebrafish έλεγξε την ανάπτυξη του είδους σε θερμοκρασία 25, 33 °C και 28.5 °C ως θερμοκρασία ελέγχου, η οποία είναι και η βέλτιστη θερμοκρασία εκτροφής για την ανάπτυξη εμβρύων και λαρβών του zebrafish (Westerfield 2000), και παρατήρησαν πως η εκτροφή σε αυτά τα θερμοκρασιακά όρια δεν επηρέασε την ομαλή ανάπτυξη του είδους. Στο συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών που εφαρμόστηκε δεν παρατηρήθηκαν παραμορφώσεις, αλλά παρατηρήθηκαν διαφορές στον ρυθμό αύξησης με τους πληθυσμούς που εκτράφηκαν στους 33 °C να επιδεικνύουν υψηλότερο ρυθμό αύξησης ως προς των 28.5 °C και των 25 °C να έχουν πιο αργό ρυθμό αύξησης.

Όπως προαναφέρθηκε, κατά την πρώτη περίοδο ο ρυθμός αύξησης της συνθήκης των 28 °C δεν διαφέρει ως προς των 32 °C. Η διαφορά αυτή ως προς την διαφοροποίηση που βρήκαν οι Kimmel *et al.* (1995) στις αντίστοιχες θερμοκρασίες

μπορεί να οφείλεται στη μικρότερη θερμοκρασιακή διαφορά ανάμεσα στις συνθήκες που μελετήθηκαν. Ακόμα, θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορετική διατροφή, η οποία έχει φανεί πως επηρεάζει τον ρυθμό αύξησης (Carvalho *et al.* 2006). Ίσως, επίσης, για αυτό το στάδιο ανάπτυξης και οι δύο θερμοκρασίες να ανήκουν στο βέλτιστο εύρος ανάπτυξης.

Ως προς την δεύτερη υπό μελέτη περίοδο, που αφορά στον εγκλιματισμό όλων των πληθυσμών στους 28 °C για διάστημα 20 ημερών, παρατηρήθηκε πως ο ρυθμός αύξησης των πληθυσμών των 32 °C διέφερε των αντιστοίχων των 24 °C και 28 °C, αλλά οι δύο τελευταίοι δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Ο ρυθμός αύξησης ήταν μεγαλύτερος στην περίπτωση των πληθυσμών που είχαν εκτραφεί στους 24 °C και 28 °C ως την μεταμόρφωση.

Για την συνθήκη των 28 °C δεν μεσολάβησε κάποια θερμοκρασιακή μετάβαση, οπότε η πτώση του ρυθμού αύξησης αντικατοπτρίζει οντογενετική αλλαγή. Παρόμοια αποτελέσματα ως προς τον χρόνο μείωσης του ρυθμού αύξησης, όπως αυτά φαίνονται από τις καμπύλες αύξησης, έχουν φανεί και στην μελέτη της Χρίστου (2013) η οποία εξέτασε τις ίδιες συνθήκες εκτροφής στο ίδιο στελεχος.

Ως προς την συνθήκη των 24 °C προέκυψε αύξηση του ειδικού ρυθμού αύξησης ως προς την πρώτη περίοδο. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τους Delaunay *et al.* (2000), οι οποίοι ανέφεραν πως αύξηση της θερμοκρασίας από τους 23 °C στους 28 °C οδήγησε σε 25% αύξηση του ρυθμού αύξησης στο zebrafish. Η αύξηση του ρυθμού αύξησης της συνθήκης των 24 °C κατά τη δεύτερη περίοδο έγκειται στην διαδικασία “αντισταθμιστικής αύξησης” (growth compensation), κατά την οποία όταν τα άτομα βρίσκονται σε θερμότερες-ευνοϊκότερες συνθήκες αυξάνουν σημαντικά τον ρυθμό αύξησης τους. Πολλοί οργανισμοί αντιδρούν αυξάνοντας κατά πολύ τον ρυθμό αύξησης του ύστερα από περιόδους που το περιβάλλον τους επέβαλλε μειωμένη αύξηση (growth depression) (Russell & Wootton 1992, Jobling *et al.* 1994). Η αντισταθμιστική αύξηση μπορεί να αντικατοπτρίζει διαφορές στην κατανομή της ενέργειας, αναλόγως δηλαδή του αν θα αποθηκευτεί ή θα χρησιμοποιηθεί προς αύξηση (Broekhuizen *et al.* 1994, Rombough 1994).

Οι διαφορές στον ρυθμό αύξησης ίσως σχετίζονται επίσης με την μυογένεση και την αύξηση των λευκών μυικών ινών. Στους τελεόστεους, η περιβαλλοντική θερμοκρασία κατά το εμβρυικό και νυμφικό στάδιο τροποποιεί την σύσταση των σκελετικών μυών οδηγώντας σε μακροπρόθεσμες αλλαγές της σύστασης που παρατηρούνται στα ιχθύδια και τα ενήλικα άτομα (Johnston 2006). Πρόσφατες

εργασίες στο zebrafish έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην επίδραση της θερμοκρασίας στην σύσταση των μυών. Οι Johnston et al. (2009) χρησιμοποιώντας θερμοκρασίες 22, 26 και 31 °C μέχρι και την εκκόλαψη, και κατόπιν αυτής κοινές θερμοκρασίες εκτροφής 26-27 °C, και παρά το μικρό διάστημα εφαρμογής διαφορετικών συνθηκών, παρατήρησαν πως οι πληθυσμοί επέδειξαν διαφορετική σύσταση ως προς τις λευκές μυικές ίνες. Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε πως τα άτομα που εκτράφηκαν στην θερμοκρασία των 26 °C είχαν περισσότερες λευκές μυικές ίνες από αυτά που αναπτύχθηκαν στις άλλες δύο συνθήκες. Αυτή η παρατήρηση είναι πολύ σημαντική διότι προτείνει πως η θερμοκρασία των 26 °C είναι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, καθώς οδηγεί σε ταχύτερη αύξηση κατά το στάδιο των ιχθυδίων και των ενηλίκων, εφόσον τα μυικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε λευκές μυικές ίνες σε μεγαλύτερο βαθμό (Hollway et al. 2007, Stellabotte et al. 2007). Καθώς στην παρούσα εργασία οι κοντινότερες θερμοκρασίες που εφαρμόστηκαν ως προς τους 26 °C, που ανέφεραν οι Johnston et al. (1999), ήταν αυτές των 24 °C και 28 °C, ίσως γι' αυτό παρουσιάζεται μεγαλύτερη αύξηση στις δύο αυτές συνθήκες κατά την δεύτερη περίοδο. Ένδεχεται άρα, έτσι να εξηγείται το γεγονός πως ο ρυθμός αύξησης της συνθήκης των 32 °C κατά την δεύτερη περίοδο μειώθηκε παραπάνω συγκριτικά με την συνθήκη των 28 °C, λόγω μειωμένου αριθμού μυικών ινών στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Πιθανώς λοιπόν, η σύσταση των μυών επηρέασε το πρότυπο αύξησης και στην παρούσα εργασία.

Τέλος, οι Hathaway (1928), Sumner & Doudoroff (1938), Brett (1944), Brett (1946) έδειξαν πως ο εγκλιματισμός σε υψηλότερες θερμοκρασίες λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, έχει πραγματοποιηθεί στο μεγαλύτερο βαθμό σε διάστημα μίας ημέρας, και είναι ολοκληρωμένος σε τρεις ημέρες, ενώ ο εγκλιματισμός σε χαμηλότερες θερμοκρασίες είναι μια πολύ αργή διαδικασία και απαιτεί 20 ημέρες για να ολοκληρωθεί. Έτσι, στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εγκλιματισμός στους 28 °C 20 ημερών πριν την εφαρμογή της καταπόνησης, διάστημα το οποίο είναι επαρκές για την μετάβαση στις νέες συνθήκες. Ενδεχομένως λοιπόν, κατά την μετάβαση αυτή να απαιτείται περισσότερη ενέργεια για τον εγκλιματισμό και αυτή να μη διατίθεται στην αύξηση για τους πληθυσμούς της συνθήκης των 32 °C.

4.5. Ρυθμός επιβίωσης

Ο ρυθμός επιβίωσης έως και τις 10 dpf ήταν ο πιο κρίσιμος και καθοριστικός και ήταν μεγαλύτερος για την συνθήκη των 28°C (80%). Παρόμοια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας ως διατροφή την αρτέμια και με θερμοκρασία εκτροφής τους 28 °C, έχουν ξανααναφερθεί από τους Carvalho *et al.* (2006) κατά την 21^η μέρα μετά την αρχή του ετερότροφου σταδίου. Οι Bagatto *et al.* (2001), έδειξαν επίσης πως μετά την 21^η dpf η θνησιμότητα φθίνει και πως τα κρισιμότερα στάδια για τη επιβίωση αφορούν ως αυτό το διάστημα, κάτι το οποίο απλά στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε λίγο νωρίτερα.

Τα υψηλά ποσοστά επιβίωσης σε αυτήν την θερμοκρασία ήταν αναμενόμενα για την συνθήκη των 28 °C, ως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (Kimmel 1995). Έπειτα, ακολούθησε ο ρυθμός επιβίωσης των 24°C, ενώ η θερμοκρασία των 32°C επέδειξε τον χαμηλότερο ρυθμό επιβίωσης (38-41%). Τα χαμηλά ποσοστά εδώ, θα μπορούσαν να ερμηνευτούν από τις αυξημένες ανάγκες για διατροφή κατά την έναρξη του ετερότροφου σταδίου, κατά το οποίο δεν υπήρχε ενδεχομένως επαρκής τροφή για τους πληθυσμούς αυτούς, ενώ η τροφή για τις άλλες δύο ομάδες ήταν επαρκής. Ακόμα, όπως προκύπτει από αυτήν την μελέτη ίσως η θερμοκρασία των 32 °C να ξεπερνά τα φυσιολογικά όρια ανοχής σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο.

Ως προς την τελική επιβίωση, οι πληθυσμοί των 24 °C επέδειξαν ίδιο ρυθμό επιβίωσης με την μία βιολογική επανάληψη των 28°C, ενώ και πάλι η συνθήκη των 32 °C είχε χαμηλότερο ρυθμό. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο βιολογικές επαναλήψεις των 28 °C έγκειται στην θνησιμότητα κάποιων ατόμων σε σφάλμα χειρισμού κατά την μετάβαση στις συνθήκες εγκλιματισμού. Ως προς την επιβίωση των 32 °C, διατηρώντας από πριν τα χαμηλότερα ποσοστά εξακολουθεί να τα έχει, χωρίς ωστόσο να παρατηρήθηκε ούτε για αυτήν την συνθήκη ούτε και για τις υπόλοιπες, περαιτέρω θνησιμότητα μετά το στάδιο των 10 πρώτων ημερών μετά την γονιμοποίηση. Η Χρίστου (2013) εκτίμησε ίδιο πρότυπο επιβίωσης ανάμεσα στις τρεις θερμοκρασίες κατά το στάδιο της ενηλικίωσης, η επιβίωση στους 24 °C (55% επιβίωση) και 28 °C (67%) δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ενώ η επιβίωση στους 32 °C (47%) ήταν η χαμηλότερη παρατηρηθείσα. Σε αυτήν την μελέτη επιβεβαιώνεται και πάλι πως η θερμοκρασία των 28 °C αποτελεί την βέλτιστη θερμοκρασία ως προς την επιβίωση και πως το βέλτιστο εύρος αφορά στις θερμοκρασίες 24-28 °C.

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη εξέτασε την επίδραση της θερμοκρασιακής ιστορίας που εφαρμόστηκε μέχρι την μεταμόρφωση στην πλαστικότητα της απόκρισης στην καταπόνηση κατά το τέλος της μεταμόρφωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Η θερμοκρασία που εφαρμόζεται κατά την πρόιμη ανάπτυξη δεν επηρεάζει την απόκριση στην καταπόνηση κατά το στάδιο των ιχθυδίων. Ωστόσο περαιτέρω μελέτη με περισσότερο αριθμό ατόμων θα πρέπει να πραγματοποιηθεί για να διαπιστωθεί πως όντως δεν επάγονται στατιστικά σημαντικές διαφορές και για μια πιο ακριβή προσέγγιση.
- Για πρώτη φορά αναφέρονται τα επίπεδα της κορτιζόλης ύστερα από οξεία καταπόνηση στο στάδιο ιχθυδίων για το είδος *Danio rerio* και αυτά αφορούν σε μέσες τιμές βάσης ίσες με 15 ng/g και μέσες τιμές κορύφωσης ίσες με 60 ng/g σε χρόνο μισής ώρας, σταθερές έως και μία ώρα μετά την καταπόνηση.
- Η σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας με την βιβλιογραφία δεν απέδωσε κοινά σημεία στο μέγεθος και την διάρκεια της απόκρισης, αν και το γενικότερο πρότυπο απόκρισης επιβεβαιώθηκε. Διαφορές στο αναπτυξιακό στάδιο που μελετήθηκε και σε μεθοδολογικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν καθώς και διαφορές σε γενετικό επίπεδο θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τις παρατηρούμενες διαφορές.
- Το βάρος γενικά φάνηκε να μην επηρεάζει την συγκέντρωση της κορτιζόλης, παρατηρήθηκε, όμως, συσχέτιση του βάρους ως προς την κορτιζόλη για τις χαμηλές τιμές συγκέντρωσης της κορτιζόλης, ή αλλιώς για τα άτομα που δεν υπέστησαν καταπόνηση ή που δεν πρόλαβαν να αυξήσουν σημαντικά τα επίπεδα τους.
- Η θερμοκρασία επέδρασε στον ρυθμό αύξησης, ο οποίος χαρακτηρίστηκε από μία περίοδο ταχείας και βραδείας αύξησης του, και η αλλαγή αυτή πραγματοποιήθηκε κατά την μετάβαση στις κοινές συνθήκες. Κατά την πρώτη περίοδο, η θερμοκρασία των 28 °C και 32 °C οδήγησαν σε μεγαλύτερο SGR, ενώ κατά την δεύτερη μεγαλύτερος SGR εκτιμήθηκε στις συνθήκες των 24 °C και 28 °C.
- Η θερμοκρασία επηρέασε την επιβίωση η οποία ήταν χαμηλότερη για την συνθήκη για των 32°C και στις δύο περιόδους που εκτιμήθηκε.

Βιβλιογραφία

- Agrawal, A. A. (2001). "Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species." Science **294**(5541): 321-326.
- Albokhadaim, I., C. L. Hammond, C. Ashton, B. H. Simbi, S. Bayol, S. Farrington and N. Stickland (2007). "Larval programming of post-hatch muscle growth and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Journal of Experimental Biology **210**(10): 1735-1741.
- Alderman, S. L. and N. J. Bernier (2009). "Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish." General and Comparative Endocrinology **164**(1): 61-69.
- Alsop, D. and M. M. Vijayan (2008). "Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish." American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology **294**(3): R711-R719.
- Alsop, D. and M. M. Vijayan (2009a). "Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **153**(1): 49-54.
- Alsop, D. and M. Vijayan (2009b). "The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event." General and Comparative Endocrinology **161**(1): 62-66.
- Audet, C., G. J. FitzGerald and H. Guderley (1986). "Photoperiod effects on plasma cortisol levels in *Gasterosteus aculeatus*." General and Comparative Endocrinology **61**(1): 76-81.
- Baker, B. I., Wilson, J. F., & T. J. Bowley (1984). "Changes in pituitary and plasma levels of MSH in teleosts during physiological colour change." General and comparative endocrinology **55**(1), 142-149.
- Barcellos, L. J. G., F. Ritter, L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, L. B. da Silva, A. C. Bedin, J. Finco and L. Cericato (2007). "Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*." Aquaculture **272**(1): 774-778.
- Barnett, C. W. and N. W. Pankhurst (1998). "The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862)." Aquaculture **162**(3): 313-329.
- Barrionuevo, W. R. and W. W. Burggren (1999). "O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O₂." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **276**(2): 505-513.
- Barton, B. A. (2002). "Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids." Integrative and Comparative Biology **42**(3): 517-525.
- Barton, B. A. and G. K. Iwama (1991). "Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids." Annual Review of Fish Diseases **1**: 3-26.
- Barton, B. A. and R. E. Peter (1982). "Plasma-Cortisol Stress Response in Fingerling Rainbow-Trout, *Salmo-Gairdneri* Richardson, to Various Transport Conditions, Anesthesia, and Cold Shock." Journal of Fish Biology **20**(1): 39-51.
- Barton, B. A., C. B. Schreck and L. A. Sigismondi (1986). "Multiple Acute Disturbances Evoke Cumulative Physiological Stress Responses in Juvenile Chinook Salmon." Transactions of the American Fisheries Society **115**(2): 245-251.
- Barton, B. A., C. B. Schreck, R. D. Ewing, A. R. Hemmingsen and R. Patino (1985). "Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*." General and comparative endocrinology **59**(3): 468-471.
- Beitinger, T. L. and W. A. Bennett (2000). "Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes." Environmental Biology of Fishes **58**(3): 277-288.
- Beitinger, T. L., W. A. Bennett and R. W. McCauley (2000). "Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature." Environmental Biology of Fishes **58**(3): 237-275.

- Blaxter, J. H. S. (1992). "The Effect of Temperature on Larval Fishes." Netherlands Journal of Zoology **42**(2-3): 336-357.
- Bonga, S. W. (1997). "The stress response in fish." Physiological reviews **77**(3): 591-625.
- Bremner, J. D. (1999). "Does stress damage the brain?" Biological psychiatry **45**(7): 797-805.
- Brett, J. R. (1944). "Some lethal temperature relations of Algonquin Park fishes." University of Toronto Press.
- Brett, J. R. (1946). "Rate of gain of heat-tolerance in goldfish (*Carassius auratus*)." University of Toronto studies. Biological series (53): 5-30.
- Brett, J. R. (1971). "Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). ." American Zoologist **11**(1): 99-113.
- Brown, S., K. Fedoruk and J. G. Eales (1978). "Physical injury due to injection or blood removal causes transitory elevations of plasma thyroxine in rainbow trout, *Salmo gairdneri*." Canadian Journal of Zoology **56**(9): 1998-2003.
- Canavello, P. R., J. M. Cachat, E. C. Beeson, A. L. Laffoon, C. Grimes, W. A. Haymore, M. F. Elegante, B. K. Bartels, P. C. Hart, S. I. Elkhayat, D. H. Tien, S. Mohnot, H. Amri and A. V. Kalueff (2011). "Measuring endocrine (cortisol) responses of zebrafish to stress." In *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*. Humana Press: 135-142.
- Carmichael, G. J., G. A. Wedemeyer, J. P. Mccraren and J. L. Millard (1983). "Physiological-Effects of Handling and Hauling Stress on Smallmouth Bass." Progressive Fish-Culturist **45**(2): 110-113.
- Carvalho, A. P., L. Araujo, et al. (2006). "Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance." Aquaculture Research **37**(11): 1107-1111.
- Chambers, R. C. and W. C. Leggett (1996). "Maternal influences on variation in egg sizes in temperate marine fishes." American Zoologist **36**(2): 180-196.
- Chrousos, G. P. (1998). "Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture." Annals of the New York Academy of Sciences **851**: 311-335.
- Chrousos, G. P. and P. W. Gold (1992). "The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis." JAMA **267**(9): 1244-1252.
- Chu, X. L. (1981). "A preliminary revision of fishes of the genus *Danio* from China." Zoology Research **2**: 145-156.
- Conover, D. O. and S. W. Heins (1987). "Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish." Nature **326**(6112): 496-498.
- Cortemeglia, C. and T. L. Beitinger (2005). "Temperature tolerances of wild-type and red transgenic zebra danios." Transactions of the American Fisheries Society **134**(6): 1431-1437.
- Cortemeglia, C. and T. L. Beitinger (2006). "Projected US distributions of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, based on temperature tolerance data." Journal of Thermal biology **31**(5): 422-428.
- Crosby, T. C., J. E. Hill, C. A. Watson, R. P. E. Yanong and R. Strange (2006). "Effects of tricaine methanesulfonate, hypno, metomidate, quinaldine, and salt on plasma cortisol levels following acute stress in threespot gourami *Trichogaster trichopterus*." Journal of Aquatic Animal Health **18**(1): 58-63.
- Dalvi, R. S., A. K. Pal, L. R. Tiwari, T. Das and K. Baruah (2009). "Thermal tolerance and oxygen consumption rates of the catfish *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to different temperatures." Aquaculture **295**(1): 116-119.
- Davis, K. B., N. C. Parker and M. A. Suttle (1982). "Plasma Corticosteroids and Chlorides in Striped Bass Exposed to Tricaine Methanesulfonate, Quinaldine, Etomidate, and Salt." Progressive Fish-Culturist **44**(4): 205-207.

- Davis, K. B., M. A. Suttle, et al. (1984). "Biotic and Abiotic Influences on Corticosteroid Hormone Rhythms in Channel Catfish." Transactions of the American Fisheries Society **113**(4): 414-421.
- De Marco, R. J., A. H. Groneberg, C. M. Yeh, L. A. C. Ramírez and S. Ryu (2013). "Optogenetic elevation of endogenous glucocorticoid level in larval zebrafish." Frontiers in neural circuits **7**.
- Dedovic, K., A. Duchesne, J. Andrews, V. Engert and J. C. Pruessner (2009). "The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress." Neuroimage **47**(3): 864-871.
- Dejesus, E. G., T. Hirano and Y. Inui (1991). "Changes in Cortisol and Thyroid-Hormone Concentrations during Early Development and Metamorphosis in the Japanese Flounder, *Paralichthys-Olivaceus*." General and comparative endocrinology **82**(3): 369-376.
- Dekens, M. P., C. Santoriello, D. Vallone, G. Grassi, D. Whitmore and N. S. Foulkes (2003). "Light regulates the cell cycle in zebrafish." Current biology **13**(23): 2051-2057.
- Delaunay, F., C. Thisse, O. Marchand, V. Laudet and B. Thisse (2000). "An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos." Science **289**(5477): 297-300.
- Detrich, H. W., I. L. Zon and M. Westerfield (2004). "The Zebrafish: Genetics, Genomics and Informatics." Academic Press, San Diego.
- Egan, R. J., C. L. Bergner, P. C. Hart, J. M. Cachat, P. R. Canavello, M. F. Elegante, S. I. Elkhayat, B. K. Bartels, A. K. Tien, D. H. Tien, S. Mohnot, E. Beeson, E. Glasgow, H. Amri, Z. Zukowska and A. V. Kalueff (2009). "Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish." Behavioural brain research **205**(1): 38-44.
- Ellis, T., B. North, A. P. Scott, N. R. Bromage, M. Porter and D. Gadd (2002). "The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout." Journal of Fish Biology **61**(3): 493-531.
- Engeszer, R. E., L. B. Patterson, A. A. Rao and D. M. Parichy (2007). "Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field." Zebrafish **4**(1): 21-40.
- Eriksen, M. S., M. Bakken, Å. Espmark, B. O. Braastad and R. Salte (2006). "Prespawning stress in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: maternal cortisol exposure and hyperthermia during embryonic development affect offspring survival, growth and incidence of malformations." Journal of Fish Biology **69**(1): 114-129.
- Fevolden, S. E., T. Refstie and B. Gjerde (1993). "Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout." Aquaculture, **118**(3): 205-216.
- Flos, R., L. Reig, P. Torres and L. Tort (1988). "Primary and Secondary Stress Responses to Grading and Hauling in Rainbow-Trout, *Salmo-Gairdneri*." Aquaculture **71**(1-2): 99-106.
- Frankino, W. A. and R. A. Raff (2004). "Evolutionary importance and pattern of phenotypic plasticity." Phenotypic plasticity: Functional and Conceptual Approaches. Oxford University Press. Oxford.: 64-97
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (02/2014).
- Fuiman, L. A., K. R. Poling and D. M. Higgs (1998). "Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes." Copeia (3): 602-611.
- Fusco, G. and A. Minelli (2010). "Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. Introduction." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **365**(1540): 547-556.
- Gamperl, A. K., M. M. Vijayan and R. G. Boutilier (1994). "Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications." Reviews in Fish Biology and Fisheries, **4**(2): 215-255.

- Garcia de la serrana, D., V. L. Vieira, K. B. Andree, M. Darias, A. Estevez, E. Gisbert and I. A. Johnston (2012). "Development temperature has persistent effects on muscle growth responses in gilthead sea bream." PLoS One **7**(12): e51884.
- Georga, I. and G. Koumoundouros (2010). "Thermally Induced Plasticity of Body Shape in Adult Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822)." Journal of Morphology **271**(11): 1319-1327.
- Georga, I., N. Glynatsi, A. Baltzois, D. Karamanos, D. Mazurais, M. J. Darias, C. L. Cahu, J. L. Zambonino-Infante and G. Koumoundouros (2011). "Effect of vitamin A on the skeletal morphogenesis of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)." Aquaculture Research **42**(5): 684-692.
- Georgakopoulou, E., D. G. Sfakianakis, S. Kouttouki, P. Divanach, M. Kentouri and G. Koumoundouros (2007). "The influence of temperature during early life on phenotypic expression at later ontogenetic stages in sea bass." Journal of Fish Biology **70**(1): 278-291.
- Ghisleni, G., K. M. Capiotti, R. S. Da Silva, J. P. Oses, Â. L. Piato, V. Soares, B. M. R. and C. D. Bonan (2012). "The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **36**(1): 176-182.
- Gilbert, S. F. (2001). "Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world." Developmental biology **233**(1): 1-12.
- Gordon, C. J. (2005). "Temperature and toxicology: An integrative, comparative, and environmental approach." CRC Press Boca Raton, USA: 338.
- Green, B. S. and R. Fisher (2004). "Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **299**(1): 115-132.
- Griffiths, B. B., P. J. Schoonheim, L. Ziv, L. Voelker, H. Baier and E. Gahtan (2012). "A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response." Frontiers in behavioral neuroscience **6**: 68.
- Grigorakis, K. (2007). "Compositional and organoleptic quality of fanned and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review." Aquaculture **272**(1-4): 55-75.
- Handa, R. J., K. M. Nunley, S. A. Lorens, J. P. Louie, R. F. McGivern and M. R. Bollnow (1994). "Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors." Physiology & behavior **55**(1): 117-124.
- Hathaway, E. S. (1928). "Quantitative study of the changes produced by acclimatization in the tolerance of high temperatures by fishes and amphibians." US Government Printing Office.
- Heath, D. D., N. J. Bernier, J. W. Heath and G. K. Iwama (1993). "Genetic, environmental, and interaction effects on growth and stress response of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) fry." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **50**(2): 435-442.
- Hemre, G. I., G. Lambertsen and Ø. Lie (1991). "The effect of dietary carbohydrate on the stress response in cod *Gadus morhua*." Aquaculture **95**(3): 319-328.
- Hollway, G. E., R. J. Bryson-Richardson, S. Berger, N. J. Cole, T. E. Hall and P. D. Currie (2007). "Whole-somite rotation generates muscle progenitor cell compartments in the developing zebrafish embryo". Developmental Cell **12** (2): 207-219.
- Huang, W. C., Y. S. Hsieh, I. H. Chen, C. H. Wang, H. W. Chang, C. C. Yang, K. T. H., Y. S. R. and Y. J. Chuang (2010). "Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish." Zebrafish **7**(3): 297-304.
- Imre, I., R. L. McLaughlin and D. L. G. Noakes (2002). "Phenotypic plasticity in brook charr: changes in caudal fin induced by water flow." Journal of Fish Biology **61**(5): 1171-1181.

- Iwama, G. K., A. D. Pickering and J. P. Sumpter (2011). "Fish stress and health in aquaculture." Cambridge University Press. **62**.
- Jobling, M., Meløy, O. H., Dos Santos, J., & Christiansen, B. (1994). "The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history." Aquaculture International **2**(2), 75-90.
- Johnston, I. A., H. T. Lee, D. J. Macqueen, K. Paranthaman, C. Kawashima, A. Anwar, J. R. Kinghorn and T. Dalmay (2009). "Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes." Journal of Experimental Biology **212**(12): 1781-1793.
- Johnston, I. A., V. L. A. Vieira and G. K. Temple (2001). "Functional consequences and population differences in the developmental plasticity of muscle to temperature in Atlantic herring *Clupea harengus*." Marine Ecology Progress Series **213**: 285-300.
- Kakizawa, S., T. Kaneko, S. Hasegawa and T. Hirano (1995). "Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout." General and Comparative Endocrinology **98**(2): 137-146.
- Keller, J. M., J. F. Escara-Wilke and E. T. Keller (2008). "Heat stress-induced heat shock protein 70 expression is dependent on ERK activation in zebrafish (*Danio rerio*) cells." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **150**(3): 307-314.
- Kern, S., T. R. Oakes, C. K. Stone, E. M. McAuliff, C. Kirschbaum and R. J. Davidson (2008). "Glucose metabolic changes in the prefrontal cortex are associated with HPA axis response to a psychosocial stressor." Psychoneuroendocrinology **33**(4): 517-529.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." Developmental dynamics **203**(3): 253-310.
- Kinne, O. (1962). "Irreversible non genetic adaptation." Comparative Biochemistry and Physiology **5**: 265-282.
- Klontz, G. W. (1995). "Care of fish in biological research." Journal of Animal Science **73**(11): 3485-3492.
- Koumoundouros, G., D. G. Sfakianakis, P. Divanach and M. Kentouri (2002). "Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles." Journal of fish biology **60**(4): 923-932.
- Koumoundouros, G., M. Pavlidis, L. Anezaki, C. Kokkari, A. Sterioti, P. Divanach and M. Kentouri (2002). "Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase." Journal of Experimental Zoology **292**(6): 573-579.
- Koumoundouros, G., P. Divanach, L. Anezaki and M. Kentouri (2001). "Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." Marine Biology **139**(5): 817-830.
- Laidley, C. W. and J. F. Leatherland (1988). "Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **89**(3): 495-502.
- Lawrence, C. (2007). "The husbandry of zebrafish *Danio rerio*: A review." Aquaculture **269**(1): 1-20.
- Lindsey, C. C. (1988). "Factors controlling meristic variation." Fish Physiology and Biochemistry **11**(part B): 197-274.
- Lohr, H. and M. Hammerschmidt (2011). "Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease." Annual Review of Physiology **73**: 183-211.
- López-Olmeda, J. F. and F. J. Sánchez-Vázquez (2011). "Thermal biology of zebrafish *Danio rerio*." Journal of Thermal Biology **36**(2): 91-104.

- Lutterschmidt, W. I. and V. H. Hutchison (1997). "The critical thermal maximum: history and critique." Canadian Journal of Zoology **75**(10): 1561-1574.
- Martins, C. I., J. W. Schrama and J. A. Verreth (2006). "The relationship between individual differences in feed efficiency and stress response in African catfish *Clarias gariepinus*." Aquaculture **256**(1): 588-595.
- Maule, A. G., C. B. Schreck, C. S. Bradford and B. A. Barton (1988). "Physiological-Effects of Collecting and Transporting Emigrating Juvenile Chinook Salmon Past Dams on the Columbia River." Transactions of the American Fisheries Society **117**(3): 245-261.
- Mayr, E. (1963). "Animal species and evolution." Harvard University Press; London: Oxford University Press.
- Mazik, P. M., B. A. Simco and N. C. Parker (1991). "Influence of water hardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport." Transactions of the American Fisheries Society **120**(1): 121-126.
- McEwen, B. S. (2007). "Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain." Physiological reviews **87**(3): 873-904.
- Mommsen, T. P., M. M. Vijayan and T. W. Moon (1999). "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation." Reviews in Fish Biology and Fisheries **9**(3): 211-268.
- Overli, O., T. G. Pottinger, T. R. Carrick, E. Overli and S. Winberg (2002). "Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness." Journal of Experimental Biology **205**(3): 391-395.
- Pankhurst, N. W. (2011). "The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective." General and Comparative Endocrinology **170**(2): 265-275.
- Pankhurst, N. W., R. M. G. Wells and J. F. Carragher (1992). "Effects of stress on plasma cortisol levels and blood viscosity in blue mao mao, *Scorpius violaceus* (hutton), a marine teleost. ." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **101**(2): 335-339.
- Parichy, D. M., M. R. Elizondo, M. G. Mills, T. N. Gordon and R. E. Engeszer (2009). "Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish." Developmental Dynamics **238**(12): 2975-3015.
- Parker, M. O., M. E. Millington, F. J. Combe and C. H. Brennan (2012). "Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics." PLoS One **7**(4): e34992.
- Pavlidis, M., G. Koumoundouros, A. Steriotti, S. Somarakis, P. Divanach and M. Kentouri (2000). "Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)." Journal of Experimental Zoology **287**(3): 225-232.
- Pavlidis, M., L. Greenwood, M. Paalavuo, H. Molsa and J. T. Laitinen (1999). "The effect of photoperiod on diel rhythms in serum melatonin, cortisol, glucose, and electrolytes in the common dentex, *Dentex dentex*." General and Comparative Endocrinology **113**(2): 240-250.
- Pavlidis, M., N. Digka, A. Theodoridi, A. Campo, K. Barsakis, G. Skouradakis, A. Samaras and A. Tsalafouta (2013). "Husbandry of zebrafish, *Danio rerio*, and the cortisol stress response." Zebrafish **10**(4): 524-531.
- Pelster, B. (2002). "Developmental plasticity in the cardiovascular system of fish, with special reference to the zebrafish." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **133**(3): 547-553.
- Pickering, A. D. (1981). Stress and fish. London ; New York, Academic Press.
- Pickering, A. D. (1992). "Rainbow trout husbandry: management of the stress response." Aquaculture **100**(1): 125-139.
- Pickering, A. D., T. G. Pottinger and P. Christie (1982). "Recovery of the Brown Trout, *Salmo-Trutta*-L, from Acute Handling Stress - a Time-Course Study." Journal of Fish Biology **20**(2): 229-244.
- Pickering, A. D., T. G. Pottinger, J. Carragher and J. P. Sumpter (1987). "The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature

- male brown trout, *Salmo trutta* L." General and Comparative Endocrinology **68**(2): 249-259.
- Pigliucci, M., C. J. Murren and C. D. Schlichting (2006). "Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation." Journal of Experimental Biology **209**(Pt 12): 2362-2367.
 - Polo, A., M. Yufera and E. Pascual (1991). "Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L." Aquaculture, **92**: 367-375.
 - Pottinger, T. G., A. D. Pickering and M. A. Hurley (1992). "Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." Aquaculture **103**(3): 275-289.
 - Pottinger, T. G., P. H. Balm and A. D. Pickering (1995). "Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in male rainbow trout." General and Comparative Endocrinology **98**(3): 311-320.
 - Pottinger, T. G. and , G. M. Calder (1995). "Physiological stress in fish during toxicological procedures: a potentially confounding factor." Environmental Toxicology and Water Quality **10**(2), 135-146.
 - Pottinger, T. G., P. Prunet and A. D. Pickering (1992). "The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water." General and Comparative Endocrinology **88**(3): 454-460.
 - Pruessner, J. C., K. Dedovic, M. Pruessner, C. Lord, C. Buss, L. Collins, A. Dagher and S. J. Lupien (2010). "Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations." PSYCHONEUROENDOCRINE IMAGING **35**(1): 179-191.
 - Ramsay, J. M., G. W. Feist, Z. M. Varga, M. Westerfield, M. L. Kent and C. B. Schreck (2006). "Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*." Aquaculture **258**(1): 565-574.
 - Ramsay, J. M., G. W. Feist, Z. M. Varga, M. Westerfield, M. L. Kent and C. B. Schreck (2009). "Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress." Aquaculture **297**(1): 157-162.
 - Randall, D. J. and S. F. Ferry (1992). "Catecholamines." Fish Physiology **12**: 255-300.
 - Reddy, P. K., M. M. Vijayan, J. F. Leatherland and T. W. Moon (1995). "Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout?" Journal of Fish Biology **46**(2): 341-359.
 - Reid, S. G., N. J. Bernier and S. F. Perry (1998). "The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **120**(1): 1-27.
 - Ribas, L. and F. Piferrer (2013). "The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research." Reviews in Aquaculture **5**: 1-32.
 - Ricci, L., C. H. Summers, E. T. Larson, D. O'Malley and R. H. Melloni Jr (2013). "Development of aggressive phenotypes in zebrafish: interactions of age, experience and social status." Animal Behaviour **86**(2): 245-252.
 - Rohlf, F. J. (2008). "tpsDig, version 2.12. ." Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
 - Russell, N. R., & R. J. Wootton (1992). Appetite and growth compensation in the European minnow, *Phoxinus phoxinus* (Cyprinidae), following short periods of food restriction. Environmental Biology of Fishes, **34**(3), 277-285.
 - Schaefer, J. and A. Ryan (2006). "Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*." Journal of Fish Biology **69**(3): 722-734.
 - Schmidt, K. and J. M. Starck (2010). "Developmental Plasticity, Modularity, and Heterochrony During the Phylotypic Stage of the Zebra Fish, *Danio rerio*." Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution **314B**(2): 166-178.

- Schnurr, M. E., Y. Yin and G. R. Scott (2013). "Temperature during embryonic development has persistent effects on metabolic enzymes in the muscle of zebrafish." J Exp Biol.
- Schreck, C. B. (2000). "Accumulation and long-term effects of stress in fish." The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare: 147-158.
- Schreck, C. B., W. Contreras-Sanchez and M. S. Fitzpatrick (2001). "Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny." Aquaculture **197**(1): 3-24.
- Schroter, C., L. Herrgen, A. Cardona, G. J. Brouhard, B. Feldman and A. C. Oates (2008). "Dynamics of zebrafish somitogenesis." Developmental Dynamics **237**(3): 545-553.
- Schulkin, J., P. W. Gold, et al. (1998). "Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: Implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load." Psychoneuroendocrinology **23**(3): 219-243.
- Scott, G. R. and I. A. Johnston (2012). "Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(35): 14247-14252.
- Scott, G. R. and I. A. Johnston (2012). "Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(35): 14247-14252.
- Scott, G. R., M. E. Schnurr, Y. Yin and I. A. Johnston (2012). "Embryonic temperature produces persistent effects on the capacity for thermal acclimation in adult zebrafish." Faseb Journal **26**.
- Selye, H. (1974). "Stress without Distress." Philadelphia, PA: Lippincott.
- Sfakianakis, D. G., I. Leris, A. Laggis and M. Kentouri (2011). "The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles." Environmental biology of fishes **92**(2): 197-205.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1969). "Biometry." Freeman and Company, New York.
- Spence, R., G. Gerlach, C. Lawrence and C. Smith (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." Biological Reviews **83**(1): 13-34.
- Stellabotte, F., B. Dobbs-McAuliffe, D. A. Fernandez, X. Feng, and S. H. Devoto (2007). "Dynamic somite cell arrangements lead to distinct waves of myotomal growth." Development **134**: 1253-1257.
- Stickland, N.C., White, R.N., Mescall, P.E., Crook, A.R., Thorpe, J.E., (1988). The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. Anat. Embryol. **178**: 253-257.
- Sumner, F. B. and P. Doudoroff (1938). "Some experiments upon temperature acclimatization and respiratory metabolism in fishes." The Biological Bulletin, **74**(3): 403-429.
- Suzuki, H., M. Kawasaki, H. Ohnishi, T. Nakamura and Y. Ueta (2009). "Regulatory mechanism of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene expression in acute and chronic stress." Peptides **30**(9): 1763-1770.
- Tanck, M. W. T., T. Claes, H. Bovenhuis and J. Komen (2002). "Exploring the genetic background of stress using isogenic progenies of common carp selected for high or low stress-related cortisol response." Aquaculture **204**(3-4): 419-434.
- Thorpe, J. E., M. G. McConway, M. S. Miles and J. S. Muir (1987). "Diel and seasonal changes in resting plasma cortisol levels in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L." General and Comparative Endocrinology, **65**(1): 19-22.
- Tomasso, A. O., J. J. Isely and J. R. Tomasso (1996). "Physiological responses and mortality of striped bass angled in freshwater." Transactions of the American Fisheries Society **125**(2): 321-325.
- Tort, L., D. Montero, L. Robaina, H. Fernández-Palacios and M. S. Izquierdo (2001). "Consistency of stress response to repeated handling in the gilthead sea bream *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. ." Aquaculture Research **32**(7): 593-598.

- Tsigos, C. and G. P. Chrousos (2002). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress." Journal of psychosomatic research **53**(4): 865-871.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon (1994). "The Stress-Response and the Plasma Disappearance of Corticosteroid and Glucose in a Marine Teleost, the Sea Raven." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **72**(3): 379-386.
- Wagner, E., R. Arndt and B. Hilton (2002). "Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide." Aquaculture **211**(1-4): 353-366.
- Wedemeyer, G. A., B. A. Barton and D. G. McLeay (1990). "Stress and acclimation." Methods for Biology: 451-489.
- West-Eberhard, M. J. (1989). "Phenotypic plasticity and the origins of diversity." Annual Review of Ecology and Systematics **20**: 249-278.
- Westerfield, M. (1995). "The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)." Eugene, OR, University of Oregon Press.
- Westerfield, M. (2000). "The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)." University of Oregon Press, Eugene, Oregon, USA.
- Whitman, D. W. and A. A. Agrawal (2009). "What is phenotypic plasticity and why is it important." Phenotypic plasticity of insects: 1-63.
- Wilson, J. M., R. M. Bunte and A. J. Carty (2009). "Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*)." Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS **48**(6): 785-789.
- Wong, K., A. Stewart, T. Gilder, N. Wu, K. Frank, S. Gaikwad, C. Suci, J. DiLeo, E. Utterback, K. Chang, L. Grossman, J. Cachat and A. V. Kalueff (2010). "Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish." Brain research **1348**: 209-215.
- Wright, K. A., C. M. C. Woods, B. E. Gray and P. M. Lokman (2007). "Recovery from acute, chronic and transport stress in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*." Journal of Fish Biology **70**(5): 1447-1457.
- Yeh, C. M., M. Glock and S. Ryu (2013). "An optimized whole-body cortisol quantification method for assessing stress levels in larval zebrafish." PLoS One **8**(11): e79406.
- Young, G., B. T. Bjornsson, P. Prunet, R. J. Lin and H. A. Bern (1989). "Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol." General and Comparative Endocrinology **74**(3): 335-345.
- Young, P. S. and J. J. Cech Jr (1993). "Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis*." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **50**(10): 2094-2099.
- Zon, L. I. and R. T. Peterson (2005). "In vivo drug discovery in the zebrafish." Nature Reviews Drug Discovery **4**(1): 35-44.
- Χρίστου, Μ. (2013). "Πλαστικότητα της αύξησης και της διαφοροποίησης των σκληρών δομών του zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)." Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περίληψη

Επίδραση του περιβάλλοντος πρώιμης ανάπτυξης στην ποιότητα των ιχθυδίων του zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Η φαινοτυπική πλαστικότητα περιγράφει την ικανότητα ενός γενοτύπου να παράγει μία ποικιλία φαινοτύπων ως απόκριση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτή η απόκριση μπορεί να εκφραστεί σε μορφολογικό, βιοχημικό, φυσιολογικό, αναπτυξιακό επίπεδο, ή ακόμα και στη συμπεριφορά του οργανισμού. Αποτελεί συχνό φαινόμενο στους ιχθείς, με τη θερμοκρασία κατά την πρώιμη οντογένεση να συνιστά τον σημαντικότερο και περισσότερο μελετημένο παράγοντα. Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας κατά την πρώιμη ανάπτυξη στην ποιότητα των ιχθυδίων του zebrafish (*Danio rerio*), πειραματικοί πληθυσμοί 350 ατόμων υποβλήθηκαν σε θερμοκρασία 24, 28 και 32 °C από τη γονιμοποίηση μέχρι την αρχή της μεταμόρφωσης. Ακολούθησε περίοδος 20 ημερών, κατά την οποία τα ιχθύδια διατηρήθηκαν υπό κοινές συνθήκες, που αφορούσαν στην θερμοκρασία των 28 °C. Για να μελετηθεί η φαινοτυπική πλαστικότητα σε επίπεδο φυσιολογίας, οι πειραματικοί πληθυσμοί υποβλήθηκαν σε οξεία καταπόνηση (στρες) κατά το τέλος εφαρμογής των κοινών συνθηκών. Η δοκιμασία στρες περιελάμβανε κυνήγι λίγων δευτερολέπτων με τη χρήση απόχης, σύλληψης τους και έκθεσης τους στον αέρα για 2 λεπτά. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε συγκεκριμένους χρόνους μετά την καταπόνηση (15, 30 και 60 min), και στην συνέχεια αφότου θανατώθηκαν με τη χρήση αναισθητικού MS-222 και ισοφλουρανίου, ζυγίστηκαν, φωτογραφήθηκαν και συντηρήθηκαν στους -20 °C. Για την μελέτη της απόκρισης στο στρες, πραγματοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA για την εκτίμηση των επιπέδων κορτιζόλης στα άτομα των διαφορετικών συνθηκών. Στη μελέτη αυτή εκτιμήθηκε επίσης η επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό αύξησης των πληθυσμών καθώς και στην επιβίωση. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις. Για πρώτη φορά γίνεται εκτίμηση της απόκρισης της κορτιζόλης στην οξεία καταπόνηση στο στάδιο των ιχθυδίων zebrafish. Στα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, φάνηκε πως η θερμοκρασιακή ιστορία δεν επάγει στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την απόκριση στην καταπόνηση. Ωστόσο, η θερμοκρασία επέδρασε τόσο στον ρυθμό αύξησης όσο και στην επιβίωση.

Abstract

Effect of early environment on the quality of juvenile zebrafish, *Danio rerio*
(Hamilton, 1822)

Phenotypic plasticity describes a genotype's ability to produce a variety of phenotypes in response to different environmental conditions. This response can express itself at a morphological, biochemical, physiological or developmental level or even through changes in the behavior. The most common, important and well-studied factor inducing plasticity in fish populations is temperature. Aiming to study the effect of temperature during early development to juveniles' zebrafish (*Danio rerio*) quality, experimental populations, each of them consisting of 350 individuals, were subjected to breeding temperature of 24, 28 and 32 °C, from the stage of fertilization till the onset of metamorphosis. Following that conditions, there started a period of 20 days during which all populations were maintained under common temperature conditions (28 °C). In order to study phenotypic plasticity at physiological level, all experimental populations were subjected to acute stress at the end of the application of common conditions, so as to test different populations' response to stress. The stress assay included few seconds of net chasing, netting and exposure to air for 2 minutes. Samples were selected after specific time following stress (15, 30 and 60 min), they were euthanatized using lethal dose of anesthetic MS-222 combined with isoflurane and then they were weighted, photographed and stored at -20 °C. In order to study stress response, estimating individuals' cortisol concentration, the immunoassay method of ELISA was assessed. In this study, the effect of temperature on growth and survival was also estimated. The experiment was conducted in duplicate. It is the first time studying juveniles' zebrafish cortisol response to acute stress. The results of this study suggest that thermal history did not significantly affect stress response. However, temperature affected fish growth rate, as well as fish survival.